

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-518425

(P2004-518425A)

(43) 公表日 平成16年6月24日(2004.6.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 9
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 25/28	4 B O 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 299 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-552961 (P2002-552961)	(71) 出願人	000253503
(86) (22) 出願日	平成13年7月25日 (2001.7.25)		麒麟麦酒株式会社
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月23日 (2003.6.23)		東京都中央区新川二丁目10番1号
(86) 国際出願番号	PCT/IB2001/002839	(74) 代理人	100100549
(87) 国際公開番号	W02002/051868		弁理士 川口 嘉之
(87) 国際公開日	平成14年7月4日 (2002.7.4)	(74) 代理人	100090516
(31) 優先権主張番号	PCT/US00/35260		弁理士 松倉 秀実
(32) 優先日	平成12年12月23日 (2000.12.23)	(74) 代理人	100089244
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 遠山 勉
		(72) 発明者	西川 光郎
			日本国群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 幹細胞成長因子様ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関連した方法および物質

(57) 【要約】

本発明は、新規ポリヌクレオチド、およびかかるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、ならびに新規ヒトおよびマウス分泌幹細胞成長因子様ポリペプチドに相当するそれらの突然変異体または変異体を提供する。これらのポリヌクレオチドは、マウス骨髄、およびヒト胎児肝臓、脾臓、卵巣、成人脳、肺腫瘍、脊髄、頸部、卵巣、内皮細胞、臍帯、胎盤、リンパ球、肺線維芽細胞、胎児脳、および精巣から調製される cDNA ライブラリーから単離した核酸配列を含む。本発明の他の態様としては、新規ヒト分泌幹細胞成長因子様ポリペプチド、およびかかるポリペプチドに特異的な抗体を生産するプロセスを含有するベクターが挙げられる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

幹細胞成長因子の活性を有するポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、配列番号 27、29、33、37、もしくは 39、それらの翻訳されるタンパク質をコードする部分、それらの成熟タンパク質をコードする部分、それらの細胞外部分、またはそれらの活性ドメインからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 2】

生物活性を有するポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチド。 10

【請求項 3】

生物活性を有するポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドと約 90% を超える配列同一性を有するポリヌクレオチド。

【請求項 4】

DNA 配列である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの相補体を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。 20

【請求項 7】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを発現するように遺伝子操作した宿主細胞。

【請求項 9】

前記ポリヌクレオチドは、前記宿主細胞において前記ポリヌクレオチドの発現を制御する調節配列と作動可能に結合している、請求項 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

配列番号 28、30、31、32、34、38、または 40、それらの翻訳されるタンパク質をコードする部分、それらの成熟タンパク質をコードする部分、それらの細胞外部分、またはそれらの活性ドメインからなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。 30

【請求項 11】

請求項 10 に記載のポリペプチド、およびキャリアを含む組成物。

【請求項 12】

配列番号 28、30、31、32、34、38、または 40 からなる群から選択されるポリペプチド配列由来の少なくとも 10 個の連続したアミノ酸を含む、幹細胞成長因子様活性を有するポリペプチド。

【請求項 13】

配列番号 28、30、31、32、34、38、または 40 からなる群から選択されるポリペプチド配列由来の少なくとも 5 個の連続したアミノ酸を含む、請求項 12 に記載のポリペプチド。 40

【請求項 14】

請求項 12 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 15】

請求項 13 に記載するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 16】

請求項 10 に記載するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 17】

請求項 10 に記載のポリペプチドに特異的な抗体。

【請求項 18】

試料中の、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを検出する方法であって：

a) 該試料を、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドに結合して、該ポリヌクレオチドとの複合体を形成する化合物と、該複合体を形成するのに十分な期間接触させ、

b) 該複合体を検出し、もし複合体が検出される場合、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドが検出されること

を含む方法。

【請求項 19】

試料中の、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを検出する方法であって：

a) 該試料を、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドにアニーリングする核酸プライマーと、かかる条件下で接触させ、

b) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの少なくとも一部を含む産物を増幅し、そして

c) 前記産物、およびそれによって該試料中の請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを検出すること

を含む方法。

【請求項 20】

前記ポリヌクレオチドは、RNA 分子を含み、前記方法はアニーリングされた RNA 分子を、cDNA ポリヌクレオチドへ逆転写することをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

試料中の、請求項 10 に記載のポリペプチドを検出する方法であって：

a) 該試料を、前記ポリペプチドに結合して、該ポリペプチドとの複合体を形成する化合物と、該複合体を形成するのに十分な条件下で、そして十分な期間接触させ、そして

b) 該複合体の構造を検出し、もし複合体の構造が検出される場合、請求項 11 に記載のポリペプチドが検出されこと

を含む方法。

【請求項 22】

請求項 11 に記載のポリペプチドに結合する化合物を特定する方法であって：

a) 該化合物を、請求項 10 に記載のポリペプチドと、ポリペプチド／化合物複合体を形成するのに十分な条件下で、そして十分な期間接触させ、そして

b) 該化合物を検出し、もし該ポリペプチド／化合物複合体が検出される場合、請求項 10 に記載のポリペプチドに結合する化合物が特定されること

を含む方法。

【請求項 23】

請求項 10 に記載のポリペプチドに結合する化合物を特定する方法であって：

a) 細胞において、該化合物を、請求項 10 に記載のポリペプチドと、ポリペプチド／化合物複合体を形成するのに十分な期間接触させ（ここで、該複合体は、細胞においてレポーター遺伝子の発現を駆動する）、そして

b) レポーター遺伝子配列の発現を検出することにより該複合体を検出し、もし該ポリペプチド／化合物複合体が検出される場合、請求項 10 に記載のポリペプチドに結合する化合物が特定されること

を含む方法。

【請求項 24】

幹細胞成長因子様ポリペプチドを生産する方法であって：

a) 請求項 8 に記載の宿主細胞を、前記細胞において該ポリペプチドを発現するのに十分な条件下で培養し、そして

b) 工程 (a) の細胞培養物または細胞から、該ポリペプチドを単離することを含む方法。

【請求項 25】

10

20

30

40

50

請求項 10 に記載のポリペプチドを含むキット。

【請求項 26】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチド、または表面に結合させた請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの特有のセグメントを含む核酸アレイ

【請求項 27】

前記アレイは、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの特有のセグメントに対する完全なマッチを検出する、請求項 26 に記載のアレイ。

【請求項 28】

前記アレイは、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドの特有のセグメントに対するミスマッチを検出する、請求項 26 に記載のアレイ。 10

【請求項 29】

請求項 10 に記載の幹細胞成長因子様ポリペプチドの増大した活性または発現を必要とする被験体の治療方法であって：

(a) 治療的量の、前記ポリペプチドのアゴニスト、

(b) 治療的量の、前記ポリペプチド、および

(c) 治療的量の、該ポリペプチドが生産される形態かつ条件下にある前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

からなる群から選択される組成物、ならびに薬学的に許容可能なキャリアを、該被験体に投与することを含む方法。 20

【請求項 30】

請求項 10 に記載の幹細胞成長因子様ポリペプチドの活性または発現を阻害することが必要な被験体の治療方法であって：

(d) 治療的量の、前記ポリペプチドのアンタゴニスト、

(e) 治療的量の、前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を阻害するポリヌクレオチド、および

(f) 治療的量の、該幹細胞成長因子様ポリペプチドと、そのリガンドに関して競合するポリペプチド

からなる群から選択される組成物、ならびに薬学的に許容可能なキャリアを、該被験体に投与することを含む方法。 30

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、2000年12月23日に出願された国際出願第 P C T / U S 0 0 / 3 5 2 6 0 号の一部継続出願である。

【0002】

[背景]

1. 1 技術分野

本発明は、新規ポリヌクレオチド、およびかかるポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質、また例えば治療方法、診断方法および研究方法におけるこれらのポリヌクレオチドおよびタンパク質に関する使用を提供する。特に、本発明は、新規幹細胞成長因子様ポリペプチドに関する。 40

【0003】

1. 2 背景技術

特定されたポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列には、例えば、診断法、法医学、遺伝子マッピング、遺伝病または他の形質の原因となる突然変異の特定において、生物学的多様性を評価するために、また D N A およびアミノ酸配列に依存する多くの他のタイプのデータおよび産物を生じるために、数多くの用途がある。タンパク質は、例えば、リーダー配列クローニングの場合ではそれらの分泌された性質によって、P C R ベースの技法の場合にはそれらの細胞または組織源によって、あるいは既知の生物活性を有する他の遺伝子に対する構造的類似性によって、生物活性を有することが知られている。本発明は、こ 50

これらのポリペプチド、およびそれらをコードするポリヌクレオチドに関するものである。
特に、本発明は、新規幹細胞成長因子様ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関する。

【0004】

幹細胞は、無制限または長期の自己複製の能力を有する細胞であるとして定義され、少なくとも1つの型の高度に分化された子孫を生じることができる。幹細胞とその最終的に分化された子孫との間には、限られた能力および制限された分化潜在能力を有するコミットした (committed) 前駆体の中間集団が存在すると考えられる [Watt and Hogan, Science, 287: 1427-1430 (2000)]。胚幹細胞の分裂および分化は、多細胞生物のすべての分化した細胞および臓器で起きる。造血細胞のような最終的に分化した細胞集団を補充するために、幹細胞の貯蔵は、生物の成年期中に維持される。成体幹細胞は、胚幹細胞に由来するものであり、分化に関して限られた能力のみを有すると一般に考えられる。概して幹細胞は、既定の分化経路にそれらを誘導するどころか、in vitroで培養および維持するのは極めて困難であった。

【0005】

しかしながら、近年、新たな研究により、成体幹細胞が、分化に関して、これまで考えられてきたよりも相当広い潜在能力を有することがわかってきた。照射宿主において移植された場合の成体神経幹細胞は、骨髄に集まり (populate)、骨髄性細胞、リンパ系細胞、および初期造血細胞を生じることが可能であることがわかった [Bjornson et al, Science, 283: 534-537 (1999)]。また、研究者等は、in vitroでヒト胚幹細胞を初めて培養することができた。下記著者等は、ヒト胚盤胞細胞は、長期間にわたって培養することが可能であり、多種多様の細胞型に分化することができることを示した [Thomson et al, Science, 282: 1145-1147 (1998)]。この結果は、臓器不全および変性性疾患の治療のための、同種移植および臓器再生の利用の道を開いた。幹細胞上の複数の受容体と、可溶性および間質性の細胞により発現される因子との正確な相互作用が、幹細胞を分裂させ、分化にコミットさせるのに必要とされる。因子を供給する組織ニッチ (niche) および微小環境が最も重要であることが明らかになってきた。IL-3、IL-6、IL-7のようなサイトカイン、ならびにflt-3、エリスロポエチン、および幹細胞因子のような可溶性タンパク質はすべて、特定の経路により分化を達成するために呼応して作用することがわかっている。成長因子、サイトカイン、および組織局在化の正確な組合せは、種々の分化した幹細胞の集団を生じ得ると考えられる。

【0006】

したがって、本発明の幹細胞成長因子様ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、胚幹細胞および成体幹細胞の分化を誘導して、種々の細胞型を生じさせるのに使用してもよい。それらはまた、白血病、血友病、およびアルツハイマー病のような変性疾患の治療に使用してもよい。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドはさらに、移植組織を必要とする患者の助けとなり得る新たな組織および臓器を生成するのに利用してもよい。

【0007】

[発明の概要]

本発明は、新規幹細胞成長因子様ポリペプチド、かかるポリペプチドをコードする新規単離ポリヌクレオチド (組換えDNA分子、それらのクローニングした遺伝子または縮重変異体 (特に対立遺伝子変異体のような天然に存在する変異体)、アンチセンスポリヌクレオチド分子を含む)、およびかかるペプチド上に存在する1つまたはそれより多いエピトープを特異的に認識する抗体、ならびにかかる抗体を産生するハイブリドーマの発見に基づいている。具体的には、本発明のポリヌクレオチドは、マウス大腿部骨、およびヒト胎児肝臓、脾臓、卵巣、成人脳、肺腫瘍、脊髄、頸部、卵巣、内皮細胞、臍帯、胎盤、リンパ球、肺線維芽細胞、胎児脳、および精巣から調製されるcDNAライブラリーから単離したポリヌクレオチドに基づいている。本発明の組成物はさらに、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターのようなベクター、かかるポリヌクレオチドを含有するように遺伝子操作した細胞、およびかかるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド

を発現するように遺伝子操作した細胞を含む。

【0008】

本発明の組成物は、配列番号27、29、33、37、または39に記載されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、またはそれらの断片、それらの完全長タンパク質コード配列を含むポリヌクレオチド（例えば、配列番号28、配30～32、34、38、または40）、およびそれらの成熟タンパク質コード配列のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含むが、これらに限定されない単離ポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドとしてはまた、（a）配列番号27、29、33、37、または39に記載されるヌクレオチド配列のいずれかの相補体にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、（b）配列番号23、25、28、30～32、34～35、38、または40のいずれかをコードするヌクレオチド配列、上記ポリヌクレオチドに少なくとも70%ポリヌクレオチド配列同一性を有する上述の任意のポリヌクレオチドの対立遺伝子変異体であるポリヌクレオチド、上述のポリペプチドのいずれかの種相同体（例えば、オルソログ）をコードするポリヌクレオチド、または配列番号23、25、28、31、38、または40を含むポリペプチドの特定のドメインまたは切断型を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0009】

本出願で使用する場合のコレクションは、たった1つのポリヌクレオチドの収集であり得る。配列情報または各配列の特有の特定用情報のコレクションは、核酸アレイ上で提供され得る。一実施形態では、配列情報のセグメントが、核酸アレイ上で提供され、このセグメントを含有するポリヌクレオチドを検出する。上記アレイは、このセグメントを含有するポリヌクレオチドに対する完全マッチまたはミスマッチを検出するように設計され得る。コレクションはまた、コンピュータ可読フォーマットで提供することができる。

20

【0010】

本発明はさらに、上述のポリヌクレオチドの少なくとも断片を含むクローニングまたは発現ベクター、およびこれらの発現ベクターで形質転換した宿主細胞または生物を提供する。有用なベクターとしては、当該技術分野で既知のプラスミド、コスミド、入ファージ誘導体、ファージミド等が挙げられる。したがって、本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、および上記ポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を提供する。概して、ベクターは、少なくとも1種の生物で機能的な複製起点、利便性のよい制限エンドヌクレアーゼ部位、および宿主細胞に関する選択マーカーを含有する。本発明によるベクターとしては、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、およびシーケンシングベクターが挙げられる。本発明による宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得、そして、単細胞生物、または多細胞生物の一部であり得る。

30

【0011】

本発明の組成物は、配列番号28、30～32、34、38、または40のアミノ酸配列、および／または相当する完全長もしくは成熟タンパク質を含むか、またはそれらからなる群から選択される単離ポリペプチドを含むが、これらに限定されないポリペプチドを含む。本発明のポリペプチドはまた、（a）配列番号27、29、33、37、または39に記載されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドのいずれか、または（b）ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で（a）のポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる、生物活性を有するポリペプチドを含む。生物活性または免疫学的活性を保持する、配列番号28、30～32、34、38、または40として列挙されるタンパク質配列およびそれらの実質的等価体のいずれかの生物学的または免疫学的に活性な変異体も意図される。本発明のポリペプチドは、全体的または部分的に化学的に合成してもよいが、好ましくは本発明の遺伝子操作細胞（例えば、宿主細胞）を用いた組換え手段により生産される。

40

【0012】

本発明はまた、本発明のポリペプチドを含む組成物を提供する。本発明の薬学的組成物は

50

、本発明のポリペプチド、および親水性（例えば、薬学的に許容可能な）キャリアのような許容可能なキャリアを含んでもよい。本発明はまた、所望のポリペプチドの発現を可能にする条件下で、適切な細胞培地中で本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの少なくとも断片を含有する発現ベクターを含む宿主細胞を培養することと、その培養物もしくは宿主細胞からタンパク質またはペプチドを精製することを含む、本発明のポリペプチドを生産する方法に関する。好ましい実施形態としては、かかるプロセスにより生産されるタンパク質がタンパク質の成熟形態である実施形態が挙げられる。

【0013】

本発明によるポリヌクレオチドには、分子生物学の技術分野の当業者に既知の様々な技法における多数の用途がある。これらの技法は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用、PCR用のオリゴマーまたはプライマーとしての使用、アレイにおける使用、コンピュータ可読媒体における使用、染色体および遺伝子マッピングのための使用、タンパク質の組換え生産における使用、およびアンチセンスDNAまたはRNA、それらの化学的類似体の生成における使用等を含む。例えば、mRNAの発現が特定の細胞または組織型に大きく制限される場合、本発明のポリヌクレオチドは、例えば *in situ* ハイブリダイゼーションを用いて試料中の特定の細胞または組織mRNAの存在を検出するためのハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。

【0014】

他の例示的实施形態では、ポリヌクレオチドは、発現遺伝子を同定するための発現配列タグ（EST）として、あるいは当該技術分野で既知であり、Vollrath et al., Science, 258:52-59 (1992) により例示されるように、ヒトゲノムのフィジカルマッピング用の発現配列タグとして、診断学において使用される。

【0015】

本発明によるポリペプチドは、他のタンパク質に一般に適用される様々な従来の手順および方法で 사용할 ことができる。例えば、本発明のポリペプチドは、このポリペプチドに特異的に結合する抗体を生成するのに使用することができる。かかる抗体、特にモノクローナル抗体は、組織中のポリペプチドを検出または定量化するのに有用である。本発明のポリペプチドはまた、分子量マーカーとして、また食品サプリメントとして使用することができる。

【0016】

治療上有効な量の、本発明のペプチドおよび薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物を、哺乳動物被験体に投与する工程を含む、本発明のポリペプチドの大量の発現／活性に関連した医療状態を防止、治療または回復する方法も提供される。

【0017】

特に、本発明の幹細胞成長因子様ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、胚幹細胞および成体幹細胞の分化を誘導して、種々の細胞型を生じるのに使用してもよい。それらはまた、白血病、血友病、およびアルツハイマー病のような変性疾患などの疾患の治療に使用してもよい。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドはさらに、移植組織を必要とする患者の助けとなり得る新たな組織および臓器を生成するのに利用してもよい。

【0018】

本発明の方法はまた、治療上有効な量の、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、および薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物を、上述の障害に関連した症状または傾向を示す哺乳動物被験体に投与することを含む、上述の障害の治療方法を提供する。さらに、本発明は、標的遺伝子産物の活性全体を調節する化合物および他の物質、ならびに薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物を投与する工程を含む、上述の疾患または障害の治療方法を含む。化合物および他の物質は、標的遺伝子／タンパク質発現または標的タンパク質活性のレベルに対するかかる調節を達成することができる。具体的には、治療上有効な量の、本発明のポリペプチドを含む組成物、または治療上有効な量の、本発明の幹細胞成長因子様ポリペプチドの結合パートナー（例えば、本発明の幹細胞成長因子様ポリペプチドに対して特異的に反応性を有する抗体）を含む組成物を、ヒトを含むが、これに

限定されない哺乳動物被験体に投与することを含む、ウイルス疾患を含む医療状態を防止、治療または回復する方法が提供される。特定の状態または病状の機構は、本発明のポリペプチドまたはこれらの結合パートナー（または阻害剤）が、治療を必要とする個体に有益であるかどうかに影響する。

【0019】

この方法によれば、本発明のポリペプチドは、*in vitro*または*in vivo*での細胞機能の阻害をもたらすために投与することができる。本発明のポリペプチドは、*in vivo*で、単独で、または他の療法に付随して、投与することができる。反対に、本発明のタンパク質または他の有効成分は、特定の作用物質の配合物中に含まれて、かかる作用物質の副作用を最低限に抑えてもよい。

10

【0020】

本発明はさらに、上述の方法において有用な薬剤を製造する方法を提供する。

【0021】

本発明はさらに、試料（例えば、組織または試料）中の本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの存在を検出する方法に関する。かかる方法は、例えば、上述の障害の予後および診断評価の一部として、またかかる状態に対する素因を示す被験体の特定のために利用することができる。

【0022】

本発明は、試料中の本発明のポリペプチドを検出する方法を提供し、試料は、本発明のポリペプチドに結合して、このポリペプチドとの複合体を形成する化合物と、複合体を形成するのに十分な条件下で、かつ十分な期間接触させ、この複合体の構造を検出し、もし複合体が形成される場合、本発明のポリペプチドが検出される。

20

【0023】

本発明はまた、本発明の方法を実施するための、ポリヌクレオチドプローブおよび／またはモノクローナル抗体、および任意には定量標準物質を含むキットを提供する。さらに、本発明は、上述の障害の治療のための臨床試験に関与した、薬剤の有効性を評価する方法、および患者の経過をモニタリングする方法を提供する。

【0024】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現あるいは活性を調節（例えば、増加または減少）する化合物の特定方法を提供する。かかる方法は、例えば、本明細書中に記載するような障害の症状を回復することができる化合物の特定のために利用することができる。かかる方法としては、本発明のポリペプチドと相互作用する（例えば、本発明のポリペプチドに結合する）化合物および他の物質を特定するためのアッセイを挙げることができるが、これに限定されない。

30

【0025】

本発明は、本発明のポリペプチドに結合する化合物を特定する方法を提供し、化合物は、本発明のポリペプチドと、ポリペプチド／化合物複合体を形成するのに十分な条件下で、かつ十分な期間接触させ、この複合体を検出し、もしポリペプチド／化合物複合体複合体が検出される場合、ポリヌクレオチドに結合する化合物が特定される。

【0026】

また、ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法が提供され、細胞において、化合物を、ポリヌクレオチドと、ポリペプチド／化合物複合体を形成するのに十分な期間接触させ（ここで、複合体は、細胞においてレポーター遺伝子配列の発現を駆動する）、レポーター遺伝子配列発現を検出することによりこの複合体を検出し、もしポリペプチド／化合物複合体が検出される場合、このポリペプチドに結合する化合物が特定される。

40

【0027】

[発明の詳細な説明]

配列番号28の幹細胞成長因子様ポリペプチドは、グリコシル化されていない予測される分子質量およそ59.2 kDaを有するおよそ529個のアミノ酸タンパク質である。BLASTPアルゴリズムを用いたタンパク質データベース検索 [A l t s c h u l S .

50

F. et al., J. Mol. Evol., 36:290-300 (1993)、および Altschul S. F. et al., J. Mol. Biol., 21:403-10 (1990)、参照により本明細書に援用される] は、配列番号 28 が、腫瘍内皮マーカー 7 前駆タンパク質に相同的であることを示す。

【0028】

図 2 は、幹細胞成長因子様ポリペプチド配列番号 28 によりコードされるタンパク質と、腫瘍内皮マーカー 7 前記タンパク質配列番号 36 [St. Croix et al., Science, 289:1197-1201] との間の BLASTX アミノ酸配列アライメントを示し、2つの配列が、441個のアミノ酸残基にわたって72%類似性、および同じ441個のアミノ酸残基にわたって57%同一性を共有することを示している。 10

【0029】

予測されるおよそ30残基のシグナルペプチドは、配列番号28のコードされたおよそ残基1～残基30である（シグナルペプチドは、配列番号30に記載される）。細胞外部分は、それ自体で有用である。これは、哺乳動物細胞での発現および切断産物のシーケンシングにより確認することができる。シグナルペプチド領域は、Neural Network SignalP V1.1プログラム[Nielsen et al, Int. J. Neur. Syst. 8:581 (1997)] (Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmarkから)、およびKyte/Doolittleアルゴリズム[Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157:105 (1982)]を用いた疎水性解析を用いて予測された。切断部位は、コンピュータプログラムにより予測されるのとは異なり得ることが当業者に理解されよう。配列番号31は、シグナルペプチドが配列番号28から除去される場合に生じるペプチドである。 20

【0030】

予測されるおよそ28残基の膜貫通領域は、配列番号28のコードされたおよそ残基452～残基479であり（膜貫通領域は、配列番号32に記載される）、それは、哺乳動物細胞における発現により確認され得る。膜貫通領域は、Neural Network SignalP V1.1プログラム[Nielsen et al, Int. J. Neur. Syst. 8:581 (1997)] (Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmarkから)、およびKyte/Doolittleアルゴリズム[Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157:105 (1982)]を用いた疎水性解析を用いて予測された。膜貫通領域は、コンピュータプログラムにより予測されるのとは異なり得ることが当業者に理解されよう。 30

【0031】

配列番号25の幹細胞成長因子様ポリペプチド（配列番号23と同一）は、グリコシル化されていない予測される分子質量およそ50kDaを有するおよそ392個のアミノ酸タンパク質である。BLASTPアルゴリズムを用いたタンパク質データベース検索[Altschul S. F. et al., J. Mol. Evol., 36:290-300 (1993)、および Altschul S. F. et al., J. Mol. Biol., 21:403-10 (1990)、参照により本明細書に援用される] は、配列番号25が、腫瘍内皮マーカー 7 前駆タンパク質に相同的であることを示す。 40

【0032】

予測されるおよそ28残基の膜貫通領域は、配列番号25のコードされたおよそ残基315～残基342である（配列番号32）。それは、哺乳動物細胞における発現により確認され得る。膜貫通領域は、Neural Network SignalP V1.1プログラム[Nielsen et al, Int. J. Neur. Syst. 8:581 (1997)] (Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denm 50

arkから)、およびK y t e / D o o l i t t l eアルゴリズム [K y t e a n d D o o l i t t l e, J. M o l. B i o l., 157:105 (1982)]を用いた疎水性解析を用いて予測された。膜貫通領域は、コンピュータプログラムにより予測されるのとは異なり得ることが当業者に理解されよう。

【0033】

特に、本発明の幹細胞成長因子様ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、胚幹細胞および成体幹細胞の分化を誘導して、種々の細胞型を生じるのに使用してもよい。それらはまた、白血病、血友病、およびアルツハイマー病のような変性疾患の治療に使用してもよい。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドはさらに、移植組織を必要とする患者の助けとなり得る新たな組織および臓器を生成するのに利用してもよい。

10

【0034】

4. 1 定義

本明細書中および併記の特許請求の範囲で使用される場合、単数形は、文脈が明らかに別に指示しない限り、複数の言及を含む。

【0035】

「活性」という用語は、任意の天然に存在するポリペプチドの生物活性および／または免疫学的活性を保持するポリペプチドの形態を指す。本発明によれば、「生物学的に活性な」または「生物活性」という用語は、天然に存在する分子の構造的機能、調節機能もしくは生化学的機能を有するタンパク質またはペプチドを指す。同様に、「生物学的に活性な」または「生物活性」はまた、天然、組換えまたは合成幹細胞成長因子様ペプチド、あるいはそれらの任意のペプチドの、適切な動物または細胞において特定の生物学的応答を誘導し、特定の抗体と結合する能力を指す。「幹細胞成長因子様生物活性」という用語は、本明細書中に記載するような幹細胞成長因子様の生物活性に類似した生物活性を指す。

20

【0036】

本明細書で使用する場合「活性化細胞」という用語は、正常プロセスまたは疾患プロセスの一部として、分泌分子または酵素分子の搬出を含む、細胞外または細胞内膜輸送に携わる細胞を指す。

【0037】

「相補的」または「相補性」という用語は、塩基対形成によるポリヌクレオチドの天然結合（すなわち、ハイブリダイゼーション）を指す。例えば、配列5'-A G T-3'は、相補配列3'-T C A-5'に結合する。2つの一本鎖分子間の相補性は、幾つかの核酸のみが結合するような「部分的」であってもよく、あるいは、相補性は、全相補性が一本鎖分子間に存在するような「完全な」ものであってもよい。核酸鎖間の相補性の度合いは、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に有意な影響を及ぼす。

30

【0038】

「胚幹細胞（E S）」という用語は、生殖細胞を含む、胚または成体において多くの分化した細胞型を生じることができる細胞を指す。「生殖細胞系幹細胞（G S C）」という用語は、配偶子の産生用の生殖細胞の安定かつ連続した供給源を提供する始原幹細胞由来の幹細胞を指す。「始原幹細胞（P G C）」という用語は、生殖細胞および他の細胞に分化する潜在能力を有する、特に胚形成中の卵黄嚢、腸間膜、または生殖隆起に由来する他の細胞系譜から除外された細胞の小集団を指す。P G Cは、G S CおよびE S細胞が由来する供給源である。P G C、G S C、およびE S細胞は、自己複製が可能である。したがって、これらの細胞は、生殖細胞系を集合させ、成体の分化した臓器を含む複数の最終的に分化した細胞を生じるだけでなく、それ自体再生することが可能である。「全能性」という用語は、成体生物の細胞型のすべてに分化する、細胞の能力を指す。「多能性」という用語は、成体生物中に存在する多数の分化細胞型に分化する、細胞の能力を指す。多能性細胞は、全能性細胞と比較して、その分化能が制限されている。

40

【0039】

「発現調整断片」、すなわちE M Fという用語は、作動可能に連結されたオープンリーディングフレーム（O R F）または別のE M Fの発現を調整する一連のヌクレオチドを意味

50

する。

【0040】

本明細書中で使用する場合、配列の発現がEMFの存在により変更される場合、配列は、「作動可能に連結された配列の発現を調整する」と言われる。EMFとしては、プロモーター、およびプロモーター調節配列（誘導要素）が挙げられるが、これらに限定されない。EMFの1つの種類は、特定の調節因子または生理学的事象に応答して、作動可能に連結されたORFの発現を誘導する核酸断片である。

【0041】

「ヌクレオチド配列」または「核酸」または「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」という用語は、交換可能に使用され、ヌクレオチドのヘテロポリマーまたはこれらのヌクレオチドの配列を指す。これらの語句はまた、一本鎖であっても、もしくは二本鎖であってもよく、またセンスもしくはアンチセンス鎖を表し得るゲノムまたは合成起源のDNAあるいはRNA、ペプチド核酸（PNA）、あるいは任意のDNA様またはRNA用物質を指す。配列では、Aはアデニンであり、Cはシトシンであり、Gはグアニンであり、Tはチミンである一方で、Nは、A、T、G、またはCである。ポリヌクレオチドがRNAである場合、本明細書中の配列中のT（チミン）は、U（ウラシル）で置き換えてもよいことが意図される。一般に、本発明により提供される核酸セグメントは、微生物もしくはウイルスオペロン、または真核生物遺伝子に由来する調節要素を含む組換え転写ユニットにおいて発現されることが可能な合成核酸を提供するために、ゲノムの断片および短いオリゴヌクレオチドリンカーから、あるいは一連のオリゴヌクレオチドから、または個々のヌクレオチドから構築されてもよい。

【0042】

「オリゴヌクレオチド断片」または「ポリヌクレオチド断片」、「一部」、または「セグメント」または「プローブ」または「プライマー」という用語は、交換可能に使用され、少なくとも約5個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約7個のヌクレオチド、さらに好ましくは少なくとも約9個のヌクレオチド、よりいっそう好ましくは少なくとも約11個のヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも約17個のヌクレオチドであるヌクレオチド残基を有する配列を指す。断片は、好ましくは約500個未満のヌクレオチド、好ましくは約200個未満のヌクレオチド、より好ましくは約100個未満のヌクレオチド、さらに好ましくは約50個未満のヌクレオチド、最も好ましくは約30個未満のヌクレオチドである。好ましくは、プローブは、約6個のヌクレオチド～約200個のヌクレオチド、好ましくは約15個～約50個のヌクレオチド、より好ましくは約17個～30個のヌクレオチド、最も好ましくは約20個～約25個のヌクレオチドである。好ましくは、断片は、mRNAもしくはDNA分子の同一または関連部分を同定あるいは増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、様々なハイブリダイゼーション手順、あるいはマイクロアレイ手順で使用することができる。断片またはセグメントは、本発明の各ポリヌクレオチド配列を一意的に特定し得る。好ましくは、断片は、配列番号27、29、22、37、または39の一部に実質的に類似している配列を含む。

【0043】

プローブは、例えばWalsh等 [Walsh, P. S. et al., PCR Methods Appl 1: 241-250 (1992)] に記載されるように、特定RNAもしくはmRNA分子が、細胞または組織に存在しているかどうかを確定するのに、あるいは染色体DNAから同様の核酸配列を単離するのに使用することができる。プローブは、ニックトランスレーション、クレノウフィルイン反応、PCR、または当該技術分野で既知の他の方法より標識してもよい。本発明のプローブ、それらの調製および／または標識は、Sambrook, J. et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY、またはAusubel, F. M. et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY（ともにそれら

の全体が、参照により本明細書に援用される)に詳述されている。

【0044】

本発明の核酸配列はまた、配列番号27、29、33、37、または39の核酸配列のいずれかからの配列情報を含む。配列情報は、配列番号27、29、33、37、または39の配列情報を一意的に特定するか、または配列番号27、29、33、37、または39のセグメントであり得る。20量体がヒトゲノムにおいて完全に適合される確率は、 $1/300$ であるため、1つのかかるセグメントは、20量体核酸配列であり得る。ヒトゲノムでは、染色体一組中に30億の塩基対が存在する。 4^{20} 個の考え得る20量体が存在するため、一組のヒト染色体に塩基対が存在するよりも、300倍多い20量体が存在する。同じ分析を使用すると、ヒトゲノムにおいて完全に適合されるべき17量体に関する確率は、約 $1/5$ である。これらのセグメントを発現研究用のアレイで使用する場合、15量体セグメントを使用することができる。発現される配列が全ゲノム配列のおよそ5%未満を含むことから、15量体が発現される配列において完全に適合される確率もまたおよそ $1/5$ である。

10

【0045】

同様に、一個のミスマッチの検出に関する配列情報を使用する場合、セグメントは25量体であり得る。一個のミスマッチを有する25量体がヒトゲノムに現れる確率は、完全マッチに関する確率($1/4^{25}$)と各ヌクレオチド位置でのミスマッチに関する増加した確率(3×25)を乗算することにより算出される。一個のミスマッチを有する18量体を発現研究用のアレイで検出することができる確率は、およそ $1/5$ である。一個のミスマッチを有する20量体がヒトゲノムで検出することができる確率は、およそ $1/5$ である。

20

【0046】

「オープンリーディングフレーム」、すなわちORFという用語は、1つの終止コドンを含むアミノ酸をコードする一連のヌクレオチドトリプレットを意味し、タンパク質に翻訳が可能な配列である。

【0047】

「作動可能に連結される」または「作動可能に結合される」という用語は、機能的に関連した核酸配列を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写を制御する場合、プロモーターは、コード配列と作動可能に結合されるか、または作動可能に連結される。作動可能に連結される核酸は連続的であり、同じリーディングフレームにあり得え、ある一定の遺伝子要素(例えば、リプレッサー遺伝子)は、コード配列に連続的に連結されないが、コード配列の転写/翻訳を依然として制御する。

30

【0048】

「多能性」という用語は、成体生物に存在する多数の分化した細胞型に分化する、細胞の能力を指す。多能性細胞は、全能性細胞と比較して、その分化能力において制限される。

【0049】

「ポリペプチド」または「ペプチド」または「アミノ酸配列」という用語は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列もしくはそれらの断片を指し、天然に存在する分子または合成分子を指す。ポリペプチド「断片」、「一部」、または「セグメント」は、少なくとも約5個のアミノ酸、好ましくは少なくとも約7個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも約9個のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも17個またはそれ以上のアミノ酸を有する一続きのアミノ酸残基である。ペプチドは好ましくは、約200個以下のアミノ酸、より好ましくは約150個未満のアミノ酸、最も好ましくは約100個未満のアミノ酸である。好ましくはペプチドは、約5個～約200個のアミノ酸である。活性であるために、いかなるポリペプチドも、生物学的および/または免疫学的活性を示すのに十分な長さを有さなくてはならない。

40

【0050】

「天然に存在するポリペプチド」という用語は、遺伝子操作されていない細胞により産生されるポリペプチドを指し、具体的にアセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン

50

酸化、脂質付加、およびアシル化を含むが、これらに限定されないポリペプチドの翻訳後修飾から生じる様々なポリペプチドを意図する。

【0051】

「翻訳タンパク質コード部分」という用語は、任意のリーダー配列またはプロセシング配列を含み得る完全長タンパク質をコードする配列を意味する。

【0052】

「成熟タンパク質コード配列」という用語は、任意のリーダー／シグナル配列のないペプチドまたはタンパク質をコードする配列を指す。「成熟タンパク質部分」は、リーダー／シグナル配列のないタンパク質の一部を指す。ペプチドは、細胞におけるプロセシング中に除去されるリーダー配列を有してもよく、あるいはタンパク質は、合成的に、あるいは成熟コード配列のみをコードするポリヌクレオチドを用いて産生してもよい。成熟タンパク質部分は、開始メチオニン残基を含んでも含まなくてもよいことが意図される。開始メチオニンは、多くの場合、ペプチドのプロセシング中に除去される。

10

【0053】

「誘導体」という用語は、ヒトタンパク質では通常起こらない、ユビキチン化、標識（例えば、放射性核種または様々な酵素を用いて）、ペグ化（ポリエチレングリコールによる誘導体化）のような共有結合的ポリマー結合、およびオルニチンのようなアミノ酸の化学合成による挿入または置換のような技法により化学的に修飾されたポリペプチドを指す。

【0054】

「変異体」（または「類似体」）という用語は、例えば組換えDNA技法を用いて創出される、アミノ酸挿入、欠失、および置換において、天然に存在するポリペプチドと異なる任意のポリペプチドを指す。所定の活性を損なうことなくどのアミノ酸残基が置換、付加、または欠失され得るかを決定する方法は、特定のポリペプチドの配列を相同ペプチドの配列と比較して、高い相同性の領域に生じたアミノ酸変化の数を最小限に抑えることによって、あるいはアミノ酸をコンセンサス配列で置換することによって見出され得る。

20

【0055】

あるいは、これらの同じポリペプチドまたは類似のポリペプチドをコードする組換え変異体は、遺伝暗号における「重複性」を利用することにより合成または選択され得る。様々な制限部位を生じるサイレント変更のような様々なコドン置換は、プラスミドもしくはウイルスベクターへのクローニングまたは特定の原核生物系または真核生物系における発現を最適化するように導入され得る。ポリヌクレオチド配列における突然変異は、リガンド結合親和性、鎖間親和性、または分解／代謝回転率のような特性を変更するために、ポリペプチド、あるいはポリペプチドの任意の一部の特性を修飾するようにポリペプチドに付加される他のペプチドを有するドメインにおいて反映され得る。

30

【0056】

好ましくは、アミノ酸「置換」は、あるアミノ酸を、同様の構造特性および／または化学特性を有する別のアミノ酸で置き換えることの結果、すなわち、保存的アミノ酸置換である。「保存的」アミノ酸置換は、含まれる残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および／または両親媒性の類似性に基づいてなされ得る。例えば、無極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが挙げられ、中性な極性アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが挙げられ、正に帯電した（塩基性）アミノ酸としては、アルギン、リシン、およびヒスチジンが挙げられ、負に帯電した（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、およびグルタミン酸が挙げられる。「挿入」または「欠失」は、好ましくは、約1個～20個のアミノ酸、より好ましくは1個～10個のアミノ酸の範囲である。可能な変動は、組換えDNA技法を用いてポリペプチド分子においてアミノ酸の挿入、欠失、または置換を系統だって作製し、得られた組換え変異体を活性に関してアッセイすることにより実験的に確定され得る。

40

【0057】

50

あるいは、機能の変更が望ましい場合、挿入、欠失または非保存的変更を、変更ポリペプチドを産生するように操作することができる。かかる変更は、例えば、本発明のポリペプチドの1つまたはそれより多い生物学的機能または生化学的特性を変更することができる。例えば、かかる変更は、リガンド結合親和性、鎖間親和性、または分解／代謝回転率のようなポリペプチド特性を変更し得る。さらに、かかる変更は、発現に関して選ばれた宿主細胞における発現、スケールアップ等により良好に適合されるポリペプチドを生成するように選定することができる。例えば、システイン残基は、ジスルフィド架橋を排除するために、欠失され得るか、または別のアミノ酸残基で置換され得る。

【0058】

本明細書中で使用する場合「精製」または「実質的に精製」という用語は、示した核酸またはポリペプチドが、他の生物学的高分子、例えばポリヌクレオチド、タンパク質等の実質的に非存在下で存在することを表す。一実施形態では、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、存在する示した生物学的高分子の少なくとも95重量%、より好ましくは少なくとも99重量%を構成するように精製される（が、水、緩衝液、および他の小分子、特に100ダルトン未満の分子量を有する分子は存在することができる）。

10

【0059】

本明細書中で使用する場合「単離」という用語は、その天然源中の核酸またはポリペプチドとともに存在する少なくとも1種の他の構成成分（例えば、核酸またはポリペプチド）から分離された核酸またはポリペプチドを指す。一実施形態では、核酸またはポリペプチドは、（あるとしたら）溶媒、緩衝液、イオン、あるいは核酸またはポリペプチド溶液中に通常存在する他の構成成分のみの存在下で見出される。「単離」および「精製」という用語は、それらの天然源中に存在する核酸またはポリペプチドを含まない。

20

【0060】

ポリペプチドまたはタンパク質を指すのに本明細書中で使用する場合の「組換え」という用語は、ポリペプチドまたはタンパク質が組換え（例えば、微生物、昆虫、または哺乳動物）発現系に由来することを意味する。「微生物」とは、細菌または真菌（例えば、酵母）発現系で作製される組換えポリペプチドまたはタンパク質を指す。産物として、「組換え微生物」は、自然内因性物質を本質的に含まず、かつ関連自然グリコシル化を伴わないポリペプチドまたはタンパク質を定義する。たいていの細菌培養物、例えば大腸菌で発現されるポリペプチドまたはタンパク質は、グリコシル化修飾を受けず、酵母で発現されるポリペプチドまたはタンパク質は、哺乳動物細胞で発現されるものとは概して異なるグリコシル化パターンを有する。

30

【0061】

「組換え発現媒体またはベクター」という用語は、DNA（RNA）配列からポリペプチドを発現するための、プラスミドまたはファージまたはウイルスまたはベクターを指す。発現媒体は、（1）遺伝子発現において調節の役割を有する遺伝子要素（単数または複数）（例えば、プロモーター、またはエンハンサー）、（2）mRNAに転写され、タンパク質に翻訳される構造またはコード配列、および（3）適切な転写開始および終止配列の構築を含む転写ユニットを含むことができる。酵母または真核生物発現系での使用を意図される構造ユニットは、好ましくは宿主細胞による翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。あるいは、組換えタンパク質がリーダーまたは輸送配列なしで発現される場合、それは、アミノ末端メチオニン残基を有してもよい。この残基は、続いて発現組換えタンパク質から切断されても切断されなくてもよく、最終産物を提供する。

40

【0062】

「組換え発現系」という用語は、染色体DNAに組換え転写ユニットを安定に組み込んだ宿主細胞、あるいは染色体外に組換え転写ユニットを運搬する宿主細胞を意味する。本明細書中で定義される組換え発現系は、発現されるDNAセグメントまたは合成遺伝子に連結される調節要素を誘導する際に、異種ポリペプチドまたはタンパク質を発現する。この用語はまた、遺伝子発現において調節の役割を有する組換え遺伝子要素（単数または複数

50

）（例えば、プロモーター、またはエンハンサー）を安定に組み込んだ宿主細胞を意味する。本明細書中で定義される組換え発現系は、発現される内因性DNAセグメントまたは遺伝子に連結される調節要素を誘導する際に、細胞にとって内因性のポリペプチドまたはタンパク質を発現する。細胞は、原核生物性または真核細胞性であり得る。

【0063】

「分泌」という用語は、タンパク質が適切な宿主細胞に発現されると、そのアミノ酸配列中のシグナル配列の結果としての輸送を含む、膜を通して、あるいは膜により輸送されるタンパク質を含む。「分泌」タンパク質としては、それらが発現される細胞から、完全に（例えば、可溶性タンパク質）または部分的に（例えば受容体）分泌されたタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。「分泌タンパク質」としてはまた、小胞体の膜を通して輸送されるタンパク質が挙げられるが、これに限定されない。「分泌」タンパク質はまた、非典型的シグナル配列を含有するタンパク質（例えば、インターロイキン-1 β 、Kransney, P. A. and Young, P. R., Cytokine, 4(2): 134-143 (1992)を参照）、および損傷細胞から放出される因子（例えば、インターロイキン-1受容体アンタゴニスト、Arend, W. P., et al., Annu. Rev. Immunol., 16: 27-55 (1998)を参照）を含むことが意図される。

10

【0064】

望ましい場合、発現ベクターは、細胞の膜によりポリペプチドを誘導する「シグナルまたはリーダー配列」を含有するように設計してもよい。かかる配列は、本発明のポリペプチド上に天然に存在してもよく、あるいは組換えDNA技法により異種タンパク質源から提供されてもよい。

20

【0065】

「ストリンジェントな」という用語は、ストリンジェントとして当該技術分野で一般に認識される条件を指すのに使用される。ストリンジェントな条件は、高ストリンジェント条件（すなわち65℃での0.5M NaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、1mM EDTAにおけるフィルター結合DNAへのハイブリダイゼーション、および68℃での0.1 $\times$ SSC/0.1%SDSにおける洗浄）、および中ストリンジェント条件（すなわち、42℃での0.2 $\times$ SSC/0.1%SDSにおける洗浄）を含むことができる。他の例示的ハイブリダイゼーション条件は、本明細書中の実施例中に記載されている。

30

【0066】

デオキシオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの例では、さらなる具体例としてのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、37℃（14塩基オリゴヌクレオチドに関して）、48℃（17塩基オリゴヌクレオチドに関して）、55℃（20塩基オリゴヌクレオチドに関して）、および60℃（23塩基オリゴヌクレオチドに関して）での6 $\times$ SSC/0.05%ピロリン酸ナトリウムにおける洗浄が挙げられる。

【0067】

本明細書で使用する場合、「実質的に等価」は、1つまたはそれより多い置換、欠失または付加（これらの正味の効果は、参照配列と対象配列との間に不都合な機能的相違点を生じない）により参照配列と異なるヌクレオチドおよびアミノ酸配列の両方、例えば突然変異配列を指すことができる。通常、かかる実質的に等価な配列は、約35%以下だけ本明細書中に列挙した配列の1つと異なる（すなわち、相当する参照配列と比較した場合の実質的に等価な配列中の個々の残基の置換、付加および／または欠失の数を、実質的に等価な配列中の全残基数で除算すると、約0.35以下である）。かかる配列は、列挙した配列に65%配列同一性を有すると言われる。一実施形態では、本発明の実質的に等価な（例えば、突然変異）配列は、30%以下だけ列挙した配列と異なり（70%の配列同一性）、この実施形態の変形では、25%以下だけ列挙した配列と異なり（75%の配列同一性）、この実施形態のさらなる変形では、20%以下だけ列挙した配列と異なり（80%の配列同一性）、この実施形態のさらなる変形では、10%以下だけ列挙した配列と異な

40

50

り（９０％の配列同一性）、この実施形態のさらなる変形では、５％以下だけ列挙した配列と異なる（９５％の配列同一性）。本発明による実質的に等価な（例えば、突然変異）アミノ酸配列は、好ましくは、列挙したアミノ酸配列と少なくとも８０％配列同一性、より好ましくは少なくとも９０％配列同一性を有する。本発明の実質的に等価なヌクレオチド配列は、例えば、遺伝暗号の重複性または縮重を考慮して低い％配列同一性を有することができる。好ましくは、ヌクレオチド配列は、少なくとも約６５％同一性、より好ましくは少なくとも約７５％同一性、最も好ましくは少なくとも約９５％同一性を有する。本発明の目的で、実質的に等価な生物活性および実質的に等価な発現特性を有する配列は、実質的に等価であるとみなされる。等価性を決定する目的で、成熟配列の切断型（例えば、擬似終止コドン）を創出する突然変異により）を無視すべきである。配列同一性は、例えば J o t u n H e i n 法 [H e i n , J . , M e t h o d s E n z y m o l . , 1 8 3 : 6 2 6 - 6 4 5 (1 9 9 0)] を用いて決定され得る。配列間の同一性はまた、当該技術分野で既知の他の方法により、例えばハイブリダイゼーション条件を変化させることで、測定することもできる。

【００６８】

「全能性」という用語は、成体生物の細胞型のすべてに分化する、細胞の能力を指す。

【００６９】

「形質転換」という用語は、適切な宿主細胞にＤＮＡを導入しその結果ＤＮＡは、染色体外要素として、あるいは染色体組込みにより複製可能であることを意味する。「トランスフェクション」という用語は、任意のコード配列が実際に発現されるか否かに関わらず、適切な宿主細胞による発現ベクターの取り込みを指す。「感染」という用語は、ウイルスまたはウイルスベクターを用いて、適切な宿主細胞に核酸を導入することを指す。

【００７０】

本明細書で使用する場合、「取り込み調整断片」、すなわちＵＭＦは、連結ＤＮＡ断片を細胞に取り込むことを媒介する一連のヌクレオチドを意味する。ＵＭＦは、以下に記載のコンピュータベースシステムにより、標的配列または標的モチーフとして既知のＵＭＦを用いて容易に同定することができる。ＵＭＦの存在および活性は、疑わしいＵＭＦをマーカー配列に結合することで確認することができる。次に、得られた核酸分子を、適切な条件下で、適切な宿主とともにインキュベートして、マーカー配列の取り込みを決定する。上述するように、ＵＭＦは、連結マーカー配列の取り込み頻度を増加する。

【００７１】

上記用語はそれぞれ、文脈が別の状況を指示しない限り、それぞれに関して記載されるすべてを含むことが意図される。

【００７２】

４．２ 本発明の核酸

本発明は、新規幹細胞成長因子様ポリペプチド、幹細胞成長因子様ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびに癌および他の免疫学的障害の診断、治療または防止のための、これらの組成物の使用に基づいている。

【００７３】

本発明の単離されたポリヌクレオチドとしては、配列番号２７、２９、３３、３７、または３９のヌクレオチド配列のいずれかを含むポリヌクレオチド、それらの断片、それらの完全長タンパク質コード配列を含むポリヌクレオチド（例えば、配列番号２８、３８、または４０をコードするもの）、およびポリヌクレオチドの成熟タンパク質コード配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。本発明のポリヌクレオチドとしてはまた、（ａ）配列番号２７、２９、３３、３７、または３９のヌクレオチド配列のいずれかの相補体、（ｂ）配列番号２３、２５、２８、３０～３２、３４、３５、３８、または４２のポリペプチドのいずれか１つをコードするポリヌクレオチド、（ｃ）上述した任意のポリヌクレオチドの対立遺伝子変異体であるポリヌクレオチド、（ｄ）上述したタンパク質のいずれかの種相同体をコードするポリヌクレオチド、または（ｅ）配列番号２３、２５、２８、３０～３２、３４、３５、３８、ま

たは40のポリペプチドの特定ドメインまたは切断型を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。所定のドメインは、コードされたポリペプチドの性質に依存してもよく、例えば、受容体様ポリペプチド中のドメインは、リガンド結合、細胞外、膜貫通または細胞質ドメイン、あるいはそれらの組合せを含み、免疫グロブリン様タンパク質中のドメインは、可変免疫グロブリン様ドメインを含み、酵素様ポリペプチド中のドメインは、触媒結合ドメインおよび基質結合ドメインを含み、リガンドポリペプチド中のドメインは、受容体結合ドメインを含む。

【0074】

本発明のポリヌクレオチドは、天然に存在するか、あるいは全体的または部分的合成のDNA（例えば、cDNA、およびゲノムDNA）およびRNA（例えば、mRNA）を含む。ポリヌクレオチドは、cDNAのコード領域すべてを含んでもよく、あるいはcDNAのコード領域の一部に相当してもよい。

【0075】

本発明はまた、本明細書中に開示するcDNA配列に相当する遺伝子を提供する。相当する遺伝子は、本明細書中に開示する配列情報を用いて、既知の方法に従って単離することができる。かかる方法は、適切なゲノムライブラリーおよび他のゲノム物質源における遺伝子の特定および／または増幅のための開示した配列情報からのプローブまたはプライマーの調製を含む。さらに、5'および3'配列は、当該技術分野で既知の方法を用いて得ることができる。例えば、配列番号27、29、33、37、または39のポリヌクレオチドいずれかに相当する完全長cDNAあるいはゲノムDNAは、プローブとして、配列番号27、29、33、37、または39のポリヌクレオチドのいずれか、またはそれらの一部を用いて、適切なハイブリダイゼーション条件下で、適切なcDNAまたはゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることで得ることができる。あるいは、配列番号27、29、33、37、または39のポリヌクレオチドは、適切なゲノムDNAまたはcDNAライブラリーにおける遺伝子の特定および／または増幅を可能にする適切なプライマー（複数可）のための基礎として使用してもよい。

【0076】

本発明の核酸配列は、EST、およびdbEST、gbpriおよびUniGeneのような1つまたはそれより多い公的データベースから得られる配列（cDNAおよびゲノム配列を含む）から構築することができる。EST配列は、完全長遺伝子に関する配列情報、代表的断片またはセグメント情報、あるいは新規セグメント情報を特定することを提供することができる。

【0077】

本発明のポリヌクレオチドはまた、上述したポリヌクレオチドに実質的に等価なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明によるポリヌクレオチドは、例えば、上述したポリヌクレオチドに、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または89%、より典型的には少なくとも約90%、91%、92%、93%、または94%、さらに典型的には少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%配列同一性を有することができる。

【0078】

配列番号27、29、33、37、または39のヌクレオチド配列のいずれか、あるいはそれらの相補体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列断片は、本発明の核酸配列の範囲内に含まれ、その断片は、約5個を超えるヌクレオチド、好ましくは7個のヌクレオチド、より好ましくは9個を超えるヌクレオチド、最も好ましくは17個を超えるヌクレオチドである。本発明のポリヌクレオチドのいずれか1つに選択的な（すなわち本発明のポリヌクレオチドにいずれか1つに特異的にハイブリダイズする）、例えば15個、17個、もしくは20個またはそれ以上の断片が意図される。ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることが可能なプローブは、同じファミリーの遺伝子に

において、本発明のポリヌクレオチド配列と他のポリヌクレオチド配列とを識別することができるか、あるいはヒト遺伝子と他の種の遺伝子を識別することができ、好ましくは特有のヌクレオチド配列に基づいている。

【0079】

本発明の範囲内にある配列は、これらの特定の配列に限定されず、それらの対立遺伝子変異体および種変異体も含む。対立遺伝子変異および種変異は、配列番号27、29、33、37、または39で提供される配列、それらの代表的断片、または配列番号27、29、33、37、または39に少なくとも90%同一、好ましくは95%同一のヌクレオチド配列を、同種の別の単離体由来の配列と比較することで、ルーチンで決定することができる。さらに、コドン可変性を配慮して、本発明は、本明細書中に開示する特定のORFと同じアミノ酸配列をコードする核酸分子を含む。換言すると、ORFのコード領域において、あるコドンを、同じアミノ酸をコードする別のコドンで置換することが明らかに意図される。

10

【0080】

配列番号27、29、33、37、または39を含む本発明の核酸に関する最も近く隣接する結果は、アルゴリズムまたはプログラムを用いて、データベースを検索することで得ることができる。好ましくは、Basic Local Alignment Search Toolを意味するBLASTが、局所配列アラインメントに関して検索するのに使用される[Altschul, S. F., J Mol. Evol., 36:290-300 (1993)、およびAltschul S. F. et al., J. Mol. Biol., 21:403-410 (1990)]。

20

【0081】

開示したポリヌクレオチドおよびタンパク質の種相同体（すなわちオルソログ）もまた、本発明により提供される。種相同体は、本明細書に提供した配列から適切なプローブまたはプライマーを作製し、所望の種からの適切な核酸源をスクリーニングすることにより、単離および同定され得る。

【0082】

本発明は、開示したポリヌクレオチドまたはタンパク質の対立遺伝子変異体、すなわちポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質に、同一であるか、相同的であるか、または関連しているタンパク質を同様にコードする、天然に存在するオルタナティブ形態の単離ポリヌクレオチドを含む。

30

【0083】

本発明の核酸はさらに、記載の核酸の変異体をコードする配列に関する。これらのアミノ酸配列変異体は、自然または変異ポリヌクレオチドに、適切なヌクレオチド変化を導入することで、当該技術分野で既知の方法により調製され得る。アミノ酸配列変異体の構築物には2つの変数：変異の位置および変異の性質が存在する。アミノ酸配列変異体をコードする核酸は好ましくは、自然状態では生じないアミノ酸配列をコードするようにポリヌクレオチドを変異させることで構築される。これらの核酸変更は、異なる種の核酸が異なる部位（可変位置）で、あるいは高度に保存された領域（定常領域）において作製することができる。かかる位置での部位は通常、例えばまず保存的選択（例えば、異なる疎水性アミノ酸に対して疎水性アミノ酸）で、次により離れた選択（例えば、帯電アミノ酸に対して疎水性アミノ酸）で置換することにより連続して修飾され、続いて欠失または挿入が、標的部位でなされてもよい。アミノ酸配列欠失は一般に、1～30残基、好ましくは1～10残基の範囲であり、通常連続している。アミノ酸挿入は、1～100個またはそれより多い残基の長さの範囲のアミノおよび／またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数アミノ酸残基の配列内挿入を含む。配列内挿入は一般に、約1～10アミノ残基、好ましくは1～5残基の範囲であり得る。末端挿入の例としては、異なる宿主細胞での分泌または細胞内ターゲティングに必要な異種シグナル配列、および発現されるタンパク質を精製するのに有用なFLAGまたはポリヒスチジン配列のような配列が挙げられる。

40

。

50

【0084】

好ましい方法では、新規アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、部位特異的突然変異により変更される。この方法は、所望のアミノ酸変異体をコードするようにポリヌクレオチドを変更するためのオリゴヌクレオチド配列、ならびに変更した部位の両側に安定な二重鎖を形成するために、変更するアミノ酸の両側に十分に隣接したヌクレオチドを使用する。概して、部位特異的突然変異の技法は、当業者に既知であり、この技法は、Edelman et al., DNA 2:183 (1983) のような刊行物により例証される。ポリヌクレオチド配列において部位特異的変化をもたらす用途の広くかつ効果的な方法は、Zoller and Smith, Nucleic Acids Res., 10:6487-6500 (1982) により公開された。また、新規核酸のアミノ酸配列変異体を創出するのに、PCRを使用してもよい。少量の鋳型DNAを出発原料として使用する場合、鋳型DNAの相当する領域と配列とがわずかに異なるプライマー（複数可）は、所望のアミノ酸変異体を生成することができる。PCR増幅は、プライマーにより特定される位置にあるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド鋳型と異なる産物DNA断片の集団を生じる。産物DNA断片は、プラスミド中の相当する領域を置き換え、これらにより所望のアミノ酸変異体をコードするポリヌクレオチドが得られる。

10

【0085】

アミノ酸変異体を生成するさらなる技法は、Wells et al., Gene, 34:315 (1985) に記載されるカセット変異導入技法、ならびに例えば上述の Sambrook等、およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al.における技法のような当該技術分野で既知の他の変異導入技法である。遺伝暗号の固有の縮重性により、実質的に同じであるか、または機能的に等価なアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を、これらの新規核酸のクローニングおよび発現のための本発明の実施に使用してもよい。かかるDNA配列としては、ストリンジェントな条件下で、適切な新規核酸配列にハイブリダイズすることが可能なものが挙げられる。

20

【0086】

本発明の好ましいポリヌクレオチド切断型をコードするポリヌクレオチドを使用して、本発明の1つまたはそれより多いドメイン、および異種タンパク質配列を含むキメラまたは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを生成することができる。

30

【0087】

本発明のポリヌクレオチドはさらに、上述したポリヌクレオチドのいずれかの相補体を含む。ポリヌクレオチドは、DNA（ゲノムDNA、cDNA、増幅DNA、または合成DNA）、またはRNAであり得る。かかるポリヌクレオチドを得るための方法およびアルゴリズムは、当業者に既知であり、例えば所望の配列同一性を有するポリヌクレオチドをルーチンで単離することができるハイブリダイゼーション条件を決定する方法を挙げることができる。

【0088】

本発明によれば、配列番号28、30～32、34、34、38、または40のいずれか1つ、あるいはそれらの機能的等価体をコードする成熟タンパク質コード配列を含むポリヌクレオチド配列を使用して、適切な宿主細胞において、当該核酸またはその機能的等価体の発現を誘導する組換えDNA分子を生成してもよい。本発明で同定されるクローンのいずれかのcDNA挿入物も含まれる。

40

【0089】

本発明によるポリヌクレオチドは、十分確立された組換えDNA技法により様々な他のヌクレオチド配列のいずれかに連結することができる [Sambrook J et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NYを参照]。ポリヌクレオチドに連結するのに有用なヌクレオチド配列としては、当該技術分野で既知の各種ベクター（例えば、プラスミド、コスミド、λファージ誘導體、ファージミド等

50

）が挙げられる。したがって、本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターおよびポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を提供する。一般に、ベクターは、少なくとも1種の生物において機能的な複製起点、利便性のよい制限エンドヌクレアーゼ部位、および宿主細胞に関する選択マーカーを含有する。本発明によるベクターとしては、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、およびシーケンシングベクターが挙げられる。本発明による宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。本発明の宿主細胞は、単細胞生物、または多細胞生物の一部であり得る。

【0090】

本発明はさらに、配列番号27、29、33、37、もしくは39のヌクレオチド配列のいずれか、またはそれらの断片、あるいは本発明の任意の他のポリヌクレオチドを有する核酸を含む組換え構築物を提供する。一実施形態では、本発明の組換え構築物は、プラスミドまたはウイルスベクターのようなベクターを含み、それらに配列番号27、29、33、37、または39のヌクレオチド配列のいずれか、あるいはそれらの断片を有する核酸が、順方向または逆方向で挿入される。本発明のORFの1つを含むベクターの場合では、ベクターはさらに、ORFに作動可能に連結された、例えばプロモーターを含む調節配列を含んでもよい。多数の適切なベクターおよびプロモーターが、当業者に既知であり、本発明の組換え構築物を生成するのに市販されている。以下のベクターを一例として提供する。細菌：pBs、ファージスクリプト、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene)、pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)。真核生物：pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXTI、pSG (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVL (Pharmacia)。

【0091】

本発明の単離ポリヌクレオチドは、組換え的にタンパク質を生産するために、Kaufman et al., Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490 (1991)に開示されるpMT2またはpED発現ベクターのような発現制御配列に作動可能に連結されてもよい。多くの適切な発現制御配列が当該技術分野で既知である。組換えタンパク質を発現する一般的な方法はまた既知であり、R. Kaufman, Methods in Enzymology, 185:537-566 (1990)に例示されている。本明細書中で定義するように、「作動可能に連結される」は、タンパク質が連結されたポリヌクレオチド／発現制御配列で形質転換（トランスフェクト）された宿主細胞により発現されるように、本発明の単離ポリヌクレオチドおよび発現制御配列はベクターまたは細胞において位置されることを意味する。

【0092】

プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベクターまたは選択マーカーを有する他のベクターを用いて、任意の所望の遺伝子から選択することができる。2つの適切なベクターは、pKK232-8、およびpCM7である。特定の指定される細菌プロモーターとしては、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、λPR、およびtrcが挙げられる。真核生物プロモーターとしては、CMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTR、およびマウスメタロチオネイン-Iが挙げられる。適切なベクターおよびプロモーターの選定は、十分に当業者レベル内である。一般に、組換え発現ベクターは、宿主細胞の形質転換を許容する複製起点および選択マーカー、例えば大腸菌アンピシリン耐性遺伝子、およびS. cerevisiae (S. cerevisiae) TPR1遺伝子、および下流構造配列の転写を誘導するための高度に発現される遺伝子に由来するプロモーターを包含する。かかるプロモーターは、とりわけ3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) のような解糖酵素、α因子、酸ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質をコードするオペロンに由来され得る。異種構造配列は、翻訳開始および終結配列、および好ましくは細胞膜周辺腔または細胞外媒質への翻訳されたタンパク質の分泌を誘導することが可能なリーダー配列を有

する適切な相において構築される。任意に、異種配列は、所望の特性、例えば発現される組換え産物の安定化および簡素化した精製を付与するアミノ末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる。細菌用途に有用な発現ベクターは、機能的プロモーターを有する作動可能なリーディング相において適切な翻訳開始および終結シグナルと一緒に、所望のタンパク質をコードする構造的DNA配列を挿入することで構築される。ベクターは、ベクターの維持を確実にし、望ましい場合に宿主内での増幅を提供するために、1つまたはそれより多い表現型選択マーカー、および複製起点を含む。形質転換に適切な真核生物宿主としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、およびシュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ストレプトミセス (*Streptomyces*) 属、およびブドウ球菌 (*Staphylococcus*) 属内の様々な種が挙げられるが、他のものもまた、選択上使用され得る。

【0093】

代表的であるが、限定的ではない例として、細菌用途に有用な発現ベクターは、既知のクローニングベクター pBR322 (ATCC 37017) の遺伝子要素を含む市販のプラスミドに由来する選択マーカーおよび細菌複製起点を含むことができる。かかる市販のベクターとしては、例えば pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)、および GEM1 (Promega Biotech. Madison, WI, USA) が挙げられる。これらの pBR322 「骨格」セクションは、適切なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と組み合わせられる。適切な宿主株の形質転換および適切な細胞密度への宿主株の成長後に、選択されたプロモーターを、適当な手段 (例えば、温度移行または化学的誘発) により誘発または抑制し、細胞をさらなる期間培養する。細胞は通常遠心分離により収集し、物理的または化学的手段により崩壊して、得られた粗製抽出物をさらなる精製のために収穫する。

【0094】

本発明のポリヌクレオチドはまた、免疫応答を誘発するのに使用することができる。例えば、Fan et al., Nat. Biotech., 17: 870-872 (1999) (参照により本明細書に援用される) に記載されるように、ポリペプチドをコードする核酸配列を用いて、裸のプラスミドDNAの局所投与後に、あるいはDNAの注射、好ましくは筋内注射後に、コードされるポリペプチドに対する抗体を生成してもよい。核酸配列は好ましくは、組換え発現ベクターにおいて挿入され、裸のDNAの形態であってもよい。

【0095】

4. 2. 1 アンチセンス核酸
本発明の別の態様は、幹細胞成長因子様ヌクレオチド配列、もしくは断片、それらの類似体または誘導体を含む核酸分子にハイブリダイズすることができるか、あるいはそれらに相補的な単離アンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的な (例えば、二重鎖cDNAのコード鎖に相補的な、あるいはmRNA配列に相補的な) ヌクレオチド配列を含む。特定の態様では、少なくとも約10個、25個、50個、100個、250個、もしくは500個のヌクレオチドまたは全幹細胞成長様をコードする鎖に、あるいはそれらの一部のみに相補的な配列を含むアンチセンス核酸が提供される。幹細胞成長因子様の断片、相同体、誘導体および類似体をコードする核酸分子、または幹細胞成長因子様核酸配列に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。

【0096】

一実施形態では、アンチセンス核酸分子は、幹細胞成長因子様タンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対するアンチセンスである。「コード領域」という用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を指す。別の実施形態では、アンチセンス核酸分子は、幹細胞成長因子様タンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「容認 (conceding) 領域」に対するアンチセ

ンスである。「容認領域」という用語は、アミノ酸に翻訳されないコード領域（すなわち、5'および3'非翻訳領域とも呼ばれる）に隣接する5'および3'配列を指す。

【0097】

本明細書中に開示した幹細胞成長因子様タンパク質をコードするコード鎖配列を考慮すると、本発明のアンチセンス核酸は、ワトソンおよびクリック、またはフーグスティーン塩基対形成の規則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子は、幹細胞成長因子様mRNAの全コード領域に相補的であり得るが、より好ましくは、幹細胞成長因子様mRNAのコードまたは非コード領域の一部のみに対するアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、幹細胞成長因子様mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50ヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該技術分野で既知の手順を用いて、化学合成または酵素を介した連結反応を使用して構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、あるいは分子の生物学的安定性を増大するように、またはアンチセンス核酸とセンス核酸との間に形成される二重鎖の物理的安定性を増大するように設計された様々に修飾されたヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを使用することができる）を用いて化学的に合成することができる。

【0098】

アンチセンス核酸を生成するのに使用することができる修飾ヌクレオチドの例としては、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、ワイブトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、5-メチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3-N2-カルボキシプロピル）ウラシル、（acp3）w、および2,6-ジアミノプリンが挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス配向でサブクローニングされた（すなわち、挿入核酸から転写されるRNAは、所定の標的核酸に対してアンチセンス配向である、以下のセクションでさらに記載する）発現ベクターを用いて生物学的に生産することができる。

【0099】

本発明のアンチセンス核酸分子は通常、それらが幹細胞成長因子様タンパク質をコードする細胞mRNAおよび／またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはそれらに結合するように、被験体に投与されるか、あるいはその場（in situ）で生成されて、それによりタンパク質の発現を阻害する（例えば、転写および／または翻訳を阻害することにより）。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成するため従来のヌクレオチド相補性によるもの、あるいは例えば、DNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの主溝における特異的な相互作用によるものであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択細胞を標的とするように改変された後、全身投与することができる。例えば、全身投与に関して、アンチセンス分子は、それらが選択細胞表面上に発現される受容体または抗原に特異的に結合するように改変することができる

(例えば、アンチセンス核酸を、細胞表面受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することにより)。アンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載のベクターを用いて、細胞に送達させることができる。十分な核酸分子を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力な p o l I I または p o l I I I プロモーターの制御下にあるベクター構築物が好ましい。

【0100】

さらに別の実施形態では、本発明のアンチセンス核酸分子は、 α -アノマー核酸分子である。 α -アノマー核酸分子は、相補RNAと特異的な二重鎖ハイブリッドを形成し、ここで通常の α -ユニットに相反して、鎖は、互いに平行している。例えば、G a u l t i e r, e t a l., Nucl. Acids Res., 15: 6625-6641 (1987) を参照されたい。アンチセンス核酸分子はまた、2'-オ-メチルリボヌクレオチド [例えば、Inoue, et al., Nucl. Acids Res., 15: 6131-6148 (1987) を参照] あるいはキメラRNA-DNA類似体 [例えば、Inoue, et al., FEBS Lett., 215: 327-330 (1987) を参照] を含むことができる。

【0101】

リボザイムおよびPNAモチーフ

核酸修飾としては、修飾塩基、および糖リン酸骨格が修飾または誘導体化された核酸が挙げられるが、これらに限定されない。これらの修飾は、修飾核酸の化学的安定性を高めるために少なくとも部分的に実施され、その結果、修飾核酸は、例えば被験体における治療用途でのアンチセンス結合核酸として使用することができる。

【0102】

一実施形態では、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、リボザイムが相補領域を有するmRNAのような一本鎖核酸を切断することが可能なリボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNA分子である。したがって、リボザイム (例えば、H a s e l h o f f a n d G e r l a c h, Nature 334: 585-591 (1998) に記載されるようなハンマーヘッドリボザイム) は、幹細胞成長因子様mRNA転写物を触媒的に切断するのに使用することができ、それにより幹細胞成長因子様mRNAの転写を阻害する。幹細胞成長因子様コード核酸に対する特異性を有するリボザイムは、本明細書に開示する幹細胞成長因子様cDNAのヌクレオチド配列に基づいて設計することができる。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が幹細胞成長因子様コードmRNAにおいて切断されるべきヌクレオチド配列に相補的であるテトラヒメナ (T e t r a h y m e n a) L-19 I V S RNAを構築することができる。例えば、米国特許第4, 987, 071号 (C e t h等)、および米国特許第5, 116, 742号 (C e t h等) を参照されたい。幹細胞成長因子様mRNAはまた、RNA分子のプールから特定のリボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNAを選択するのに使用することができる。例えば、B a r t e l e t a l., Science, 261: 1411-1418 (1993) を参照されたい。

【0103】

あるいは、幹細胞成長因子様遺伝子発現は、標的細胞における幹細胞成長因子様遺伝子の転写を阻止する三重らせん構造を形成するために、幹細胞成長因子様核酸の調節領域 (例えば、幹細胞成長因子様プロモーターおよび/またはエンハンサー) に相補的なヌクレオチド配列をターゲティングすることで阻害することができる。 [例えば、H e l e n e, Anticancer Drug Des., 6: 569-84 (1991); H e l e n e, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 660: 27-36 (1992); M a h e r, Bioassays, 14: 807-15 (1992) を参照]

【0104】

様々な実施形態では、幹細胞成長因子様核酸は、例えば分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解性を改良するために、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で修飾す

ることができる。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を修飾して、ペプチド核酸骨格を生成することができる〔例えば、Hyrup, et al., Bioorg Med Chem., 4:5-23 (1996)を参照〕。本明細書で使用する場合、「ペプチド核酸」、または「PNA」という用語は、デオキシリボースリン酸骨格が、擬ペプチド骨格で置き換えられ、4つの天然の核酸塩基のみが保持された核酸擬似体（例えば、DNA擬似体）を指す。PNAの中性骨格は、低イオン強度の条件下で、DNAおよびRNAへの特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることがわかっている。PNAオリゴマーの合成は、上述のHyrup等、およびPerry-O'Keefe, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93:14670-14675 (1996)に記載されるように、標準的な固相ペプチド合成プロトコルを用いて実施することができる。 10

【0105】

幹細胞成長因子様のPNAは、治療用途および診断用途で使用するすることができる。例えば、PNAは、例えば転写または翻訳の停止を誘導するか、あるいは複製を阻害することによる遺伝子発現の配列特異的調整用のアンチセンスまたは抗遺伝子剤 (antigene agent) として使用することができる。幹細胞成長因子様のPNAはまた、例えば遺伝子中の単一塩基対突然変異の解析（例えば、PNA指向性PCRクランピング）において、他の酵素（例えば、S1ヌクレアーゼ）と併用する場合の人工制限酵素として（例えば、上述のHyrup, et al., 1996を参照）、あるいはDNA配列およびハイブリダイゼーション用のプローブまたはプライマーとして（上述のHyrup, et al., 1996、上述のPerry-O'Keefe, et al., 1996を参照）使用することができる。 20

【0106】

別の実施形態では、幹細胞成長様のPNAは、例えば、PNAに親油性基または他のヘルパー基を結合することにより、PNA-DNAキメラの形成により、あるいはリポソーム、または当該技術分野で既知の薬物送達の他の技法を用いて、PNAの安定性または細胞取り込みを高めるために修飾することができる。例えば、PNAおよびDNAの好適な特性を組み合わせ得る幹細胞成長因子様のPNA-DNAキメラを生成することができる。かかるキメラは、DNA認識酵素（例えば、RNA分解酵素HおよびDNAポリメラーゼ）がDNA部分と相互作用するのを可能にすると同時に、PNA部分は、高結合親和性および特異性を提供する。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、核酸塩基間の結合数、および配向の観点で選択される適切な長さのリンカーを用いて連結することができる〔上述のHyrup et al., 1996を参照〕PNA-DNAキメラの合成は、上述のHyrup, et al., 1996、およびNucl Acids Res, 24:3357-3363 (1996)に記載されるように実施することができる。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホルアミダイトカップリング化学を用いて固相上で合成することができ、修飾ヌクレオシド類似体（例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシチミジンホスホルアミダイトを、PNAとDNAの5'末端との間に使用することができる。例えば、Mag, et al., Nucl Acid Res., 17:5973-5988 (1989)を参照されたい。次に、PNAモノマーを段階的にカップリングさせて、5' PNAセグメントおよび3' DNAセグメントを有するキメラ分子を生産する。例えば、上述のFinn, et al., 1996を参照されたい。あるいは、5' DNAセグメントおよび3' PNAセグメントを有するキメラ分子を合成することができる。例えば、Pertersen, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 5:1119-1124 (1975)を参照されたい。 30 40

【0107】

別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付随基 (in vivoで宿主細胞受容体をターゲティングするため)、または細胞膜〔例えば、Letting, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 50

: 6553-6556 (1989)、Lemaître, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:648-652 (1987)、およびPCT国際公開第88/09810号を参照]または血液脳関門[例えば、PCT国際公開第89/10134号を参照]を通しての輸送を促進する作用物質を含んでもよい。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発切断剤[例えば、Kroll et al., BioTechniques, 6:958-976 (1988)を参照]、または挿入剤[例えば、Zon, Pharm. Res., 5:539-549 (1998)を参照]により修飾することができる。この目的で、オリゴヌクレオチドは、別の分子(例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤等)に結合することができる。

10

【0108】

4. 3 宿主細胞

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドを含有するように遺伝子操作した宿主細胞を提供する。例えば、かかる宿主細胞は、既知の形質転換、トランスフェクション、または感染方法を用いて、宿主細胞に導入された本発明の核酸を含有してもよい。本発明はさらには、本発明のポリヌクレオチドを発現するように遺伝子操作した宿主細胞を提供し、ここでかかるポリヌクレオチドは、細胞においてポリヌクレオチドを発現を駆動する、宿主細胞にとって異種の調節配列に作動可能に連結している。

【0109】

宿主細胞は、哺乳動物細胞のような高等真核宿主細胞、酵母細胞のような下等真核宿主細胞であり得るか、あるいは宿主細胞は、細菌細胞のような原核細胞であり得る。宿主細胞への組換え構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE、デキストラン媒介性トランスフェクション、またはエレクトロポレーションにより達成することができる[Davis, L. et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986)]。本発明のポリヌクレオチドの1つを含有する宿主細胞は、単離断片によりコードされる遺伝子産物を産生するのに従来の様式で 사용할ことができる(ORFの場合)か、あるいはEMFの制御下で異種タンパク質を産生するのに使用することができる。

20

【0110】

任意の宿主/ベクター系は、1つまたはそれより多い本発明のORFを発現するのに使用することができる。これらとしては、HeLa細胞、Cv-1細胞、COS細胞、およびSf9細胞のような真核生物宿主、ならびに大腸菌および枯草菌のような原核生物宿主が挙げられるが、これらに限定されない。最も好ましい細胞は、特定のポリペプチドまたはタンパク質を通常発現しない細胞、あるいは低い自然レベルでポリペプチドまたはタンパク質を発現する細胞である。成熟タンパク質は、適切なプロモーターの制御下で、哺乳動物細胞、酵母、細菌、または他の細胞において発現され得る。無細胞翻訳系はまた、本発明のDNA構築物に由来するRNAを用いて、かかるタンパク質を産生するのに使用することができる。真核生物宿主および原核生物宿主とともに使用するための適切なクローニングベクターおよび発現ベクターは、Sambrook et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York (1989) (この開示は、参照により本明細書に援用される)に記載されている。

30

40

【0111】

様々な哺乳動物細胞培養系もまた、組換えタンパク質を発現するのに用いることができる。哺乳動物発現系の例としては、Gluzman, Cell, 23:175 (1981)に記載されるサル腎臓線維芽細胞のCOS-7系、および適合性ベクターを発現することが可能な他の細胞系(例えば、C127、3T3、CHO、HeLa、およびBHK細胞系)が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、適切なプロモーター、また任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終結配列、および5'フランキング非転写配列を含む。SV40ウイルス

50

スゲノムに由来するDNA配列、たとえばSV40起点、初期プロモーター、エンハンサー、スプライス、およびポリアデニル化部位を使用して、必要とされる非翻訳遺伝子要素を提供してもよい。細菌培養で産生される組換えポリペプチドおよびタンパク質は通常、細胞ペレットからの初期抽出、続いて1つまたはそれより多い塩析、水性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィ工程により単離される。タンパク質リフォールディング工程は、必要に応じて、成熟タンパク質の立体配置を完全にする際に使用することができる。最終的に、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）を、最終精製工程に使用することができる。タンパク質の発現において使用される微生物細胞は、凍結融解サイクリング、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む任意の従来法により破壊することができる。

10

【0112】

多数の細胞型が、タンパク質の発現に適した宿主細胞として作用し得る。哺乳動物宿主細胞としては、例えば、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト腎臓293細胞、ヒト上皮A431細胞、ヒトColo205細胞、3T3細胞、CV-1細胞、他の形質転換霊長類細胞系、正常二倍体細胞、初代組織の*in vitro*培養に由来する細胞株、初代外植片、HeLa細胞、マウスL細胞、BHK、HL-60、U937、HaK、またはジャークット細胞が挙げられる。

【0113】

あるいは、酵母のような下等真核生物、または細菌のような原核細胞生物においてタンパク質を生産することが可能であり得る。潜在的に適切な酵母株としては、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シズサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、クルイベロミセス属（*Kluyveromyces*）株、カンジダ属（*Candida*）、または異種タンパク質を発現することが可能な任意の酵母株が挙げられる。潜在的に適切な細菌株としては、大腸菌（*Escherichia coli*）、枯草菌（*Bacillus subtilis*）、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）、または異種タンパク質を発現することが可能な任意の細菌株が挙げられる。タンパク質が酵母または細菌で作製される場合、機能的タンパク質を得るために、例えば適切な部位のリン酸化またはグリコシル化により、そこで生産されたタンパク質を修飾することが必要な場合がある。かかる共有結合は、既知の化学的方法および酵素的方法を用いて達成され得る。

20

30

【0114】

本発明の別の実施形態では、細胞および組織は、誘導性調節要素の制御下で本発明のポリヌクレオチドを含む内因性遺伝子を発現するように操作されてもよく、この場合では、内因性遺伝子の調節配列は、相同組換えにより置き換えられ得る。本明細書中で記載するように、遺伝子ターゲティングを用いて、遺伝子の既存の調節領域を、異なる遺伝子から単離した調節配列、または遺伝子操作方法により合成した新規調節配列で置き換えることができる。かかる調節配列は、プロモーター、エンハンサー、担体結合領域、ネガティブ調節要素、転写開始部位、調節タンパク質結合部位、または上記配列の組合せから構成され得る。あるいは、ポリアデニル化シグナル、mRNA安定性要素、スプライス部位、タンパク質の輸送もしくは分泌特性を増強または改変するためのリーダー配列、あるいはタンパク質もしくはRNA分子の機能または安定性を変更あるいは改善する他の配列を含む、生産されるRNAもしくはタンパク質の構造または安定性に影響を及ぼす配列は、置換され得るか、除去され得るか、付加され得るか、またはターゲティングにより改変され得る。

40

【0115】

ターゲティング事象は、新たな調節配列の制御下に遺伝子を置くこと（例えば、遺伝子の上流に新たなプロモーターもしくはエンハンサー、またはその両方を挿入すること）による、調節配列の簡単な挿入であってもよい。あるいは、ターゲティング事象は、組織特異的ネガティブ調節要素の欠失のような、調節要素の簡単な欠失であってもよい。ある

50

いは、ターゲッティング事象は、既存の要素を置き換えてもよく、例えば組織特異的エンハンサーを、天然に存在する要素よりも広範であるか、またはそれと異なる細胞型特異性を有するエンハンサーで置き換えることができる。ここで、天然に存在する配列は欠失され、新たな配列が付加される。すべての場合で、ターゲッティング事象の特定は、外因性DNAが宿主細胞ゲノムに組み込まれた細胞の選択を可能にするターゲッティングDNAと近接する1つまたはそれより多い選択マーカーを用いて促進され得る。ターゲッティング事象の特定はまた、ネガティブ選択マーカーが外因性DNAに連結されるように、ネガティブ選択の特性を示す1つまたはそれより多い選択マーカーを用いて促進されてもよいが、ネガティブ選択マーカーがターゲッティング配列に隣接し、宿主細胞ゲノム中の配列と正確な相同組換え事象がネガティブ選択マーカーの安定な組み込みをもたらさないように配置される。この目的で有用なマーカーとしては、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、または細菌キサンチン・グアニン・ホルホリボシルトランスフェラーゼ (gpt) 遺伝子が挙げられる。 10

【0116】

本発明のこの態様により使用することができる遺伝子ターゲッティングまたは遺伝子活性化技法は、米国特許第5,272,071号 (Chappel)、米国特許第5,578,461号 (Sherwin等)、国際出願第PCT/US92/09627号 (国際公開第93/09222号) (Selden等)、および国際出願第PCT/US90/06436号 (国際公開第91/06667号) (Skoultschi等) (これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に援用される) により詳細に記載されている。 20

【0117】

4.3.1 キメラタンパク質および融合タンパク質

本発明はまた、幹細胞成長因子様キメラタンパク質または融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用する場合、幹細胞成長因子様「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非幹細胞成長因子様ポリペプチドに作動的に連結された幹細胞成長因子様ポリペプチドを含む。「幹細胞成長因子様ポリペプチド」は、幹細胞成長因子様タンパク質に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指すのに対し、「非幹細胞成長因子様ポリペプチド」は、幹細胞成長因子様タンパク質に実質的に相同的でないタンパク質、例えば幹細胞成長因子様タンパク質と異なる、かつ同じかまたは異なる生物に由来するタンパク質に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。幹細胞成長因子様融合タンパク質内では、幹細胞成長因子様ポリペプチドは、幹細胞成長因子様タンパク質のすべてまたは一部に相当することができる。一実施形態では、幹細胞成長因子様融合タンパク質は、幹細胞成長因子様タンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態では、幹細胞成長因子様タンパク質は、幹細胞成長因子様タンパク質の少なくとも2つの生物学的に活性な部分を含む。さらに別の実施形態では、幹細胞成長因子様融合タンパク質は、幹細胞成長因子様タンパク質の少なくとも3つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質内では、「作動的に連結される」という用語は、幹細胞成長因子様ポリペプチドおよび非幹細胞成長因子様ポリペプチドが、互いにインフレームで融合されることを示すことを意図する。非幹細胞成長因子様ポリペプチドは、幹細胞成長因子様ポリペプチドのN末端またはC末端に融合させることができる。 30 40

【0118】

一実施形態では、融合タンパク質は、幹細胞成長因子様配列がGST (グルタチオンS-トランスフェラーゼ) 配列のC末端に融合されたGST-幹細胞成長因子様融合タンパク質である。かかる融合タンパク質は、組換え幹細胞成長因子用ポリペプチドの精製を容易にすることができる。別の実施形態では、融合タンパク質は、そのN末端に異所性のシグナル配列を含有する幹細胞成長因子様タンパク質である。ある特定の宿主細胞 (例えば、哺乳動物宿主細胞) では、幹細胞成長因子様の発現および/分泌を、異所性のシグナル配列の使用により増大させることができる。

【0119】

さらに別の実施形態では、融合タンパク質は、幹細胞成長因子様配列が免疫グロブリンタ 50

ンパク質ファミリーの成員に由来する配列に融合された幹細胞成長因子様－免疫グロブリン融合タンパク質である。本発明の幹細胞成長因子様－免疫グロブリン融合タンパク質は、薬学的組成物に組み込むことができ、幹細胞成長因子様リガンドと細胞の表面上の幹細胞成長因子様タンパク質との相互作用を阻害するために被験体に投与することができ、それにより *in vivo* の幹細胞成長因子様媒介性シグナル伝達を抑制する。幹細胞成長因子様－免疫グロブリン融合タンパク質は、幹細胞成長因子様同族リガンドの生物学的利用能に影響を及ぼすのに使用することができる。幹細胞成長因子様リガンド／幹細胞成長因子様相互作用の阻害は、増殖性障害および分化性障害の両方の治療に、ならびに細胞生存の調整（例えば、促進または阻害）に、治療上有用であり得る。さらに、本発明の幹細胞成長因子様－免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体における抗幹細胞成長因子様抗体を産生するために、幹細胞成長因子様リガンドを精製するために、また幹細胞成長因子様と幹細胞成長因子様リガンドとの相互作用を阻害する分子を特定するためのスクリーニングアッセイで、免疫原として使用することができる。

10

20

30

40

50

【0120】

本発明の幹細胞成長因子様キメラタンパク質または融合タンパク質は、標準的な組換え DNA 技法により生産することができる。例えば、異なるポリペプチド配列をコードする DNA 断片を、従来の技法に従って、例えば連結反応のための平滑末端または付着末端の使用、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて付着末端の充填（*filling-in*）、望ましくない連結を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素連結反応により、ともにインフレーションで連結される。別の実施形態では、融合タンパク質は、自動 DNA 合成機を含む従来の技法により合成することができる。あるいは、遺伝子断片の PCR 増幅は、2つの連続した遺伝子断片間の相補的オーバーハングを生じるアンカープライマーを用いて実施することができ、アンカープライマーは続いてアニーミングされ、再増幅されてキメラ遺伝子配列を生成することができる [例えば、Ausubel, et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1992を参照]。さらに、すでに融合部分（例えば GST ポリペプチド）をコードしている多くの発現ベクターが市販されている。幹細胞成長因子様分子をコードする核酸は、融合部分が幹細胞成長因子様タンパク質にインフレーションで連結されるように、かかる発現ベクターにクローニングすることができる。

【0121】

4. 4 本発明のポリペプチド

本発明の単離ポリペプチドとしては、配列番号 28、30～32、34、38、または 40 のいずれか 1つとして記載されるアミノ酸配列、ヌクレオチド配列配列番号 27、29、33、37、または 39 のいずれか 1つによりコードされるアミノ酸配列、あるいは相当する完全長または成熟タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のポリペプチドはまた、(a) 配列番号 27、29、33、37、または 39 に記載されるヌクレオチド配列のいずれか 1つを有するポリヌクレオチド、または (b) 配列番号 28、30～32、34、38、または 40 として記載されるアミノ酸配列のいずれか 1つをコードするポリヌクレオチド、または (c) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で (a) または (b) のいずれかのポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる、好ましくは生物学的または免疫学的活性を有するポリペプチドを含む。本発明はまた、配列番号 28、30～32、34、38、または 40 として記載されるアミノ酸配列、あるいは相当する完全長または成熟タンパク質、および生物活性を保持するそれらの「実質的等価体」（例えば、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または 89%、より典型的には少なくとも約 90%、91%、92%、93%、または 94%、さらにいっそう典型的には少なくとも約 95%、96%、97%、98%、または 99%、最も典型的には少なくとも約 99% アミノ酸同一性を有する）のいずれかの生物学的に活性または免疫学的に活性な変異体を提供

する。対立遺伝子変異体によりコードされるポリペプチドは、配列番号28、30～32、34、38、または40を含むポリペプチドと比較して、同様の活性、増加した活性、または減少した活性を有してもよい。

【0122】

生物活性を示すことが可能な本発明のタンパク質の断片もまた、本発明に含まれる。タンパク質の断片は、線状形態であってもよく、あるいはそれらは、既知の方法を用いて、例えばH. U. Saragovi, et al., Bio/Technology, 10:773-778 (1992)、およびR. S. McDowell, et al., J. Amer. Chem. Soc., 114:9425-9253 (1992) (これらはともに、参照により本明細書に援用される)に記載されるように、環化されてもよい。かかる断片は、タンパク質結合部位の原子価を増加することを含む多くの目的のために、免疫グロブリンのような担体分子に融合させてもよい。

【0123】

本発明はまた、完全長および成熟形態（例えば、シグナル配列または前駆体配列を有さない）の両方の開示するタンパク質を提供する。タンパク質コード配列は、開示するヌクレオチド配列の翻訳により配列表で特定される。かかるタンパク質の成熟形態は、適切な哺乳動物細胞または他の宿主細胞における完全長ポリヌクレオチドの発現により得られ得る。成熟形態のタンパク質の配列はまた、完全長形態のアミノ酸配列から決定可能である。本発明のタンパク質が膜結合性である場合、可溶性形態のタンパク質もまた提供される。かかる形態では、タンパク質を膜結合性とさせる領域の一部またはすべての領域を欠失させて、その結果タンパク質は、それが発現される細胞から完全に分泌される。

【0124】

本発明のタンパク質組成物はさらに、親水性（例えば、薬学的に許容可能な）キャリアのような許容可能なキャリアを含んでもよい。

【0125】

本発明はさらに、本発明の核酸断片により、あるいは本発明の核酸断片の縮重変異体によりコードされる単離ポリペプチドを提供する。「縮重変異体」とは、ヌクレオチド配列により本発明の核酸断片（例えば、ORF）と異なるが、遺伝暗号の縮重に起因して、同一のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド断片を意図する。本発明の好ましい核酸断片は、タンパク質をコードするORFである。

【0126】

当該技術分野で既知の様々な方法論を利用して、本発明の単離ポリペプチドまたはタンパク質のいずれか1つを得ることができる。最も簡単なレベルでは、アミノ酸配列は、市販のペプチド合成機を用いて合成することができる。タンパク質と一次、二次または三次構造および／または立体配座特性を共有する合成的に構築されたタンパク質配列は、タンパク質活性を含むそれらと共通の生物学的特性を保有し得る。この技法は、小ペプチドおよび大型ポリペプチドの断片を産生するのに特に有用である。断片は、例えば、天然のポリペプチドに対する抗体を生成するのに有用である。したがって、断片は、治療用化合物のスクリーニングにおいて、また抗体の作製のための免疫学的プロセスにおいて、天然の精製タンパク質の生物学的に活性または免疫学的に活性な代用物として有用である。

【0127】

あるいは、本発明のポリペプチドおよびタンパク質は、所望のポリペプチドまたはタンパク質を発現するように変更した細胞から精製され得る。本明細書中で使用する場合、細胞は、細胞が遺伝子操作により、細胞が通常産生しないか、または細胞が通常低レベルで産生するポリペプチドまたはタンパク質を産生するように作製される場合、所望のポリペプチドまたはタンパク質を発現するように変更されると言われる。本発明のポリペプチドまたはタンパク質の1つを産生する細胞を生成するために、組換え配列または合成配列のいずれかを、真核細胞または原核細胞に導入して発現させる手順を、当業者は容易に適応させることができる。

【0128】

本発明はまた、適切な培地中で本発明の宿主細胞の培養物を成長させることと、細胞または細胞を成長させた培養物からタンパク質を精製することを含むポリペプチドの産生方法に関する。例えば、本発明の方法は、本発明のポリヌクレオチドを含む適切な発現ベクターを含有する宿主細胞を、コードされるポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養する、ポリペプチドの生産方法を含む。ポリペプチドを、培養物から、利便性よく培地から、あるいは宿主細胞から調製される溶解産物から回収し、さらに精製することができる。好ましい実施形態としては、かかるプロセスにより生産されたタンパク質が、完全長または成熟形態のタンパク質である実施形態が挙げられる。

【0129】

代替的方法では、ポリペプチドまたはタンパク質は、ポリペプチドまたはタンパク質を本来生産する細菌細胞から精製される。当業者は、本発明の単離ポリペプチドまたはタンパク質の1つを得るために、ポリペプチドおよびタンパク質を単離する既知の方法を容易に行うことができる。これらとしては、免疫クロマトグラフィ、HPLC、サイズ排除クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、およびイムノアフィニティクロマトグラフィが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Scope, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag (1994)、Sambrook, et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biologyを参照されたい。生物学的／免疫学的活性を保持するポリペプチド断片としては、約100個よりも多いアミノ酸、または約200個よりも多いアミノ酸を含む断片、および特定のタンパク質ドメインをコードする断片が挙げられる。

【0130】

精製ポリペプチドは、ポリペプチドに結合する分子を同定するための、当該技術分野で既知のin vitro結合アッセイに使用することができる。これらの分子としては、例えば小分子、コンビナトリアルライブラリーからの分子、抗体または他のタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。次に結合アッセイで同定された分子を、当該技術分野で既知のin vivo組織培養物または動物モデルにおいて、アンタゴニストまたはアゴニスト活性に関して試験する。要するに、分子は、複数の細胞培養物または動物へと滴定され、続いて動物／細胞死、または動物／細胞の生存の延長に関して試験される。

【0131】

さらに、本発明のペプチド、またはペプチドに結合することが可能な分子は、毒素、例えばリジンまたはコレラと、あるいは細胞にとって有毒な他の化合物と複合体を形成してもよい。次に、毒素結合分子複合体は、配列番号28、30～32、34、38、または40に対する結合分子の特異性により、腫瘍または他の細胞へとターゲッティングされる。

【0132】

本発明のタンパク質はまた、トランスジェニック動物の産物として、例えばタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する体細胞または生殖細胞を特徴とするトランスジェニックウシ、ヤギ、ブタまたはヒツジの乳の構成成分として、発現されてもよい。

【0133】

本明細書中に提供したタンパク質はまた、精製タンパク質の配列と同様のアミノ酸配列を特徴とするが、改変が自然に提供されるか、または故意に操作されるタンパク質を含む。例えば、ペプチドまたはDNA配列における改変は、既知の技法を用いて、当業者によりなされ得る。タンパク質配列における所定の改変としては、コード配列における選択アミノ酸残基の変更、置換、置き換え、挿入または欠失が挙げられ得る。例えば、1つまたはそれよりも多いシステイン残基は、分子の立体配座を変更するために、欠失されるか、または別のアミノ酸と置き換えられ得る。かかる変更、置換、置き換え、挿入または欠失の技法は当業者に既知である（例えば、米国特許第4,518,584号を参照）。好ましくは、かかる変更、置換、置き換え、挿入または欠失は、タンパク質の所望の活性を保持する。タンパク質機能にとって重要なタンパク質の領域は、単一アミノ酸またはアミノ酸列

をアラニンで系統だって置換し、続いて得られたアラニン含有変異体を生物活性に関して試験することを含むアラニンスキャンニング方法を含む、当該技術分野で既知の様々な方法により決定することができる。このタイプの分析は、生物活性における置換アミノ酸（複数可）の重要性を決定する。タンパク質機能にとって重要なタンパク質の領域は、e M A T R I X プログラムによって決定されてもよい。

【0134】

全体的または部分的にタンパク質活性を保持すると予測され、かつスクリーニングまたは他の免疫学的方法論に有用なタンパク質の配列の他の断片および誘導体もまた、本明細書中の開示を考慮して、当業者は容易に作製し得る。かかる改変は、本発明に含まれる。

【0135】

タンパク質はまた、本発明の単離ポリヌクレオチドを、1つまたはそれより多い昆虫発現ベクターにおける適切な制御配列と作動可能に連結することと、昆虫発現系を使用することにより生産され得る。バキュロウイルス／昆虫細胞発現系のための物質および方法は、例えば Invitrogen, San Diego, Calif., U. S. A. からキットの形態（Max Bat（商標）キット）で市販されており、かかる方法が、Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555（1987）（参照により本明細書に援用される）に記載されるように、当該技術分野で既知である。本発明で使用する場合、本発明のポリヌクレオチドを発現することが可能な昆虫細胞は、「形質転換される」。

10

20

【0136】

本発明のタンパク質は、組換えタンパク質を発現するのに適した培養条件下で、形質転換宿主細胞を培養することで調製されてもよい。次に、得られた発現タンパク質は、ゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーのような既知の精製プロセスを用いて、かかる培養物から（すなわち、培地または細胞抽出物から）精製され得る。タンパク質の精製としてはまた、タンパク質に結合する作用物質を含有するアフィニティカラム、コンカナバリン A-アガロース、ヘパリン-*toyopearl*（商標）、または *Cibacrom blue 3GA Sepharose*（商標）のようなアフィニティ樹脂による1つまたはそれより多いカラム工程、フェニルエーテル、ブチルエーテル、またはプロピルエーテルのような樹脂を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーを含む1つまたはそれより多い工程、またはイムノアフィニティクロマトグラフィーが挙げられ得る。

30

40

【0137】

あるいは、本発明のタンパク質はまた、精製を容易とする形態で発現されてもよい。例えば、本発明のタンパク質は、マルトース結合タンパク質（MBP）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）またはチオレドキシン（TRX）の融合タンパク質のような融合タンパク質として、あるいはヒスタグとして発現されてもよい。かかる融合タンパク質の発現および精製のキットは、それぞれ New England BioLab（Beverly, Mass.）、Pharmacia（Piscataway, N. J.）、および Invitrogen から市販されている。タンパク質はまた、エピトープでタグ付けして、続いてかかるエピトープに対して誘導される特定の抗体を用いることで精製することができる。かかるエピトープの1つ（「FLAG（登録商標）」）は、Kodak（New Haven, Conn.）から市販されている。

【0138】

最終的に、疎水性 RP-HPLC 培地（例えば、ペンダントメチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲル）を用いた1つまたはそれより多い逆相高速クロマトグラフィー（RP-HPLC）工程を使用して、タンパク質をさらに精製することができる。上述の精製工程のいくつかまたはすべてはまた、様々な組み合わせで使用して、実質的に均質な単離組換えタンパク質を提供することもできる。こうして精製されたタンパク質は、他の哺乳動物タンパク質を実質的に含まず、本発明により「単離タンパク質」として定義される。

【0139】

50

本発明のポリペプチドは、類似体（変異体）を含む。本発明のポリペプチドは、幹細胞成長因子様類似体を含む。これは、本発明の幹細胞成長因子様ポリペプチドの断片、同様に欠失、挿入もしくは置換された1つまたはそれより多いアミノ酸を含む幹細胞成長因子様ポリペプチドを含む。また、本発明の幹細胞成長因子様ポリペプチドの類似体は、幹細胞成長因子様ポリペプチドの融合、または幹細胞成長因子様ポリペプチドの修飾を含み、ここで幹細胞成長因子様ポリペプチドまたは類似体は、別の部分（単数または複数）（例えば、ターゲティング部分または別の治療薬）に融合される。かかる類似体は、活性および／または安定性のような特性の改善を示し得る。幹細胞成長因子様ポリペプチドまたは類似体に融合され得る部分の例として、例えば、ニューロンへのポリペプチドの送達を提供するターゲティング部分（例えば、中枢神経系に対する抗体、または神経細胞上で発現される受容体およびリガンドに対する抗体）が挙げられる。幹細胞成長因子様ポリペプチドに融合され得る他の部分としては、治療に使用される治療薬（例えば、抗うつ薬、または神経学的障害用の他の薬剤）が挙げられる。また、幹細胞成長因子様ポリペプチドは、ニューロン成長モジュレータ、および標的送達のための他のケモカインに融合されてもよい。

10

【0140】

4. 4. 1 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの同一性ならびに類似性の決定
好ましい同一性および／類似性は、試験される配列間の最大のマッチを付与するように設計される。同一性および類似性を決定する方法は、GAP [Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12 (1): 387 (1984); Genetics Computer Group; University of Wisconsin, Madison, WI]、BLASTP、BLASTI N、BLASTX、FASTA [Altschul, S. F. et al., *H. Molec. Biol.*, 215: 403-410 (1990)]、PSI-BLAST [Altschul, S. F., et al., *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (参照により本明細書に援用される)]、eMatrixソフトウェア [Wu. et al., *J. Comp. Biol.*, 6: 219-235 (1999) (参照により本明細書に援用される)]、eMotifソフトウェア [Neveill-Manning et al., *ISMB-97*, 4: 202-209 (参照により本明細書に援用される)]、GeneAtlasソフトウェア (Molecular Simulations Inc. (MSI), San Diego, CA) [Sanchez and Sali, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 13597-13602 (1998); Kitson DH et al., (2000) 「構造的モデル化を用いたリモートホモロジー検出—評価 (Remote homology detection using structural modeling—a n evaluation)」提出; Fisher and Eisenberg, *Protein Sci.*, 5: 947-955 (1966)]、およびKyte-Doolittle疎水性予測アルゴリズム [J. Mol Biol, 157: 105-31 (1982)、参照により本明細書に援用される]を含むGCGプログラムパッケージが挙げられるが、これらに限定されないコンピュータプログラムにおいて体系化される。BLASTプログラムは、National Centre for Biotechnology Information (NCBI)、および他の供給源 [BLAST Manual, Altschul, S., et al. NCB NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S. et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990)]から公的に利用可能である。

20

30

40

【0141】

4. 5 遺伝子治療

本発明の遺伝子のポリヌクレオチドにおける突然変異は、コードされるタンパク質の正常機能の損失をもたらす。したがって、本発明は、本発明のポリペプチドの正常活性を回復させるための、あるいは本発明のポリペプチドを含む疾患状態を治療するための遺伝子治

50

療を提供する。本発明のポリペプチドをコードする機能的遺伝子の適切な細胞への送達には、ベクター、より詳細にはウイルスベクター（例えばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、またはレトロウイルス）を用いて *ex vivo*、*in situ*、または *in vivo* で、あるいは物理的な DNA 移入方法（例えば、リポソームまたは化学的処理）を用いて *ex vivo* で達成される。例えば、Anderson, Nature, (Suppl.) 392 (6679): 25-20 (1998) を参照されたい。遺伝子治療技術に関するさらなる概説に関して、例えば Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989)、Verma, Scientific American: 68-84 (1990)、および Miller, Nature, 357: 455-460 (1992) を参照されたい。本発明のヌクレオチドのいずれか 1 つ、または本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の導入はまた、染色体外基質（一過性の発現）または人工染色体（安定な発現）により達成され得る。また細胞は、増殖のため、またはかかる細胞に対して目的の効果や活性を発揮するために、本発明のタンパク質の存在下で、*ex vivo* で培養されてもよい。次に、処理細胞を、治療目的で *in vivo* で導入することができる。あるいは、他のヒト疾患状態では、本発明のポリペプチドの発現を阻止すること、またはその活性を阻害することが、疾患状態を治療するのに有用であることが考えられる。アンチセンス療法または遺伝子治療は、本発明のポリペプチドの発現をネガティブに調節するのに適用させることが考えられる。

10

【0142】

タンパク質の発現を阻害する方法は、当該技術分野で既知の方法として、本発明の核酸、それらの相補体、またはそれらの翻訳 RNA 配列に対するアンチセンス分子の導入が挙げられる。さらに、本発明のポリペプチドは、標的欠失方法、または組織特異的なサイレンサのようなネガティブ調節要素の挿入を用いることで阻害することができる。

20

【0143】

本発明はさらには、本発明のポリヌクレオチドを発現するように *in vivo* で遺伝子操作した細胞を提供し、ここでかかるポリヌクレオチドは、細胞においてポリヌクレオチドの発現を促進する宿主細胞にとって異種の調節配列と作動的に連結している。これらの方法は、本発明のポリヌクレオチドの発現を増加または減少させるのに使用することができる。

【0144】

本発明により提供される DNA 配列の見解により、細胞の改変が内因性ポリペプチドの発現を許容、増加または減少させることが可能である。細胞は、細胞が高レベルでタンパク質を発現するように、全体的または部分的に、天然に存在するプロモーターを、異種プロモーターのすべてもしくは一部で置き換えることで、増加したポリペプチド発現を提供するように、改変させることができる（例えば、相同組換えにより）。異種プロモーターは、所望のタンパク質コード配列に作動的に連結されるように挿入される。例えば、PCT 国際公開第 94/12650 号、PCT 国際公開第 92/20808 号、および PCT 国際公開第 91/09955 号を参照されたい。異種プロモーター DNA のほかに、増幅可能マーカー DNA（例えば、*ada*、*dhfr*、およびカルバミルリン酸シンターゼ、アスパラギン酸トランスカルバミラーゼ、およびヒドロオロラーゼをコードする多機能性 C

30

40

【0145】

本発明の別の実施形態では、細胞および組織は、誘導性調節要素の制御下で、本発明のポリヌクレオチドを含む内因性遺伝子が発現するように操作されてもよく、この場合、内因性遺伝子の調節配列が、相同組換えにより置き換えられ得る。本明細書中に示すように、遺伝子ターゲティングを用いて、遺伝子の既存の調節配列を、異なる遺伝子から単離した調節配列、または遺伝子操作方法により合成した新規な調節配列と置き換えることがで

50

きる。かかる調節配列は、プロモーター、エンハンサー、担体結合領域、ネガティブ調節要素、転写開始部位、調節タンパク質結合部位、または上記配列の組合せから構成され得る。あるいは、生産されるRNAもしくはタンパク質の構造または安定性に影響を及ぼす配列は、ターゲッティングにより置換され得るか、除去され得るか、付加され得るか、または改変され得る。これらの配列としては、ポリアデニル化シグナル、mRNA安定性要素、スプライス部位、タンパク質の輸送もしくは分泌特性を増強または改質するためのリーダー配列、あるいはタンパク質もしくはRNA分子の機能または安定性を変更あるいは改善する他の配列が挙げられる。

【0146】

ターゲッティング事象は、新たな調節配列の制御下に遺伝子を置くこと（例えば、遺伝子の10
上流に新たなプロモーターもしくはエンハンサー、またはその両方を挿入すること）による、調節配列の簡単な挿入であってもよい。あるいは、ターゲッティング事象は、組織特異的ネガティブ調節要素の欠失のような、調節要素の簡単な欠失であってもよい。あるいは、ターゲッティング事象は、既存の要素を置き換えてもよく、例えば組織特異的エンハンサーを、天然に存在する要素よりも広範であるか、またはそれと異なる細胞型特異性を有するエンハンサーで置き換えることができる。ここで、天然に存在する配列は欠失され、新たな配列が付加される。すべての場合で、ターゲッティング事象の同定は、外因性DNAが細胞ゲノムに組み込まれた細胞の選択を可能にするターゲッティングDNAと近接する1つまたはそれより多い選択マーカーを用いて促進され得る。ターゲッティング事象の20
特定はまた、ネガティブ選択マーカーが外因性DNAに連結されるが、ネガティブ選択マーカーがターゲッティング配列に隣接し、宿主細胞ゲノム中の配列と正確な相同組換え事象がネガティブ選択マーカーの安定な組み込みをもたらさないように配置されるような、ネガティブ選択の特性を示す1つまたはそれより多いマーカー遺伝子を用いて促進されてもよい。この目的で有用なマーカーとしては、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（TK）遺伝子、または細菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（gpt）遺伝子が挙げられる。

【0147】

本発明のこの態様により使用することができる遺伝子ターゲッティングまたは遺伝子活性化技法は、米国特許第5, 272, 071号（Chappel）、米国特許第5, 578, 461号（Sherwin等）、国際出願第PCT/US92/09627号（国際公開第93/09222号）（Selden等）、および国際出願第PCT/US90/06436号（国際公開第91/06667号）（Skoultschi等）（これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に援用される）により詳細に記載されている。30

【0148】

4. 6 トランスジェニック動物

in vivoでの本発明のポリペプチドの生物学的機能を決定する好ましい方法において、本発明により提供される1つまたはそれより多い遺伝子は、相同組換えを用いた動物の生殖細胞系列で過剰発現されるか、または不活性化される[Capecci, Science, 244: 1288-1292 (1989)]。遺伝子が、外因性または内因性プロモーター要素の制御下で過剰発現される動物は、トランスジェニック動物として知られている。相同組換えにより内因性遺伝子が不活性化された動物は、「ノックアウト」動物と呼ばれる。ノックアウト動物、好ましくは非ヒト動物は、米国特許第5, 557, 032号（参照により本明細書に援用される）に記載されるように調製することができる。トランスジェニック動物は、生物学的プロセス、好ましくは疾患状態で果たす本発明のポリペプチドの役割を決定するのに有用である。トランスジェニック動物は、脂質代謝を調節する化合物を特定するためのモデル系として有用である。トランスジェニック動物、好ましくは非ヒト動物は、米国特許第5, 489, 743号およびPCT国際公開第94/28122号（参照により本明細書に援用される）に記載される方法を用いて生産される。40

【0149】

本発明のポリヌクレオチドのプロモーターのすべてまたは一部が本発明のポリペプチドの発現のレベルを変更するように活性化または不活性化されたトランスジェニック動物を調製することができる。不活性化は、上述の相同組換え方法を用いて実施することができる。活性化は、タンパク質発現の増加を提供するために、相同プロモーターを補充するか、さらには置き換えることにより達成することができる。相同プロモーターは、特定の組織におけるプロモーター活性化を付与することが知られている1つまたはそれより多い異種エンハンサー要素の挿入により補充することができる。

【0150】

本発明のポリヌクレオチドはまた、例えば相同組換えまたはノックアウト戦略による、機能的幹細胞成長因子様ポリペプチドを発現することができない動物、または幹細胞成長因子様ポリペプチドの変異体を発現する動物の開発を可能とする。かかる動物は、幹細胞成長因子様ポリペプチドの *in vivo* 活性を研究するための、ならびに幹細胞成長因子様ポリペプチドのモジュレータを研究するためのモデルとして有用である。

10

【0151】

in vivo での本発明のポリペプチドの生物学的機能を決定する好ましい方法において、本発明により提供される1つまたはそれより多い遺伝子は、相同組換えを用いた動物の生殖細胞系列で過剰発現されるか、または不活性化される [Capecci, Science, 244: 1288-1292 (1989)]。遺伝子が、外因性または内因性プロモーター要素の制御下で過剰発現される動物は、トランスジェニック動物として知られている。相同組換えにより内因性遺伝子が不活性化された動物は、「ノックアウト」動物と呼ばれる。ノックアウト動物、好ましくは非ヒト動物は、米国特許第5,557,032号（参照により本明細書に援用される）に記載されるように調製することができる。トランスジェニック動物は、生物学的プロセス、好ましくは疾患状態で果たす本発明のポリペプチドの役割を決定するのに有用である。トランスジェニック動物は、脂質代謝を調節する化合物を特定するためのモデル系として有用である。トランスジェニック動物、好ましくは非ヒト動物は、米国特許第5,489,743号およびPCT国際公開第94/28122号（参照により本明細書に援用される）に記載される方法を用いて生産される。

20

【0152】

本発明のポリヌクレオチドのプロモーターのすべてまたは一部が本発明のポリペプチドの発現のレベルを変更するように活性化または不活性化されたトランスジェニック動物を調製することができる。不活性化は、上述の相同組換え方法を用いて実施することができる。活性化は、タンパク質発現の増加を提供するために、相同プロモーターを補充するか、さらには置き換えることにより達成することができる。相同プロモーターは、特定の組織におけるプロモーター活性化を付与することが知られている1つまたはそれより多い異種エンハンサー要素の挿入により補充することができる。

30

【0153】

4.7 ヒト幹細胞成長因子様ポリペプチドの使用および生物活性
幹細胞成長因子様活性を有する本発明のポリペプチドは、細胞成長および形態形成（造血幹細胞成長を含む）、上皮細胞成長および調節、卵胞発達、神経細胞成長の促進、神経細胞集団の維持、軟骨再構築、創傷修復、免疫抑制、および血管再構築に有用であるが、これらに限定されない。したがって、本発明のポリペプチドは、創傷治癒、成長および発達、軟骨成長および発達の調節、血管再構築（血管新生）、免疫抑制、卵胞成長および発達、ならびに神経突起成長および発達により引き起こされるか、またはそれらを含む障害および疾患の予防あるいは治療に使用することができるが、これらに限定されない。本発明のポリペプチドはまた、移植片 (transplant) または上皮移植片 (epidermal graft) の生産および維持に使用することもできる。

40

【0154】

本発明のポリヌクレオチドおよびタンパク質は、本明細書中で特定される1つまたはそれより多い使用または生物活性（本明細書中で引用したアッセイに関連するものを含む）を

50

示すことが予想される。本発明のタンパク質に関して記載される使用または活性は、かかるタンパク質、またはかかるタンパク質をコードするポリヌクレオチドの投与あるいは使用（例えば、遺伝子治療、またはDNAの導入に適したベクターにおいて）により提供され得る。特定の状態または病理学の基礎となるメカニズムは、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、またはそれらのモジュレータ（活性化剤または阻害剤）が治療を必要とする被験体にとって有用であるかどうかに影響する。したがって、「本発明の治療用組成物」は、本発明の単離されたポリヌクレオチド（組換えDNA分子、クローニングした遺伝子およびそれらの縮重変異体）またはポリペプチド（完全長タンパク質、成熟タンパク質、およびそれらの切断型またはドメインを含む）、あるいは標的遺伝子／タンパク質発現または標的タンパク質活性のレベルで標的遺伝子産物の活性全体を調節する化合物および他の物質を含む組成物を包含する。かかるモジュレータとしては、ポリペプチド、断片および融合タンパク質を含む類似体（変異体）、抗体および他の結合タンパク質、本発明のポリペプチドを直接もしくは間接的に活性化または阻害する化学化合物（例えば、本明細書中に記載される薬剤スクリーニングアッセイにより特定される）、アンチセンスポリヌクレオチドおよび三重らせん形成に適したポリヌクレオチド、および特に本発明のポリペプチドの1つまたはそれより多いエピトープを特異的に認識する抗体または他の結合パートナーが挙げられる。

10

【0155】

同様に、本発明のポリペプチドは、細胞活性化、または本明細書中に記載される他の生物学的経路に関与され得る。

20

【0156】

4. 7. 1 研究用途および有用性

本発明により提供されるポリヌクレオチドは、様々な目的で研究団体により使用され得る。ポリヌクレオチドは、分析、特性化または治療用途のために、相当するタンパク質が選択的に発現される（構成的に、あるいは組織分化または発達の特定段階にて、または疾患状態において）組織用マーカーとして、ゲル上の分子量マーカーとして、染色体を特定するため、または関連遺伝子の位置をマッピングするための染色体マーカーあるいはタグ（標識される場合）として、潜在的遺伝病を特定するために患者における内因性DNA配列と比較するために、新規関連DNA配列をハイブリダイズする、したがってそれを発見するためのプローブとして、遺伝子フィンガープリンティング用のPCRプライマーを誘導するための情報源として、他の新規ポリヌクレオチドを発見するプロセスにおいて既知の配列を「差し引く（subtract-out）」するためのプローブとして、例えば発現パターンの検査のための「遺伝子チップ」または他の支持体へ結合するためのオリゴマーを選定および作製するために、DNA免疫化技法を用いて抗タンパク質抗体を産生するために、また抗DNA抗体を産生するか、別の免疫応答を誘発するための抗原として、組換えタンパク質を発現するのに使用することができる。ポリヌクレオチドが別のタンパク質に結合するか、または結合する可能性がある（例えば受容体ーリガンド相互作用において）タンパク質をコードする場合、ポリヌクレオチドはまた、結合が行われる他のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを同定するために、あるいは結合相互作用の阻害剤を特定するために、インタラクショントラップアッセイ [例えば、Gyuris et al . , Cell , 75 : 791 - 803 (1993) に記載されるもののような] で使用することができる。

30

40

【0157】

本発明により提供されるポリペプチドは同様に、生物活性を決定するためのアッセイにおいて、例えばハイスループットスクリーニング用の複数タンパク質パネルにおいて、抗体を産生するか、または別の免疫応答を誘発するために、生物学的液体中のタンパク質（またはその受容体）のレベルを定量的に測定するように設計したアッセイにおける試薬（標識試薬を含む）として、相当するポリペプチドが優先的に発現される（構成的に、あるいは組織分化または発達の特定段階にて、または疾患状態において）組織用マーカーとして、および当然のことながら相互関係にある受容体またはリガンドを単離するために使用す

50

ることができる。これらの結合相互作用に關与するタンパク質はまた、結合相互作用のペプチドもしくは小分子阻害剤またはアンタゴニストに關してスクリーニングするのに使用することができる。

【0158】

本發明のポリペプチドはまた、幹細胞成長因子様タンパク質と特異的に免疫反応性を有する抗体物質を作製するのにも有用である。本發明のポリペプチドに結合する抗体およびそれらの一部（例えば、Fab断片）は、試料中のかかるポリペプチドの存在を特定するのに使用することができる。かかる決定は、任意の免疫アッセイ方式を用いて実施され、抗体が特異的に結合する本發明の任意のポリペプチドは、陽性対照として使用することができる。

10

【0159】

これらの研究有用性のいずれかまたはすべてが、研究産物として商業化のための試薬等級またはキット方式に開発され得る。

【0160】

上記に列挙した用途を実施する方法が、当業者に既知である。かかる方法を開示する参考文献としては、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis eds., 1989、およびMethods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques, Academic Press, Berger, S. L. and A. R. Kimmel eds., 1987が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0161】

4. 7. 2 サイトカインおよび細胞増殖／分化活性

本發明のポリペプチドは、サイトカインに關連する活性、細胞増殖（誘発または阻害を含む）または細胞分化（誘発または阻害を含む）活性を示してもよく、あるいはある特定の細胞集団における他のサイトカインの産生を誘発してもよい。本發明のポリヌクレオチドは、かかる属性を示すポリペプチドをコードすることができる。既知のサイトカインすべてを含む現在までに発見された多くのタンパク質因子が、1つまたはそれより多い因子依存性細胞増殖アッセイにおける活性を示し、したがってアッセイは、サイトカイン活性の利便性のよい確認として作用する。本發明の治療用組成物の活性は、32D、DA2、DA1G、T10、B9、B9/11、BAF3、MC9/G、M+（プレB M+）、2E8、RB5、DA1、123、T1165、HT2、CTL2、TF-1、Mo7e、CMK、HUVEC、およびCacoを含むが、これらに限定されない細胞系に關する多数のルーチンな因子依存性細胞増殖アッセイのいずれか1つにより立証される。本發明の治療用組成物は、以下のアッセイで使用するすることができる。

30

【0162】

T細胞または胸腺細胞増殖に關するアッセイとしては、Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7 Immunologic studies in Humans)、Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500 (1986)、Bertagnoli et al., J. Immunol., 145:1706-1712 (1990)、Bertagnoli et al., Cellular Immunology, 133:327-341 (1991)、Bertagnoli et al., J. Immunol. 149:3778-3783 (1992)、およびBowman et al., J. Immunol. 152:1

40

50

756-1761 (1994)に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0163】

脾細胞、リンパ節細胞または胸腺細胞のサイトカイン産生および／または増殖に関するアッセイとしては、Polyclonal T cell stimulation, Kruisbeek, A. M. and Shevach, E. M. In Current Protocols in Immunology, J. E. e. a. Coligan eds. Vol 1, pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto, 1994、およびMeasurement of mouse and human interleukin-g, Schreiber, R. D. In Current Protocols in Immunology. J. E. e. a. Coligan eds. Vol 1, pp. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto, 1994に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0164】

造血細胞およびリンパ球産生細胞の増殖および分化に関するアッセイとしては、Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4, Bottomly, K., Davis, L. S. and Lipsky, P. E. In Current Protocols in Immunology. J. E. e. a. Coligan eds. Vol 1, pp. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, Toronto, 1991、deVries et al., J. Exp. Med., 173., 1205-1211 (1991)、Moreau et al., Nature, 336: 690-692 (1988)、Greenberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80:2931-2938 (1983)、Measurement of mouse and human interleukin-6-Nordan, R. In Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol. 1, pp. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto, 1991、Smith et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 83:1857-1861 (1986)、Measurement of human Interleukin 11-Bennett, F., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J. In Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol 1, pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, Toronto, 1991、Measurement of mouse and human Interleukin 9-Ciarletta, A., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J. In Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol 1, pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto, 1991に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0165】

抗原に対するT細胞クローン応答に関するアッセイ（増殖およびサイトカイン産生を測定することにより、とりわけAPC-T細胞相互作用ならびに直接的T細胞の影響に影響を及ぼすタンパク質を特定する）としては、Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strobe, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function; Chapter 6

, Cytokines and their cellular receptors; Chapter 7, Immunologic studies in Humans), Weinberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:6091-6095 (1980)、Weinberger et al., Eur. J. Immun., 11:405-411 (1981)、Takai et al., J. Immunol., 137:3494-3500 (1986)、Takai et al., J. Immunol., 140:508-512 (1988)に記載されるものが挙げられるが、それらに限定されない。

【0166】

4. 7. 3 幹細胞成長因子活性

本発明のポリペプチドは、幹細胞成長因子活性を示してもよく、また始原生殖細胞、胚幹細胞、造血幹細胞、および／または生殖細胞系幹細胞を含む多能性および全能性細胞の増殖、分化ならびに生存に関与され得る。in vivoまたはex vivoでの幹細胞への本発明のポリペプチドの投与は、損傷した組織または罹患した組織の再操作、移植、バイオ医薬品の製造、およびバイオセンサの開発に有用な全能性または多能性状態で、細胞集団を維持および拡大し得る。大量のヒト細胞を生産する能力は、非ヒト供給源またはドナーから現在得られるにちがいないヒトタンパク質の産生、パーキンソン病、アルツハイマー病、および他の神経変性疾患のような疾患の治療のための細胞移植、骨髄、皮膚、軟骨、腱、骨、筋肉（心筋を含む）、血管、角膜、神経細胞、胃腸細胞等のような移植用の組織、ならびに腎臓、肝臓、膵臓（島細胞を含む）、心臓および肺のような移植用の臓器用の重要な実用的用途を有する。

10

20

【0167】

所望の影響を達成するために、本明細書中に列挙した成長因子のいずれか、他の幹細胞維持因子を含む、具体的には幹細胞因子（SCF）、白血病阻害因子（LIF）、Flt-3リガンド（Flt-3）、インターロイキンのいずれか、IL-6に融合された組換え可溶性IL-6受容体、マクロファージ炎症性タンパク質1α（MIP-1α）、G-CSF、GM-CSF、トロンボポエチン（TPO）、血小板第4因子（PF-4）、血小板由来成長因子（PDGF）、神経成長因子および塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）を含む複数の異なる外因性成長因子および／またはサイトカインを、本発明のポリペプチドと併用して投与してもよいことが意図される。

30

【0168】

全能性幹細胞は、事実上任意の成熟細胞型を生じることができ、培養でのこれらの細胞の増幅は、大量の成熟細胞の産生を促進する。幹細胞を培養する技法は、当該技術分野で既知であり、任意に他の成長因子および／またはサイトカインとともに本発明のポリペプチドを投与することにより、幹細胞集団の生存および増殖を増大することが期待される。これは、培地に本発明のポリペプチドを直接投与することにより達成することができる。あるいは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトされた間質細胞は、培養において、またはin vivoで、幹細胞集団用の支持細胞層として使用することができる。支持細胞層用の間質支持細胞としては、胚骨髄線維芽細胞、骨髄間質細胞、胎児肝臓細胞、または培養胚線維芽細胞が挙げられ得る（米国特許第5,690,926号を参照）。

40

【0169】

幹細胞自体は、本発明のポリペプチドの自己分泌発現を誘発するために、本発明のポリヌクレオチドでトランスフェクトすることができる。これにより、それ自体有用であるか、または続いて所望の成熟細胞型に分化することができる未分化全能性／多能性幹細胞系の生成が可能となる。これらの安定な細胞系はまた、ポリメラーゼ連鎖反応実験用のcDNAライブラリーおよび鋳型を創出するための、未分化全能性／多能性mRNAの供給源として作用することができる。これらの研究により、幹細胞増殖および／または維持を調節する幹細胞集団において差次的に発現される遺伝子の単離および特定が可能となる。

【0170】

50

全能性幹細胞集団の増幅および維持は、多くの病理学的状態の治療に有用である。例えば、本発明のポリペプチドは、疾病、自己免疫疾患、事故による損傷、または遺伝病により損傷した細胞を増強するか、あるいは置き換えるのに使用することができる神経上皮細胞を生じるように、培養において幹細胞を操作するのに使用され得る。本発明のポリペプチドは、神経細胞の増殖を誘発するのに、また神経および脳組織の再生に、すなわち中枢神経系および末梢神経系疾患ならびに神経障害、ならびに神経細胞もしくは神経組織に対する変性、死または外傷を含む機械的および外傷性障害に治療に有用であり得る。さらに、これらの細胞は、移植に使用することができる皮膚組織のような他の分化細胞を形成するために、*in vitro*で培養することができる。さらに、増幅した幹細胞集団はまた、遺伝子治療の目的で、また移植または組織移植後の置換組織の宿主拒絶を減少するために、遺伝的に改変させることもできる。 10

【0171】

本発明のポリペプチドの発現、および幹細胞に対するその影響はまた、より分化した細胞型への制御された幹細胞の分化を達成するように操作され得る。未分化幹細胞集団から特定の分化細胞型を有する純粋な集団を得る広範に適用可能な方法は、選択マーカーを駆動する細胞型特異的プロモーターの使用を含む。選択マーカーは、所望の型を有する細胞のみを生存させることが可能である。例えば、幹細胞は、心筋細胞 [Wobus et al., *Differentiation*, 48:173-182, 1991]; Klug et al., *J. Clin. Invest.*, 98(1):216-224, (1998)]、または骨格筋細胞 [Browder, L. W. In: *Principles of Tissue Engineering* eds. Lanza et al., Academic Press (1997)] に分化するように誘発させることができる。あるいは、幹細胞の指向性分化は、レチノイン酸、および内因性幹細胞因子活性の影響を阻害し、分化を進行させることが可能な本発明のポリペプチドのアンタゴニストのような分化因子の存在下で幹細胞を培養することで達成され得る。 20

【0172】

幹細胞の *in vitro* 培養物は、本発明のポリペプチドが幹細胞成長因子活性を示すかどうかを決定するのに使用することができる。幹細胞は、様々な細胞源（造血幹細胞および胚幹細胞を含む）のいずれか1つから単離され、Thompson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 92:7844-7848 (1995) に記載されるように、本発明のポリペプチド単独の存在下で、あるいは他の成長因子またはサイトカインと併用して、支持細胞層上で培養される。本発明のポリペプチドの、幹細胞増殖を誘発する能力は、Bernstein et al., *Blood*, 77:2316-2321 (1991) に記載されるように、半固体支持体上のコロニー形成により決定される。 30

【0173】

4. 7. 4 造血調節活性

本発明のポリペプチドは、造血の調節に、したがって骨髓性細胞またはリンパ系細胞障害の治療に関与され得る。コロニー形成細胞または因子依存性細胞系を支持する最低限の生物活性でさえ、造血の調節、例えば単独または他のサイトカインと併用した赤血球前駆細胞の成長および増殖の支持への関与を示し、それにより、例えば様々な貧血の治療における、あるいは赤血球前駆細胞および／または赤血球細胞の産生を刺激するための照射／化学療法と併用した使用のための、例えば必然的な骨髓抑制を阻止または治療するための化学療法と併用して有用な顆粒球および単球／マクロファージのような骨髓性細胞の成長ならびに増殖（すなわち、伝統的なコロニー刺激因子活性）を支持する際の、巨核球、したがって血小板の成長および増殖を支持する（それにより血小板減少症のような様々な血小板障害の阻止または治療を可能にする）際の、および上述の造血細胞のいずれかおよびすべてに成熟することが可能であり、したがって様々な幹細胞障害（再生不良性貧血、および発作性夜間血色素尿症が挙げられるが、これらに限定されない、通常移植で治療されるもののような）における治療上の有用性を有する造血幹細胞の成長および増殖を支持する 40 50

際の、ならびに正常細胞または遺伝子治療用に遺伝子操作した細胞として、*in vivo*または*ex vivo*のいずれかで照射／化学療法後のすなわち、骨髄移植または末梢前駆細胞移植（同種または異種）と併用した）幹細胞区画の調節の際の有用性を示す。

【0174】

本発明の治療用組成物は、以下のアッセイで 사용할 ことができる：

【0175】

様々な造血系の増殖および分化に適したアッセイについて上述している。

【0176】

胚幹細胞分化に関するアッセイ（とりわけ、胚分化造血に影響を与えるタンパク質を特定する）としては、Johansson et al., Cellular Biology 15:141-151, 1995、Kellar et al., Molecular and Cellular Biology 13:473-486 (1993)、McC lanahan et al., Blood 81:2903-2915 (1993) に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0177】

幹細胞生存および分化（とりわけ、リンパ性造血を調節するタンパク質を特定する）に関するアッセイとしては、Methylcellulose colony forming assays, Freshney, M. G. In Culture of Hematopoietic Cells. R. I. Freshney, et al. eds. Vol pp. 265-268, Wiley-Liss, Inc., New York, M. Y. 1994、Hirayama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5807-5911 (1992)、Primitive hematopoietic colony forming cells with high proliferative potential, McNiece, I. K. and Briddell, R. A. In Culture of Hematopoietic Cells. R. I. Freshney et al. eds. Vol pp. 23-29, Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. 1994、Neben et al., Experimental Hematology 22:353-359 (1994)、Cobblestone area forming cell assay, Ploemacher, R. E. In Culture of Hematopoietic Cells. R. I. Freshney, et al. eds. Vol pp. 1-21, Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. 1994、Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells, Spooncer, E., Dexter, M. and Allen, T. In Culture of Hematopoietic Cells. R. I. Freshney, et al. eds. Vol pp. 163-179, Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. 1994、Long term culture initiating cell assay, Sutherland, H. J. In Culture of Hematopoietic Cells. R. I. Freshney, et al. eds. Vol pp. 139-162, Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. 1994に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0178】

4. 7. 5 組織成長活性

本発明のポリペプチドはまた、骨、軟骨、腱、靱帯および／または神経組織成長あるいは再生、ならびに創傷治癒、および組織修復および置換、ならびに火傷、切開および潰瘍の治癒に関与され得る。

【0179】

骨が正常に形成されない状況で軟骨および／骨成長を誘発する本発明のポリペプチドは、

ヒトおよび他の動物において、骨折および軟骨損傷または欠陥の治癒での用途がある。本発明のポリペプチド、抗体、結合パートナー、または他のモジュレータの組成物は、閉鎖骨折ならびに開放骨折の低減、また人工関節の固定の改善において、予防的用途があり得る。骨形成剤により誘発されるデノボ骨形成は、先天性の外傷誘発性または腫瘍学的切除誘発性頭蓋顔面欠陥の修復に寄与し、また美容整形術においても有用である。

【0180】

本発明のポリペプチドはまた、骨形成細胞の誘引、骨形成細胞の成長の刺激、または骨形成細胞の前駆体の分化の誘発に関与され得る。例えば骨および／または軟骨修復の刺激によるか、または炎症もしくは炎症プロセスにより媒介される組織破壊プロセスの阻止（コラゲナーゼ活性、骨芽細胞活性等）による骨粗鬆症、変形性関節症、骨変性障害、または歯周病の治療もまた、本発明を用いて可能であり得る。 10

【0181】

本発明のポリペプチドを含む組織再生活性の別のカテゴリーは、腱／靱帯の形成である。以下の組織が正常に形成される状況における腱／靱帯様組織の誘発、または他の組織形成は、ヒトおよび他の動物における腱または靱帯の断裂、変形、および他の腱または靱帯の欠陥の治癒における用途がある。腱／靱帯様組織誘発タンパク質を用いたかかる調製物は、腱または靱帯組織に対する損傷の防止における予防的用途、ならびに骨もしくは他の組織に対する腱または靱帯の固定の改善、および腱または靱帯組織に対する欠陥の修復における用途があり得る。本発明の組成物により誘発されるデノボ腱／靱帯様組織形成は、先天性の外傷誘発性または他の腱もしくは他の起源の靱帯欠陥の修復に寄与し、また腱もしくは靱帯の付着または修復のための美容整形術においても有用である。本発明の組成物は、腱もしくは靱帯形成細胞を付着するための、腱もしくは靱帯形成細胞の成長を刺激するための、腱もしくは靱帯形成細胞の前駆体の分化を誘発するための、または *in vivo* に戻して組織修復を行うための *ex vivo* での腱／靱帯細胞もしくは前駆体の成長を誘発するための環境を提供し得る。本発明の組成物はまた、腱炎、手根管症候群、および他の腱または靱帯の欠陥の治療においても有用であり得る。組成物はまた、当該技術分野で既知であるように、キャリアとして適切なマトリックスおよび／または金属イオン封鎖剤を含んでもよい。 20

【0182】

本発明の組成物はまた、神経細胞の増殖、神経および脳組織の再生、すなわち中枢神経系および末梢神経系疾患および神経障害、ならびに神経細胞もしくは神経組織に対する変性、死または外傷を含む機械的および外傷性障害に治療に有用であり得る。より具体的には、組成物は、末梢神経損傷、末梢神経障害および限局性神経障害のような末梢神経系の疾患、およびアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンティングトン病、筋萎縮性側索硬化症、およびシャイードレーガー症候群のようは中枢神経系疾患の治療に使用され得る。さらに、本発明により治療され得る状態としては、脊髄障害、頭部外傷ならびに発作のような脳血管疾患のような、機械的および外傷性障害が挙げられる。化学療法または他の医療に起因する末梢神経障害も、本発明の組成物を用いて治療可能であり得る。 30

【0183】

本発明の組成物はまた、圧迫性潰瘍、血管不全に関連した潰瘍、手術による創傷および外傷性創傷等を含むが、これらに限定されない、非治癒性創傷のより良好な、あるいはより迅速な閉鎖を促進するのに有用であり得る。 40

【0184】

本発明の組成物は、臓器（例えば、脾臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、内皮を含む）、筋肉（平滑筋、骨格筋、または心筋）、および血管（血管内皮を含む）組織のような他の組織の生成または再生に、あるいはかかる組織を含む細胞の成長を促進するために包含され得る。線維性瘢痕の阻害または調節による所望の効果の一部は、正常組織が再生することを可能にする。本発明のポリペプチドはまた、血管新生活性を示してもよい。

【0185】

本発明の組成物はまた、腸の保護、または肺もしくは肝臓線維症、様々な組織における再 50

灌流障害、および全身性サイトカイン損傷に起因する状態の再生ならびに治療に有用であり得る。

【0186】

本発明の組成物は、前駆組織もしくは細胞からの上述の組織の分化を促進または阻害するのに、あるいは上述の組織の成長を阻害するのに有用であり得る。

【0187】

また、本発明の治療用組成物は、以下のアッセイに使用することができる：

【0188】

組織生成活性に関するアッセイとしては、国際特許公開第95/16035号（骨、軟骨、腱）、国際特許公開第95/05846号（神経、ニューロン）、国際特許公開第91/07491号（皮膚、内皮）に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0189】

創傷治癒活性に関するアッセイとしては、Winter, Epidermal Wound Healing, pp. 71-112 (Maibach, H. I. and Roove, D. T., eds.), Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago (Eaglstain and Mertz, J. Invest. Dermatol, 71:382-84 (1978) により修正)に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0190】

4. 7. 6. 免疫機能刺激または抑制活性

本発明のポリペプチドはまた、そのアッセイについて本明細書中に記載されている活性を含むが、これらに限定されない免疫刺激または免疫抑制活性を示し得る。本発明のポリヌクレオチドは、かかる活性を示すポリペプチドをコードすることができる。タンパク質は、様々な免疫不全および障害（重症複合型免疫不全（SCID）を含む）の治療において、例えば、Tおよび/またはBリンパ球の成長および増殖を調節（アップレギュレートまたはダウンレギュレート）する際に、ならびにNK細胞および他の細胞集団の細胞溶解活性を達成する際に有用であり得る。これらの免疫不全は、遺伝性であったり、またはウイルス（例えばHIV）ならびに細菌もしくは真菌感染により引き起こされたり、あるいは自己免疫障害に起因したりする。より具体的には、HIV、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、ミコバクテリア、リーシュマニア（Leishmania）種、マラリア種による感染、およびカンジダ症のような様々な真菌ウイルスを含む、ウイルス、細菌、真菌または他の感染により引き起こされる感染性疾患は、本発明のタンパク質を用いて治療可能であり得る。当然のことながら、本発明のタンパク質はまた、免疫系に対するブーストが望ましい可能性がある場合に、すなわち癌治療において有用であり得る。

【0191】

本発明のタンパク質を用いて治療され得る自己免疫疾患としては、例えば、結合組織疾患、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、自己免疫肺性炎症、ギヤンパーレー症候群、自己免疫性甲状腺炎、インスリン依存性糖尿病、重症筋無力症、対宿主性移植片病、および自己免疫炎症性眼病が挙げられる。本発明のかかるタンパク質（または抗体を含むそれらのアンタゴニスト）はまた、喘息（特にアレルギー喘息）や他の呼吸器系の問題、アレルギー反応および状態（例えば、アナフィラキシー、血清病、薬剤反応、食物アレルギー、昆虫毒アレルギー、肥満、アレルギー性鼻炎、過敏性肺炎、じんま疹、血管性水腫、湿疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、多形性紅斑、ステューヴンズ-ジョンソン症候群、アレルギー性結膜炎、萎縮性角結膜炎、性病性角結膜炎、巨大乳頭結膜炎、および接触アレルギー）の治療に有用であり得る。免疫抑制が望ましい他の状態（例えば、臓器移植を含む）もまた、本発明のタンパク質（またはそれらのアンタゴニスト）で治療可能であり得る。ポリペプチドまたはそのアンタゴニストの、アレルギー反応に対する治療効果は、累積接触増強試験（Lastbomet al., Toxicology, 125:59-66 (1988)）、皮膚プリック試験（Hof 40 50

fmann et al., Allergy, 54: 446-54 (1999))、モルモット皮膚感作試験 (Vohr et al., Arch. Toxicol., 73: 501-9)、およびマウス局所リンパ節アッセイ (Kimber et al., J. Toxicol. Environ. Health, 53: 563-79) のような in vivo 動物モデルにより評価することができる。

【0192】

本発明のタンパク質を用いて、多数の方法で、免疫応答を調節することも可能である。ダウンレギュレーションは、すでに進行中の免疫応答を阻害または阻止する形態であってもよく、あるいは免疫応答の誘発を防止してもよい。活性T細胞の機能は、T細胞応答を抑制することにより、またはT細胞における特定の許容性を誘発することにより、あるいはその両方により阻害され得る。T細胞応答の免疫抑制は一般に、活性な抗原非特異的な、抑制剤へのT細胞の連続暴露を要するプロセスである。T細胞における非応答性またはアネルギーの誘発を含む許容性は、それが概して抗原特異的であるという点で、免疫抑制と識別可能であり、寛容化剤へのT細胞の暴露をやめた後に持続する。操作上、許容性は、寛容化剤の非存在下に特定の抗原への再暴露時のT細胞応答の欠如により実証され得る。

10

【0193】

1つまたはそれより多い抗原機能 (Bリンパ球抗原機能 (例えば、B7のような) ただしこれに限らない) をダウンレギュレートまたは防止すること、例えば活性T細胞による高レベルリンホカイン合成を防止することは、組織、皮膚、および臓器の移植の状況で、また対宿主性移植片病 (GVHD) で有用である。例えば、T細胞機能の阻止は、組織移植における組織破壊の減少をもたらすはずである。通常、組織移植片では、移植片の拒絶は、T細胞により外来物としてのその認識に開始され、続いて移植片を破壊する免疫反応が起きる。本発明の治療用組成物の投与は、T細胞のような免疫細胞によるサイトカイン合成を防止してもよく、したがって免疫抑制剤として作用する。さらに、同時刺激の欠如はまた、T細胞をアナジーとする (anergize) に十分であり得て、それにより被験体において許容性を誘発する。Bリンパ球抗原阻止試薬による長期許容性の誘発は、これらの阻止試薬の繰り返し投与の必要性を回避し得る。被験体において十分な免疫抑制または許容性を達成するために、B細胞リンパ球抗原の組み合わせの機能を阻止することが必要である場合もある。

20

【0194】

臓器移植片拒絶またはGVHDを防止する際の特定の治療用組成物の有効性は、ヒトにおける有効性を予測する動物モデルを用いて評価することができる。使用することができる適切な系の例としては、ラットにおける同種異系心臓移植片、およびマウスにおける異種脾臓細胞移植片が挙げられ、その両方が、Lenschow et al., Science 257: 789-792 (1992)、およびTurka et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 11102-11105 (1992) に記載されるように、in vivoでCTLA4Ig融合タンパク質の免疫抑制効果を検査するのに使用されている。さらに、GVHDのマウスモデル [Paul et al., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 846-847参照] は、当該疾患の発達に対する本発明の治療用組成物の影響を決定するのに使用することができる。

30

40

【0195】

抗原機能の阻止はまた、自己免疫疾患を治療するのに治療上有用であり得る。多くの自己免疫障害は、自己組織に対して反応性であり、疾患の病理学に関与するサイトカインおよび自己抗体の産生を促進するT細胞の不適切な活性化の結果である。自己反応性T細胞の活性化の防止は、病状を減少または排除し得る。T細胞の刺激を阻止する試薬の投与は、T細胞活性化を阻害し、疾患プロセスに関与され得る自己抗体またはT細胞由来サイトカインの産生を防止するのに使用することができる。さらに、阻止試薬は、疾患からの長期軽減を招くことができる自己反応性T細胞の抗原特異的許容性を誘発し得る。自己免疫障害を防止または軽減する際の阻止試薬の有効性は、ヒト自己免疫疾患の多数の十分に特性

50

化された動物モデルを用いて決定することができる。例としては、マウス実験用自己免疫脳炎、MRL/lpr/lprマウスまたはNZBハイブリッドマウスにおける全身性エリテマトーデス、マウス自己免疫コラーゲン関節炎、NODマウスおよびBBラットにおける糖尿病、ならびにマウス実験用筋無力症が挙げられる [Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 840-856を参照]。

【0196】

免疫応答をアップレギュレートする手段としての抗原機能（例えば、Bリンパ球抗原機能）のアップレギュレーションもまた、治療において有用であり得る。免疫応答のアップレギュレーションは、既存の免疫応答を増強するか、または初期免疫応答を誘発する形態であり得る。例えば、免疫応答の増強は、インフルエンザ、感冒、および脳炎のような全身性ウイルス疾患を含むウイルス感染の場合に有用であり得る。 10

【0197】

あるいは、抗ウイルス免疫応答は、患者からT細胞を取り出すことと、本発明のペプチドを発現するか、または本発明の刺激形態の可溶性ペプチドを有するウイルス抗原パルスAPCにより、*in vitro*でT細胞を同時刺激することと、*in vitro*で活性化したT細胞を患者に再導入することにより、感染患者において高められ得る。抗ウイルス免疫応答を増強する別の方法は、患者から感染細胞を単離し、細胞がそれらの表面上でタンパク質のすべてまたは一部を発現するように、本明細書中に記載するような本発明のタンパク質をコードする核酸でそれらをトランスフェクトし、トランスフェクトした細胞を患者に再導入することである。ここで感染細胞は、同時刺激シグナルを、*in vivo*でT細胞に送達することが可能であり、それにより*in vivo*でT細胞を活性化することが可能である。 20

【0198】

本発明のポリペプチドは、トランスフェクトした腫瘍細胞に対するT細胞媒介性免疫応答を誘発するために、T細胞に対して必要な刺激シグナルを提供し得る。さらに、MHCクラスIまたはMHCクラスII分子を欠如するか、あるいは十分量のMHCクラスIまたはMHCクラスII分子を再発現することができない腫瘍細胞を、MHCクラスIα鎖タンパク質およびb₂ミクログロブリンタンパク質、またはMHCクラスIIα鎖タンパク質およびMHCクラスIIβ鎖タンパク質のすべてまたは一部（例えば、細胞質ドメイン切断型部分）をコードする核酸でトランスフェクトして、それにより細胞表面上でMHCクラスIまたはMHCクラスIIタンパク質を発現することができる。Bリンパ球抗原（例えば、B7-1、B7-2、B7-3）の活性を有するペプチドと併せた適切なクラスIまたはクラスII MHCの発現は、トランスフェクトした腫瘍細胞に対するT細胞媒介性免疫応答を誘発する。任意に、不変鎖のようなMHCクラスII関連タンパク質の発現を阻止するアンチセンス構築物をコードする遺伝子はまた、腫瘍関連抗原の提示を促進し、腫瘍特異的免疫性を誘発する、Bリンパ球抗原の活性を有するペプチドをコードするDNAで同時トランスフェクトすることができる。したがって、ヒト被験体におけるT細胞媒介性免疫応答の誘発は、被験体における腫瘍特異的許容性を克服するのに十分であり得る。 30 40

【0199】

本発明のタンパク質の活性は、他の手段の中でも、以下の方法により測定され得る。

【0200】

胸腺細胞または脾細胞細胞障害性に関する適切なアッセイとしては、Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studi 50

es in Humans)、Heermann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2488-2492 (1981)、Herrmann et al., J. Immunol., 128:1968-1974 (1982)、Handa et al., J. Immunol., 135:1564-1572 (1985)、Takai et al., I. Immunol., 137:3494-3500 (1986)、Takai et al., J. Immunol., 140:508-512 (1988)、Bowman et al., J. Virology, 61:1992-1998、Bertagnolli et al., Cellular Immunology, 133:327-341 (1991)、Brown et al., J. Immunol., 153:3079-3092 (1994)に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。 10

【0201】

T細胞依存性免疫グロブリン応答およびアイソタイプ転換（とりわけT細胞依存性抗体応答を調節し、Th1/Th2プロフィールに影響を及ぼすタンパク質を同定する）に関するアッセイとしては、Maliszewski, J. Immunol. 144:3028-3033 (1990)に記載されるもの、およびB細胞機能に関するアッセイ（In vitro antibody production, Mond, J. J. and Brunswick, M. In Current Protocols in Immunology. J. E. e. a. Coligan eds. Vol 1, pp. 3. 8. 1-3. 8. 16, John Wiley and Sons, Toronto 20, 1994）が挙げられるが、それらに限定されない。

【0202】

混合リンパ球反応（MLR）アッセイ（とりわけ主にTh1およびCTL応答を生成するタンパク質を同定する）としては、Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3. 1-3. 19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans)、Takai et al., J. Immunol., 137:3494-3500 (1986)、Takai et al., J. Immunol., 140:508-512 (1988)、Bertagnolli et al., J. Immunol., 149:3778-3783 (1992)に記載されるものが挙げられるが、それらに限定されない。 30

【0203】

樹状細胞依存性アッセイ（とりわけ自然T細胞を活性化する樹状細胞により発現されるタンパク質を同定する）としては、Guery et al., J. Immunol. 134:536-544 (1995)、Inaba et al., Journal of Experimental Medicine, 173:549-559 (1991) 40、Macatonia et al., Journal of Immunology, 154:5071-5079 (1995)、Porgador et al., Journal of Experimental Medicine, 182:255-260 (1995)、Nair et al., Journal of Virology, 67:4062-4069 (1993)、Huang et al., Science, 264:961-965 (1994)、Macatonia et al., Jpurnal of Experimental Medicine 169:1255-1264 (1989)、Bhardwaj et al., Journal of Clinical Investigation 94:797-807 (1994)、およびInaba et al., Journal of Experimental Medicine, 172 50

：631-640（1990）に記載されるものが挙げられるが、それらに限定されない。

【0204】

リンパ球生存／アポトーシスに関するアッセイ（とりわけスーパー抗原誘発後のアポトーシスを防止するタンパク質、およびリンパ球ホメオスタシスを調節するタンパク質を同定する）としては、Darzynkiewicz et al., Cytometry 13 : 795-808（1992）、Gorczyca et al., Leukemia, 7 : 659-670（1993）、Gorczyca et al., Cancer Research, 53 : 1945-1951（1993）、Itoh et al., Cell, 66 : 233-243（1991）、Zacharchuk, Journal of Immunology, 145 : 4037-4045（1990）、Zam
ai et al., Cytometry, 14 : 891-897（1993）、G
orczyca et al., International Journal of Onc
ology 1 : 639-648（1992）に記載されるものが挙げられるが、それら
に限定されない。

【0205】

T細胞収容（commitment）および発達の初期工程に影響を与えるタンパク質に
関するアッセイとしては、Antica et al., Blood, 84 : 111-1
17（1994）、Fine et al., Cellular Immunology
, 155 : 111-112（1994）、Galy et al., Blood, 85
: 2770-2778（1995）、Toki et al., Proc. Nat. A
cad. Sci. USA, 88 : 7548-7551（1991）に記載されるもの
が挙げられるが、それらに限定されない。

【0206】

4. 7. 7 走化性／ケモキネシス活性

本発明のポリペプチドは、例えば、単球、線維芽細胞、好中球、T細胞、肥満細胞、好酸
球、上皮および／または内皮細胞などの哺乳動物細胞の走化性またはケモキネシス活性に
関与され得る。本発明のポリヌクレオチドは、かかる属性を示すポリペプチドをコードす
ることができる。走化性およびケモキネシス受容体活性化は、所望の作用部位に、所望の
細胞集団を動員または誘引するのに使用することができる。走化性またはケモキネシス組
成物（例えば、本発明のタンパク質、抗体、結合パートナー、またはモジュレータ）は、
組織の創傷および他の外傷の治療において、ならびに限局性感染の治療において特定の利
点を提供する。例えば、リンパ球、単球、または好中球の、腫瘍または感染部位への誘引
は、腫瘍または感染性作用物質に対する免疫応答の改善をもたらす。

【0207】

タンパク質またはペプチドは、それがかかる細胞集団の指向性配向または移動を直接的あ
るいは間接的に刺激することができる場合に、特定の細胞集団に対する走化性活性を有す
る。好ましくは、タンパク質またはペプチドは、細胞の指向性移動を直接的に刺激する能
力を有する。特定のタンパク質が細胞の集団に対する走化性活性を有するかどうかは、細
胞走化性に関する任意の既知のアッセイにおいて、かかるタンパク質またはペプチドを使
用することで容易に決定することができる。

【0208】

本発明の治療用組成物は、以下のアッセイで使用するすることができる：

【0209】

走化性活性に関するアッセイ（走化性を誘導または防止するタンパク質を同定する）は、
タンパク質の、膜を通過する細胞の遊走を誘導する能力、ならびにタンパク質の、ある細
胞集団の別の細胞集団への接着を誘導する能力を測定するアッセイから構成される。遊走
および接着に適したアッセイとしては、Current Protocols in Im
munology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbee
k, D. H. Marguiles, E. M. Shevach, W. Strober
50

, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 6.12, Measurement of alpha and beta Chemokines 6.12.1-6.12.28)、Taub et al., J. Clin. Invest., 95:1370-1376 (1995)、Lind et al., APMIS, 103:140-146 (1995)、Muller et al., Eur. J. Immunol., 25:1744-1748、Gruber et al., J. of Immunol., 152:5860-5867 (1994)、Johnston et al. J. of Immunol., 153:1762-1768 (1994)に記載されるものが挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0210】

4. 7. 8 止血性および血栓溶解性活性

本発明のポリペプチドはまた、止血製または血栓溶解性または血栓症に関与され得る。本発明のポリヌクレオチドは、かかる属性を示すポリペプチドをコードすることができる。組成物は、様々な凝固障害（血友病のような遺伝性障害を含む）の治療において、あるいは外傷、手術または他の原因に起因する創傷を治療する際に凝固および他の止血事象を高めるために有用であり得る。本発明の組成物はまた、血栓症の形成を溶解または阻害するのに、またそれら（例えば、心臓系および中枢神経系の血管の亀裂（*infraction*））に起因する症状（例えば、発作）のの治療および防止に有用であり得る。

20

【0211】

本発明の治療用組成物は、以下のアッセイで使用するすることができる。

【0212】

止血性および血栓溶解性活性に関するアッセイとしては、Lin et al., J. Clin. Pharmacol., 26:131-140 (1986)、Burdick et al., Thrombosis Res., 45:413-419 (1987)、Humphrey et al., Fibrinolysis, 5:71-79 (1991)、およびSchaub, Prostaglandins 35:467-474 (1988)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0213】

4. 7. 9 癌診断および治療

本発明のポリペプチドは、癌細胞生成、増殖または転移に関与され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの存在または量の検出は、1つまたはそれより多いタイプの癌の診断および／または予後に有用であり得る。例えば、本発明のポリヌクレオチド／ポリペプチドの存在または増加された発現は、癌の遺伝的危険性、前癌状態、または進行中の悪性疾患を示し得る。逆に、本発明のポリペプチドの遺伝子における欠陥、またはそれらの非存在が、癌状態に関連され得る。癌に関連する一塩基多型、あるいは癌に対する素因の特定は、また診断または予後に有用であり得る。

30

【0214】

癌治療は、腫瘍細胞増殖の阻害、血管新生（腫瘍成長を支持するのに必要な新規血管の成長）の阻害、および／または腫瘍細胞の運動性および侵襲性を低減することによる転移の阻止により、腫瘍の後退を促進する。本発明の治療用組成物は、固相腫瘍／悪性疾患、局所進行性腫瘍、ヒト軟部組織肉腫、転移性癌（リンパ転移を含む）、血球悪性疾患（多発性骨髄腫を含む）、急性および慢性白血病、およびリンパ腫、頭部および頸部癌（口腔癌を含む）、喉頭癌および甲状腺癌、肺癌（小細胞癌および非小細胞癌を含む）、乳癌（小細胞癌および腺管癌を含む）、胃腸癌（食道癌、胃癌、結腸癌、結腸直腸癌、および結腸直腸新形成に関連したポリープを含む）、膵臓癌、肝臓癌、泌尿器系癌（膀胱癌および前立腺癌を含む）、女性性器路の悪性疾患（卵巣癌、子宮（子宮内膜を含む）癌、および卵胞中の固形腫瘍を含む）、腎臓癌（腎細胞癌を含む）、脳癌（内因性脳腫瘍を含む）、神経芽腫、星状細胞脳腫瘍、神経膠腫、中枢神経系における転移性腫瘍細胞浸潤、骨癌（骨腫を含む）、皮膚癌（悪性黒色腫、ヒト皮膚ケラチノサイトの腫瘍進行、扁平上皮癌、基

40

50

底細胞癌を含む)、管周囲細胞腫、およびカポージ肉腫を含む、成人および小児腫瘍学で有効であり得る。

【0215】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはポリペプチドのモジュレータ(本発明のポリペプチドの生物活性を有する阻害剤および刺激剤を含む)を投与して、癌を治療してもよい。治療用組成物は、単独で、あるいは手術、化学療法、放射線療法、温熱療法、およびレーザー療法のような補助的癌療法と併用して、治療上有効な投与量で投与することができ、有益な効果、例えば腫瘍サイズの減少、腫瘍成長速度の減速、転移の阻害、あるいはそうでなければ癌を根絶する必要性のない臨床状態全体の改善を提供し得る。

【0216】

組成物はまた、抗癌カクテルの一部として、治療上有効な量で投与することができる。抗癌カクテルは、本発明のポリペプチドまたはモジュレータと、薬学的に許容可能な送達用キャリアのほかに、1つまたはそれより多い抗癌薬剤との混合物である。抗癌カクテルの癌治療薬としての使用はルーチンである。当該技術分野で既知であり、本発明のポリペプチドまたはモジュレータと併用して治療薬として使用することができる抗癌薬としては、アクチノマイシンD、アミノグルテチミド、アスパラギナーゼ、ブレオマイシン、ブルスファン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン(cis-DDP)、シクロホスファミド、シタラビンHCL(シトシンアラビノシド)、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシンHCL、ドキソルビシンHCL、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エトポシド(V16-213)、フロクスウリジン、5-フルオロウラシル(5-Fu)、フルタミド、ヒドロキシ尿素(ヒドロキシカルバミド)、イフォスファミド、インターフェロンα2a、インターフェロンα2b、酢酸ロイプロリド(LHRH放出因子類似体)、ロムスチン、メクロレタミンHCL(ナイトロジェンマスタード)、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート(MTX)、マイトマイシン、ミトザントロンHCL、オクトレオチド、プリカマイシン、プロカルバジンHCL、ストレプトゾシン、クエン酸タモキシフェン、チオグアニン、チオテパ、硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンクリスチン、アムサクリン、アザシチジン、ヘキサメチルメラミン、インターロイキン-2、ミトグアゾン、ペントスタチン、セムスチン、テニポシド、および硫酸ビンデシンが挙げられる。

【0217】

さらに、本発明の治療用組成物は、癌の予防的処理に使用され得る。個体に癌を発生させやすくしている当該技術分野で既知の遺伝的状态および/または環境状況(例えば、発癌物質への暴露)が存在する。これらの条件下では、癌を発生させる危険性を減少するために、治療上有効な用量の本発明のポリペプチドを用いてこれらの患者を処置することが有用であり得る。

【0218】

in vitroモデルは、潜在的癌治療としての本発明のポリペプチドの有効な用量を決定するのに使用することができる。これらのin vitroモデルとしては、培養腫瘍細胞の増殖アッセイ、軟質寒天における培養細胞の成長(例えば、Freshney, (1987) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Wiley-Liss, New York, NY Ch 18 and Ch 21を参照)、Giovanello et al., J. Natl. Can. Inst., 52:921-30 (1974)に記載されるようなヌードマウスにおける腫瘍系、Pilkington et al., Anticancer Res., 17:4107-9 (1997)に記載されるようなBoydenチャンバアッセイにおける腫瘍細胞の移動性および浸潤潜在能力、ならびにそれぞれRibatt et al., Intl. J. Dev. Biol., 40:1189-97 (1999)、およびLi et al., Clin. Exp. Metastasis, 17:423-9 (1999)に記載されるようなヒヨコ絨毛尿膜の血管新生の誘発または血管内皮細胞遊走の誘発のような血管新生アッセイが挙げられる。適切な腫瘍細胞系は

10

20

30

40

50

、例えば American Type Tissue Culture Collection カタログから入手可能である。

【0219】

4. 7. 10 受容体／リガンド活性

本発明のポリペプチドはまた、受容体、受容体リガンド、または受容体／リガンド相互作用の阻害剤もしくはアゴニストを明示し得る。本発明のポリヌクレオチドは、かかる特性を示すポリペプチドをコードすることができる。かかる受容体およびリガンドの例としては、サイトカイン受容体およびそのリガンド、受容体キナーゼおよびそのリガンド、受容体ホスファターゼおよびそのリガンド、細胞－細胞相互作用に参与した受容体およびそのリガンド（細胞接着分子（セレクチン、インテグリンおよびそのリガンドのような）を含むが、これらに限定されない）、ならびに抗原提示、抗原認識、および細胞性免疫応答および体液性免疫応答の発生に参与した受容体／リガンド対が挙げられるが、これらに限定されない。受容体およびリガンドはまた、関連受容体／リガンド相互作用の潜在的ペプチドまたは小分子阻害剤のスクリーニングにも有用である。本発明のタンパク質（受容体およびリガンドの断片を含むが、これらに限定されない）はそれ自体、受容体／リガンド相互作用の阻害剤として有用であり得る。

【0220】

本発明のポリペプチドの活性は、他の手段の中でも、以下の方法により測定され得る：

【0221】

受容体－リガンド活性に関する適切なアッセイとしては、Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 7. 28, Measurement of Cellular Adhesion under static conditions 7. 28. 1-7. 28. 22), Takai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 6864-6868 (1987)、Biere et al., J. Exp. Med., 168: 1145-1156 (1988)、Rosenstein et al., J. Exp. Med., 169: 149-160 (1989)、Stoltenborg et al., J. Immunol. Methods, 175: 59-68 (1994)、Stitt et al., Cell, 80: 661-670 (1995) に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0222】

例えば、本発明のポリペプチドは、リガンド（複数可）用の受容体として使用されてもよく、それにより当該リガンド（複数可）の生物活性を伝達する。リガンドは、結合アッセイ、アフィニティクロマトグラフィ、ジハイブリッドスクリーニングアッセイ、BIA コアアッセイ、ゲルオーバーレイアッセイ、または当該技術分野で既知の他の方法により特定され得る。

【0223】

アゴニストもしくはアンタゴニスト、または部分的アゴニストまたは部分的アンタゴニストとしての薬剤またはタンパク質を特性化する研究は、競合リガンドとして他のタンパク質の使用を必要とする。本発明のポリペプチド、またはそれらのリガンド（複数可）は、従来法により、放射性同位体、比色用分子、または毒素分子にカップリングされることで標識され得る（「タンパク質精製の手引き (Guide to Protein Purification)」Murray P. Deutscher (ed) Method in Enzymology Vol. 182 (1990) Academic Press, Inc. San Diego)。放射性同位体の例としては、トリチウムおよび炭素 14 が挙げられるが、これらに限定されない。比色用分子の例としては、フルオレスカミンまたはローダミンのような蛍光分子、あるいは他の比色用分子が挙げられるが、これ

らに限定されない。毒素の例としては、リシンが挙げられるが、これに限定されない。

【0224】

4. 7. 11 薬剤スクリーニング

本発明は、様々な薬剤スクリーニング技法のいずれかにおいて、新規ポリペプチドまたはそれらの結合断片を用いることで、化学化合物をスクリーニングするのに特に有用である。かかる試験で使用されるポリペプチドまたは断片は、溶液中で遊離であり得るか、固体支持体に固定され得るか、細胞表面上に支えられ得るか、あるいは細胞内に位置され得る。薬剤スクリーニングの一方法は、ポリペプチドまたはそれらの断片を発現する組換え核酸で安定に形質転換した真核生物または原核生物宿主細胞を利用する。薬剤は、競合結合アッセイにおいてかかる形質転換細胞に対してスクリーニングされる。生存可能な形態または固体形態にあるかかる細胞を、標準的な結合アッセイに使用することができる。例えば、本発明のポリペプチドまたは断片と、試験される作用物質との間の複合体の形成が測定され得るか、あるいは当該技術分野で既知の新規ポリペプチドと適切な細胞系との間の複合体形成の減少が検査され得る。

10

20

30

40

50

【0225】

本発明のポリペプチドに結合するか、あるいはその活性を調節する（すなわち増加または減少させる）能力に関してスクリーニングされ得る試験化合物用の供給源としては、（１）無機および有機化学ライブラリー、（２）天然産物ライブラリー、および（３）ランダムもしくは擬似ペプチド、オリゴヌクレオチドまたは有機分子から構成されるコンビナトリアルライブラリーが挙げられる。

【0226】

化学ライブラリーは、多数の市販源から、容易に合成されてもよく、あるいは購入されてもよく、また既知の化合物の構造類似体、または天然産物スクリーニングにより「ヒット」または「リード」として特定される化合物を含み得る。

【0227】

天然産物ライブラリーの供給源は、（細菌および真菌を含む）微生物、動物、植物または他の草木、あるいは海洋生物であり、スクリーニング用の混合物ライブラリーは、（１）土壌、植物または海洋微生物からのブrossの発酵および抽出、あるいは（２）生物自体の抽出により創出され得る。天然産物ライブラリーとしては、ポリケチド、非リボソームペプチド、およびそれらの（天然に存在しない）変異体が挙げられる。概説として、Science, 282:63-68 (1998) を参照されたい。

【0228】

コンビナトリアルライブラリーは、多数のペプチド、オリゴヌクレオチドまたは有機化合物から構成され、伝統的な自動合成方法、PCR、クローニングまたは専有の合成方法により容易に調製することができる。特に興味を持たれるのは、ペプチドおよびオリゴヌクレオチドコンビナトリアルライブラリーである。さらに他の興味を持たれるライブラリーとしては、ペプチド、タンパク質、ペプチド擬似体、マルチパラレル合成収集物、組換え、およびポリペプチドライブラリーが挙げられる。コンビナトリアルケミストリーおよびそれから創出されるライブラリーの概説に関して、Myers, Curr. Opin. Biotechnol., 8:701-707 (1997) を参照されたい。ペプチド擬似体ライブラリーの概説および例に関して、Al-Obeidi et al., Mol. Biotechnol., 9(3):205-23 (1998)、Hruby et al., Curr Opin Chem Biol, 1(1):114-19 (1997)、Dorner et al., Bioorg Med Chem, 4(5):709-15 (1996)（アルキル化ジペプチド）を参照されたい。

【0229】

本明細書中に記載する様々なライブラリーの使用によるモジュレータの同定は、「ヒット」の、本発明のポリペプチドを結合する能力を最適化するために、候補「ヒット」（または「リード」）の修飾を可能にする。次に結合アッセイで同定された分子を、当該技術分野で既知の in vivo 組織培養物または動物モデルにおいて、アンタゴニストまたは

アゴニスト活性に関して試験する。要するに、分子は、複数の細胞培養物または動物へと滴定され、続いて動物／細胞死、または動物／細胞の生存の延長に関して試験される。

【0230】

こうして同定された結合分子は、毒素、例えばリシンまたはコレラと、あるいは放射性同位体細胞にとって有毒な他の化合物と複合体を形成してもよい。次に、毒素結合分子複合体は、本発明のポリペプチドに対する結合分子の特異性により、腫瘍または他の細胞をへとターゲティングされる。あるいは、結合分子は、ターゲティングおよびイメージングの目的で、イメージング剤と複合体を形成してもよい。

【0231】

4. 7. 12 受容体活性に関するアッセイ

本発明はまた、ポリペプチド、例えばリガンドまたは受容体の特異的結合を検出する方法を提供する。当該技術は、本発明の受容体ポリペプチドに対してこれまで未知の結合パートナーを同定するのに特に有用な多数のアッセイを提供する。例えば、哺乳動物または細菌細胞を用いた発現クローニング、あるいはジハイブリッドスクリーニングアッセイは、結合パートナーをコードするポリヌクレオチドを同定するのに使用することができる。別の例として、本発明の適切な固定化ポリペプチドを用いたアフィニティークロマトグラフィーは、本発明のポリペプチドを認識し、結合するポリペプチドを単離するのに使用することができる。本発明のポリペプチドの生物活性を調節する（すなわち、増加または減少させる）化合物、特に小分子の特定に使用される多数の種々のライブラリーが存在する。本発明の受容体ポリペプチドに関するリガンドは、本発明の受容体の発現以外は遺伝的に同一な2つの細胞集団（一方の細胞集団は、本発明の受容体を発現するのに対し、他方の細胞集団は発現しない）に、外因性リガンド、またはリガンドのカクテルを添加することで特定することができる。続いてリガンド（複数）の添加に対する2つの細胞集団の応答を比較する。あるいは、発現ライブラリーは、細胞において本発明のポリペプチドとともに同時発現させることができ、自己分泌応答に関してアッセイして、潜在的リガンド（複数可）を特定することができる。さらに別の例として、BIAコアアッセイ、ゲルオーバーレイアッセイ、または当該技術分野で既知の他の方法を用いて、結合パートナーポリペプチドを特定することができる（（1）無機および有機化学ライブラリー、（2）天然産物ライブラリー、および（3）ランダムペプチド、オリゴヌクレオチドまたは有機分子から構成されるコンビナトリアルライブラリーを含む）。

【0232】

本発明のポリペプチドのシグナル伝達カスケードにおいて下流の細胞内シグナル伝達分子の役割を決定することができる。例えば、本発明のポリペプチドの細胞質ドメインが、リガンドが特定されたタンパク質の細胞外部分に融合されたキメラタンパク質は、宿主細胞で産生される。次に、細胞を、キメラタンパク質の細胞外部分に特異的なリガンドとともにインキュベートし、それによりキメラ受容体を活性化する。続いて、細胞内シグナル伝達に関与した既知の下流タンパク質を、予測される修飾、すなわちリン酸化に関してアッセイすることができる。当業者に既知の他の方法もまた、受容体活性に関与したシグナル伝達分子を同定するのに使用することができる。

【0233】

4. 7. 13 白血病

白血病および関連障害は、本発明のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの機能を促進または阻害する治療薬の投与により、治療あるいは防止され得る。かかる白血病および関連障害としては、急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、骨髄芽球性白血病、前骨髄性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、および慢性リンパ性白血病が挙げられるが、これらに限定されない（かかる障害の概説に関して、Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphiaを参照）。

【0234】

4. 7. 14 他の活性

本発明のポリペプチドはまた、1つまたはそれより多い以下のさらなる活性または影響を示しうる：細菌、ウイルス、真菌および他の寄生生物を含むが、これらに限定されない感染性作用物質の成長、感染もしくは機能の阻害、またはそれらの死滅；伸長、体重、毛の色、眼の色、皮膚、脂肪対赤身の割合もしくは他の組織組織沈着、または臓器もしくは身体の部分のサイズまたは形状（例えば、胸の増大または縮小、骨形成または形状の変化のような）を含むが、これらに限定されない身体の特徴の達成（抑制または増強）；バイオリズムまたは日周期サイクルもしくはリズムの達成、雄または雌被験体の受精能の達成；食事脂肪、脂質、タンパク質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、補因子または他の栄養因子もしくは構成成分（複数可）の代謝、異化作用、同化作用、プロセッシング、利用化、貯蔵あるいは排除の達成、食欲、性欲、ストレス、認知（認知障害を含む）、うつ病（抑うつ性障害を含む）、および暴力行為を含むが、これらの限定されない行動特性の達成；鎮痛薬効果または他の疼痛減少効果の提供；造血系列以外の系列の胚幹細胞の分化および成長の促進；ホルモンまたは内分泌活性；酵素の場合では酵素の欠乏の矯正および欠乏関連疾患の治療；高増殖性障害（例えば、乾癬のような）の治療；免疫グロブリン様活性（例えば、抗原または補体を結合する能力のような）；およびかかるタンパク質、またはかかるタンパク質と交差反応性である別の物質もしくは物体（entity）に対する免疫応答を産生するためのワクチン組成物中の抗原として作用する能力。

【0235】

4. 7. 15 多型の特定

多型の実証により、ヒト被験体におけるかかる多型の特定、ならびに診断および治療のためのこの情報の遺伝薬理学的使用が可能となる。かかる多型は、例えば様々な疾患状態（炎症または免疫応答を含む障害のような）に対する差次的傾向または感受性、あるいは薬剤投与に対する差次的応答に関連され得て、この遺伝子情報は、予防上または治療上の処置を適切に適応させるのに使用することができる。例えば、炎症または自己免疫疾患に対する傾向に関連した多型の存在により、多型の存在を特定することによりヒトにおけるこの状態の診断を可能とする。

【0236】

多型は、一般に患者から試料を得ることと、試料からのDNAを解析することと、任意にDNAの単離または増幅を含むことと、DNA中の多型の存在を特定することとを含む、当該技術分野で既知の様々な方法で特定することができる。例えば、PCRを用いて、ゲノムDNAの適切な断片を増幅してもよく、続いてそれは配列決定され得る。あるいは、DNAは、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション（ここで、適切なオリゴヌクレオチドは、単一塩基ミスマッチの検出を可能にする条件下でDNAにハイブリダイズされる）に、あるいは単一ヌクレオチド伸長アッセイ（ここで、多型の位置にすぐ隣接してハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが1つまたはそれより多い標識ヌクレオチドで伸長される）に付してもよい。さらに、伝統的な制限断片長多型解析（多型の存在もしくは非存在に依存してゲノムDNAの差次的消化を提供する制限酵素を用いて）を実施してもよい。本発明のヌクレオチド配列を有するアレイは、多型を検出するのに使用することができる。アレイは、本発明のヌクレオチド配列を検出するために、本発明の修飾ヌクレオチド配列を含んでもよい。代替法では、本発明のヌクレオチド配列のいずれか1つを、これらの配列からの変化を検出するためのアレイに配置されることができる。

【0237】

あるいは、アミノ酸配列の変化をもたらす多型はまた、タンパク質のアミノ酸配列中の相当する変化を検出することにより、例えば、変異配列に特異的な抗体により検出することもできる。

【0238】

4. 7. 16 関節炎および炎症

慢性関節リウマチに対する本発明の組成物の免疫学的影響は、実験動物モデル系で決定される。実験モデル系は、ラットにおけるアジュバント誘発性関節炎であり、プロトコルは

、J. Holoshitz, et al., 1983, Science, 219: 56、またはB. Waksman et al., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 23: 129 (1263)に記載されている。疾患の誘発は、完全フロイントアジュバント (CFA) 中の死菌結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の懸濁液の単回注射 (一般に、皮内) により引き起こすことができる。注射経路は、多種多様であり得るが、ラットは、アジュバント混合物を尾の基部に注射され得る。リン酸緩衝溶液 (PBS) 中のポリペプチドは、約 1 ~ 5 mg / kg の用量で投与される。対照は、PBSのみを投与することからなる。

【0239】

試験化合物の影響を試験する手順は、CFA中の死菌結核菌の皮内注射、続いて試験化合物の即時投与、続いて24日目まで隔日での処置からなる。マイコバクテリウム属 (*Mycobacterium*) CFAの注射後14、15、18、20、22、および24日目に、上述のJ. Holoskitzにより記載されるように、全関節炎スコアが得られ得る。データの解析により、試験化合物は、関節炎スコアの減少により測定されるように関節の腫脹に対して劇的な影響を及ぼすことが明らかである。

【0240】

4. 8 治療方法

本発明の組成物 (ポリペプチド断片、類似体、変異体、および抗体、あるいはアンチセンスポリヌクレチドを含む他の結合パートナーまたはモジュレータを含む) は、様々な治療方法で数多くの用途がある。治療用途の例としては、本明細書中に例示するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0241】

4. 8. 1 例

本発明の一実施形態は、有効な量の本発明の幹細胞成長因子様ポリペプチドまたは他の組成物を、本発明のペプチドを調節することで調節され得る疾患または障害に罹患した個体に投与することである。投与様式は特に重要ではないが、非経口投与が好ましい。例示的投与様式は、静脈内ボラスを送達することである。本発明の幹細胞成長因子様ポリペプチドまたは他の組成物の投与量は通常、処方する医師により決定されることが予想される。投与量は、個々の患者の年齢、体重、状態および応答に従って様々であることが予想される。通常、用量当たりの投与されるポリペプチド量は、約 0.01 mg / kg ~ 100 mg / kg (体重) の範囲であり、好ましい用量は、約 0.1 mg / kg から 10 mg / kg (患者の体重) である。非経口投与に関して、本発明の幹細胞成長因子様ポリペプチドは、薬学的に許容可能な非経口用賦形剤と併用した注射可能形態で配合される。かかる賦形剤は、当該技術分野で既知であり、例としては、水、生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液、および少量のヒト血清アルブミンから構成される溶液が挙げられる。賦形剤は、ポリペプチドの等張性および安定性を維持する少量の添加剤または他の有効成分を含有してもよい。かかる溶液の調製は、当業者の範囲内である。

【0242】

4. 9 薬学的配合物および投与経路

本発明のタンパク質または他の組成物 (組換えおよび非組換え供給源を含むが、これらに限定されないものに由来するいかなる供給源からのもの、本発明のポリペプチドの抗体および他の結合パートナーを含む) を、必要としている患者に、単独で、あるいはそれが適切なキャリアまたは賦形剤 (複数可) と混合された薬学的組成物で、様々な症状を治療あるいは回復するための用量で投与してもよい。かかる組成物は、任意に (タンパク質または他の有効成分、およびキャリアのほかに)、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定剤、可溶化剤、および当該技術分野で既知の他の材料を含有してもよい。「薬学的に許容可能な」という用語は、有効成分 (複数可) の生物活性の有効性を妨害しない無毒性物質を意味する。キャリアの特性は、投与経路に依存する。本発明の薬学的組成物はまた、M-CSF、GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-1

3、IL-14、IL-15、IFN、TNF0、TNF1、TNF2、G-CSF、Meg-CSF、トロンボポエチン、幹細胞因子、およびエリスロポエチンのようなサイトカイン、リンホカイン、または他の造血因子を含有してもよい。さらなる組成物では、本発明のタンパク質は、問題となっている疾患または障害の治療に有益な他の作用物質と組み合わせてもよい。これらの作用物質としては、上皮成長因子（EGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、トランスフォーミング成長因子（TGF- α 、およびTGF- β ）、インスリン様成長因子（IGF）、ならびに本明細書中に記載するサイトカインなどの様々な成長因子が挙げられる。

【0243】

薬学的組成物はさらに、タンパク質または他の有効成分の活性を増強するか、あるいはその活性または治療における用途を補充する他の作用物質を含有してもよい。かかるさらなる因子および／または作用物質は、薬学的組成物中に含まれて、本発明のタンパク質または他の有効成分と相乗効果をもたらし得るか、あるいは副作用を低減し得る。反対に、本発明のタンパク質または他の有効成分が、特定の凝固因子、サイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解または抗血栓因子、あるいは抗炎症剤の配合物に含まれて、凝固因子、サイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解または抗血栓因子、あるいは抗炎症剤（例えば、IL-1Ra、IL-1Hy1、IL-1Hy2、抗TNF、コルチステロイド、免疫抑制剤）の副作用を最小限に抑え得る。本発明のタンパク質は、多量体（例えば、ヘテロ二量体またはホモ二量体）あるいはそれ自体または他のタンパク質との複合体で活性であり得る。結果として、本発明の薬学的組成物は、かかる多量体または複合体形態で、本発明のタンパク質を含んでもよい。

【0244】

第1のタンパク質を含む本発明の薬学的組成物中に含まれる代替物として、第2のタンパク質または治療剤が、第1のタンパク質とともに（例えば、同時に、あるいは異なる時間で（但し、作用物質の組合せの治療濃度が治療部位で達成される））投与され得る。本用途の化合物の配合物および投与に関する技法は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」, Mack Publishing Co., Easton, PA, latest editionに見出され得る。治療上有効な用量とはさらに、症状の回復、例えば関連医療症状の治療、治癒、防止または回復、あるいはかかる状態の治療、治癒、防止または回復の速度の増大をもたらすのに十分な化合物の量を指す。単独で投与される個々の有効成分に適用する場合、治療上有効な用量とは、単独の成分に相当する。組み合わせで適用する場合、治療上有効な用量とは、併用して投与されようと、順次投与されようと、あるいは同時に投与されようと、治療効果をもたらす有効成分の組み合わせ量を指す。

【0245】

本発明の治療または使用方法を実施する際に、治療上有効な量の本発明のタンパク質または他の有効成分を、治療されるべき状態を有する哺乳動物に投与する。本発明のタンパク質または他の有効成分は、単独で、あるいはサイトカイン、リンホカイン、または他の造血因子を使用した治療のような他の療法と併用して、本発明の方法に従って投与してもよい。1つまたはそれより多いサイトカイン、リンホカイン、または他の造血因子と同時投与する場合、本発明のタンパク質または他の有効成分は、サイトカイン（複数可）、リンホカイン（複数可）、他の造血因子（複数可）、血栓溶解または抗血栓因子と同時に、あるいは順次投与され得る。順次投与する場合、主治医は、サイトカイン（複数可）、リンホカイン（複数可）、他の造血因子（複数可）、血栓溶解または抗血栓因子と併用して本発明のタンパク質または他の有効成分を投与する適切な順序を決定する。

【0246】

4. 9. 1 投与経路

適切な投与経路としては、例えば経口、直腸、経粘膜、あるいは腸投与、非経口送達（筋内、皮下、皮内注射、ならびに髄腔内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、鼻内または眼内注射を含む）が挙げられ得る。薬学的組成物中で使用される、あるいは本発明の方法を実施

するための本発明のタンパク質または他の有効成分の投与は、様々な従来法（例えば、経口摂取、吸入、局所塗布、または皮膚、皮下、腹腔内、非経口または静脈内注射）で実施することができる。患者への静脈内投与が好ましい。

【0247】

あるいは、全身様式よりは局所様式で、例えば関節炎の関節に、あるいは線維症の組織中に直接化合物を注射することにより、多くの場合デポ剤または徐放配合物で、化合物を投与してもよい。緑内障手術の合併症として頻繁に出現する瘢痕プロセスを防止するために、化合物を局所的に、例えば目薬として投与してもよい。さらに、標的薬剤送達システム中、例えば関節炎または線維症の組織を標的とする、例えば特定の抗体で被覆したリポソーム中の薬剤を投与してもよい。リポソームは、罹患組織を標的として、それにより選択的に取り込まれる。

10

【0248】

本発明のポリペプチドは、所望の作用部位に有効な用量を送達する任意の経路で投与される。投与の適切な経路および特定の適応症のための有効投与量の決定は、当業者の水準内である。好ましくは、創傷治療に関して、部位に直接治療用化合物を投与する。本発明のポリペプチドに適した投与量範囲は、これらの投与量から、あるいは適切な動物モデルでの同様の研究から推定することができる。続いて、投与量は、必要に応じて、最大の治療的有益性を提供するために臨床医により調節され得る。

【0249】

4. 9. 2 組成物／配合物

したがって、本発明による使用のための薬学的組成物は、薬学的に使用することができる調製物中への有効化合物の加工を促進する賦形剤および助剤を含む1つまたはそれより多い生理学上許容可能なキャリアを用いて、従来の様式で配合され得る。これらの薬学的組成物は、例えば従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣錠作製、湿式粉碎、乳化、カプセル化、捕捉、または凍結乾燥プロセスにより、それ自体既知の様式で製造され得る。適正な配合物は、選択した投与経路に依存する。治療上有効な量の本発明のタンパク質または他の有効成分を経口投与する場合、本発明のタンパク質または他の有効成分は、錠剤、カプセル、粉末、溶液、またはエリキシル剤の形態である。錠剤形態で投与される場合、本発明の薬学的組成物はさらに、ゼラチンまたは補助薬のような固体キャリアを含有してもよい。錠剤、カプセル、および粉末は、約5～95%の本発明のタンパク質または他の有効成分、好ましくは約25～90%の本発明のタンパク質または他の有効成分を含有する。液体形態で投与する場合、水、石油、動物もしくは植物起源の油（例えば、ラッカセイ油、鉱油、ダイズ油、またはゴマ油）、または合成油のような液体キャリアを添加してもよい。液体形態の薬学的組成物はさらに、生理食塩水溶液、デキストロースまたは他の糖類溶液、あるいはエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールのようなグリコールを含有してもよい。液体形態で投与される場合、薬学的組成物は、約0.5～90重量%の本発明のタンパク質または他の有効成分、好ましくは約1～50%の本発明のタンパク質または他の有効成分を含有する。

20

30

【0250】

治療上有効な量の本発明のタンパク質または他の有効成分が静脈内、皮膚または皮下注射で投与される場合、本発明のタンパク質または他の有効成分は、発熱物質を含まない非経口的に許容可能な水溶液の形態である。pH、等張性、安定性等に十分配慮した、かかる非経口的に許容可能なタンパク質または他の有効成分溶液の調製は、当業者の範囲内である。静脈内、皮膚または皮下注射用の好ましい薬学的組成物は、本発明のタンパク質または他の有効成分のほかに、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、乳酸加リンゲル注射液のような等張性賦形剤、または当該技術分野で既知の他の賦形剤を含有すべきである。本発明の薬学的組成物はまた、安定剤、防腐剤、緩衝液、酸化防止剤、または当業者に既知の他の添加剤を含有してもよい。注射に関して、本発明の作用物質は、水溶液、好ましくはハanks溶液、リンゲル溶液、または生理食塩緩衝液のような生理学的に相溶性の緩衝液中に配合され

40

50

得る。経粘膜投与に関して、浸透される障壁に対する適切な浸透剤が配合物中に使用される。かかる浸透剤は概して当該技術分野で既知である。

【0251】

経口投与に関して、化合物は、当該技術分野で既知の薬学的に許容可能なキャリアと有効成分を組み合わせることで容易に配合することができる。かかるキャリアにより、本発明の化合物が、治療されるべき患者による経口摂取用の、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液等として配合されるのが可能である。経口使用のための薬学的調製物は、固体賦形剤を用いて、任意に得られた混合物を粉碎することと、望ましい場合に適切な助剤を添加した後に、顆粒の混合物を加工して、錠剤または糖衣錠コアを得ることとにより得ることができる。適切な賦形剤は、特に糖（ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む）のような充填剤、例えばトウモロコシスターチ、コムギスターチ、ライススターチ、ポテトスターチ、ゼラチン、トラガカン

トゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース調製物、および／またはポリビニルピロリドン（PVP）である。望ましい場合、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギニン酸もしくはアルギニン酸ナトリウムのようなその塩のような崩壊剤を添加してもよい。適切なコーティングを伴う糖衣錠コアが提供される。この目的で、濃糖溶液を使用してもよく、それは任意にアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および／または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物を含んでもよい。同定用に、あるいは有効成分用量の種々の組合せを特性するために、染料または顔料を錠剤または糖衣錠コーティングに添加してもよい。

10

20

【0252】

経口的に使用することができる薬学的調製物としては、ゼラチン製のプッシュフィットカプセル、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールのような可塑化剤製の軟質密閉カプセルが挙げられる。プッシュフィットカプセルは、ラクトースのような充填剤、スターチのような結合剤、および／またはタルクもしくはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、および任意に安定剤と混合して有効成分を含有することができる。軟質カプセルでは、有効化合物は、脂肪酸、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールのような適切な液体中に溶解あるいは懸濁させてもよい。さらに、安定剤を添加してもよい。経口投与用の配合物はすべて、かかる投与に適した投与量であるべきである。口腔投与に関して、組成物は、従来の様式で配合された錠剤またはロゼンザの形態をとってもよい。

30

【0253】

吸入による投与に関して、本発明による使用のための化合物は、適切な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適切なガス）を使用して、加圧パックまたはネブライザーからのエーロゾルスプレー提示を有する形態で利便性よく送達される。加圧エーロゾルの場合では、投与量単位は、定量を送達するための弁を提供することで決定され得る。化合物とラクトースまたはスターチのような適切な粉末基剤との粉末ミックスを含有する、吸入器または注入器で使用するための例えばゼラチンのカプセルまたはカートリッジを配合してもよい。化合物は、注射、例えばボーラス注射または連続注入による非経口投与用に配合されてもよい。注射用の配合物は、添加した防腐剤とともに、単位投薬形態で、例えばアンプルまたは複数回用量容器中で付与されてもよい。組成物は、油性もしくは水性賦形剤中の懸濁液、溶液またはエマルジョンのような形態をとってもよく、また沈殿防止剤、安定剤および／または崩壊剤のような配合剤を含有してもよい。

40

【0254】

非経口投与用の薬学的組成物としては、水溶性形態の有効成分の水溶液が挙げられる。さらに、有効化合物の懸濁液は、適切な油性注射懸濁液として調製されてもよい。適切な親油性溶媒または賦形剤としては、ゴマ油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、あるいはリポソームが挙げられる。水性

50

注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランのような、懸濁液の粘性を増大させる物質を含有してもよい。任意に、懸濁液はまた、化合物の溶解性を増大させ高濃縮溶液の調製を可能にする、適切な安定剤または作用物質を含有してもよい。あるいは、有効成分はまた、使用前に、適切な賦形剤、例えば滅菌の発熱物質を含まない水を用いて構成するための粉末形態であってもよい。

【0255】

化合物はまた、例えばココアバターまたは他のグリセリドのような従来の座剤基剤を含有する座剤または停留浣腸のような直腸組成物中で配合してもよい。これまで記載した配合物のほかに、化合物はまた、デポ剤調製物として配合されてもよい。かかる長作用性配合物は、埋め込み（例えば、皮下または筋肉）により、あるいは筋肉投与により投与され得る。したがって、例えば、化合物は、適切な高分子もしくは疎水性物質（例えば、許容可能な油中のエマルジョンとして）、またはイオン交換樹脂とともに、あるいは難溶性誘導体として（例えば難溶性塩として）配合され得る。

10

【0256】

本発明の疎水性化合物用の薬学的キャリアは、ベンジルアルコール、無極性界面活性剤、水混和性有機ポリマー、および水相を含む共溶媒系である。共溶媒系は、V P D共溶媒系であってもよい。V P Dは、絶対エタノール中で容積を補充（make up）された3 % w / vベンジルアルコール、8 % w / v無極性界面活性剤ポリソルベート80、および65 % w / vエチレングリコール300の溶液である。V P D共溶媒系（V P D : 5 w）は水溶液中に5 %デキストロースと1 : 1の比で希釈させたV P Oからなる。この共溶媒系は、疎水性化合物を十分に溶解し、それ自体全身投与時に低毒性をもたらす。当然、共溶媒系の割合は、その溶解性および毒性特性を破壊しないで相当変化させてもよい。さらに、共溶媒構成成分の独自性は、様々であり得る。例えば、他の無毒性の無極性界面活性剤を、ポリソルベート80の代わりに使用してもよい。ポリエチレングリコールの分画サイズは様々であり得る。他の生体適合性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）は、ポリエチレングリコールを置き換えてもよい。他の糖または多糖類は、デキストロースと置換し得る。あるいは、疎水性薬剤物のための他の送達システムを使用してもよい。リポソームおよびエマルジョンは、疎水性薬剤用の送達賦形剤またはキャリアの既知の例である。ジメチルスルホキシドのようなある特定の有機溶媒もまた使用してもよいが、通常より高い毒性が伴う。さらに、化合物は、治療剤を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスのような徐放系を用いて送達してもよい。様々なタイプの徐放マトリックスが確立されており、当業者に既知である。徐放カプセルは、他の化学的性質に応じて、数週間〜100日以上の間化合物を放出し得る。治療試薬の化学的性質および生物学的安定性に応じて、タンパク質または他の有効成分安定化のためのさらなる戦略が使用され得る。

20

30

【0257】

薬学的組成物はまた、適切な固体もしくはゲル相キャリアまたは賦形剤を含んでもよい。かかるキャリアまたは賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、各種糖、スターチ、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールのようなポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の有効成分の多くが、薬学的に適合性の対イオンを伴う塩として提供され得る。かかる薬学的に許容可能な塩基付加塩は、生物学的有効性および遊離酸の特性を保持し、かつ水酸化ナトリウム、水酸化マグネシウム、アンモニア、トリアルキルアミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、二塩基アミノ酸、酢酸ナトリウム、安息香酸カリウム、トリエタノールアミン等のような無機または有機塩基との反応により得られる塩である。

40

【0258】

本発明の薬学的組成物は、タンパク質またはペプチド抗原との、本発明のタンパク質（複数可）または他の有効成分の複合体の形態であり得る。タンパク質および／またはペプチド抗原は、BおよびTリンパ球に対する刺激シグナルを送達する。Bリンパ球は、それらの表面免疫グロブリン受容体により抗原に対して応答する。Tリンパ球は、M H Cタンパク質による抗原提示後に、T細胞受容体（T C R）を介し抗原に対して応答する。M H C

50

および構造的に関連したタンパク質（宿主細胞上のクラス I およびクラス II MHC 遺伝子によりコードされるものを含む）は、T リンパ球に対してペプチド抗原（複数可）を提示するように作用する。また抗原構成成分は、精製 MHC ペプチド複合体単独で、あるいは T 細胞を直接シグナル伝達することができる同時刺激分子とともに、供給され得る。あるいは、B 細胞上の表面免疫グロブリンおよび他の分子を結合することが可能な抗体、ならびに T 細胞上の TCR および他の分子を結合することが可能な抗体は、本発明の薬学的組成物と組み合わせることができる。

【0259】

本発明の薬学的組成物は、本発明のタンパク質を、他の薬学的に許容可能なキャリアのほかに、水溶液中でミセル、不溶性単層、液晶、または層状層として凝集形態で存在する脂質のような両親媒性作用物質と組み合わせたリポソームの形態であってもよい。リポソーム配合物に適した脂質としては、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リソレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸等が挙げられるが、これらに限定されない。かかるリポソーム配合物の調製は、例えば米国特許第 4, 235, 871 号、同第 4, 501, 728 号、同第 4, 837, 028 号、および同第 4, 737, 323 号（これらすべてが、参照により本明細書に援用される）に開示されるように、当業者水準内である。

【0260】

本発明の薬学的組成物中の本発明のタンパク質または他の有効成分の量は、治療されるべき状態の性質および重篤性、ならびに患者が受けた治療前の性質に依存する。最終的には、主治医が、本発明のタンパク質または他の有効成分の量を決定し、それを用いて個々の患者それぞれを治療する。初めに、主治医は、低用量の本発明のタンパク質または他の有効成分を投与し、患者の応答を観察する。患者にとって最適な治療効果が得られるまで、より大量の本発明のタンパク質または他の有効成分を投与してもよく、その時点で、投与量はさらに増加されない。本発明の方法を実施するのに使用される様々な薬学的組成物は、体重 1 kg 当たり、約 0.01 μ g ~ 約 100 mg（好ましくは、約 0.1 μ g ~ 約 10 mg、より好ましくは約 0.1 μ g ~ 約 1 mg）の本発明のタンパク質または他の有効成分を含有することが意図される。骨、軟骨、腱、または靱帯再生に有用な本発明の組成物に関して、治療方法は、組成物を、局所的、体系的、または埋め込み物またはデバイスとして局所的に投与することを含む。投与する場合、本発明で使用するための治療用組成物は、当然のことながら発熱物質を含まない生理学的に許容可能な形態である。さらに、組成物は望ましくは、骨、軟骨、または組織損傷の部位へ送達するための粘性形態でカプセル化され得るか、あるいは注射され得る。局所投与は創傷治癒および組織修復に適切であり得る。上述の組成物中に任意にまた含まれ得る、本発明のタンパク質または他の有効成分以外の治療上有用な作用物質は、本発明の方法における組成物と同時にまたは順次、代替的にあるいはさらに投与され得る。好ましくは、骨および／または軟骨形成に関して、組成物は、骨および／または軟骨損傷の部位に、タンパク質含有または他の有効成分含有組成物を送達することが可能なマトリックスを含み、発達中の骨および軟骨のための任意に身体に吸収され得る構造を提供する。かかるマトリックスは、他の移植医療用途で現在使用中の物質から形成されてもよい。

【0261】

マトリックス材料の選択は、生体適合性、生分解性、機械特性、表面的な外観、および界面特性に基づく。組成物の特定の用途は、適切な配合を規定する。組成物用の潜在的マトリックスは、生分解性であり、かつ化学的に規定された硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、およびポリ無水物であってもよい。他の潜在的なマトリックスは、生分解性であり、かつ生物学的に明確にされたものである（例えば、骨または皮膚コラーゲン）。さらなるマトリックスは、純粋なタンパク質または細胞外マトリックス構成成分から構成される。他の潜在的なマトリックスは、非生分解性であり、かつ化学的に規定される（例えば、焼結ヒドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミン酸塩、または他のセラミック）。マトリックスは、ポリ乳酸とヒドロキシアパタイト、またはコラーゲンとリン酸三カルシウムのような上述のタイプの材料の

いずれかの組合せから構成されてもよい。バイオセラミックは、カルシウム－アルミン酸塩－リン酸塩におけるような組成物において変更させてもよく、孔径、粒径、粒子形状、および生分解性を変更するために加工してもよい。現在好ましいのは、150～800ミクロンの範囲の直径を有する多孔質粒子の形態にある乳酸とグリコール酸の50：50（モル重量）コポリマーである。幾つかの用途では、タンパク質組成物がマトリックスから解離するのを防ぐために、カルボキシメチルセルロースまたは自系血餅のような金属イオン封鎖剤を利用することが有用である。

【0262】

金属イオン封鎖剤の好ましいファミリーは、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、およびカルボキシメチルセルロースを含むアルキルセルロース（ヒドロキシア

10
ルキルセルロースを含む）のようなセルロース系材料であり、最も好ましいのは、カルボキシメチルセルロース（CMC）の陽イオン塩である。他の好ましい金属イオン封鎖剤としては、ヒアルロン酸、アルギン酸ナトリウム、ポリ（エチレングリコール）、ポリエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマー、およびポリ（ビニルアルコール）が挙げられる。本発明で有用な金属イオン封鎖剤の量は、総配合物重量に基づいて、0.5～20重量%、好ましくは1～10重量%であり、これは、ポリマーマトリックスからのタンパク質の脱離を防ぎ、かつ組成物の適切な取り扱いを提供するのに必要な量を表し、前駆細胞がマトリックスを浸潤するのを防止され、それによりタンパク質に、前駆細胞の骨形成活性を助長するための機会を提供するほどではない。さらなる組成物では、本発明のタン

20
パク質または他の有効成分は、骨および／または軟骨欠損、創傷、または問題となっている組織の治療に有益な他の作用物質と組み合わせてもよい。これらの作用物質としては、上皮成長因子（EGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、トランスフォーミング成長因子（TGF- α およびTGF- β ）、およびインスリン様成長因子（IGF）が挙げられる。

【0263】

治療用組成物はまた、獣医学用途にとって現在価値がある。特に、ヒトのほかに、家畜およびサラブレッド馬は、本発明のタンパク質または他の有効成分でかかる治療するための望ましい患者である。組織再生で使用されるべきタンパク質含有薬学的組成物の投薬レジ

30
メンは、タンパク質の作用を改質する様々な要因、例えば形成されるのが望ましい組織重量の量、損傷部位、損傷組織の状態、創傷の大きさ、損傷組織の型（例えば、骨）、患者の年齢、性別、および食事、任意の感染の重篤性、投与回数、および他の臨床的容要因を考慮して、主治医により決定される。投与量は、再構築に使用されるマトリックスの型、および薬学的組成物中の他のタンパク質の含入により多種多様であり得る。例えば、IGF-I（インスリン様成長因子I）のような他の既知の成長因子を、最終組成物に添加することはまた、投薬量に影響を及ぼし得る。組織／骨成長および／または修復の定期的評価（例えば、X線、組織形態計測的決定、およびテトラサイクリン標識）により、進行をモニタリングすることができる。

【0264】

本発明のポリヌクレオチドはまた、遺伝子治療に有用であり得る。かかるポリヌクレオチ

40
ドは、哺乳動物被験体における発現のために、細胞に、*in vivo*または*ex vivo*のいずれかで導入され得る。本発明のポリヌクレオチドはまた、細胞または生物に核酸（ウイルスベクターまたは裸のDNAの形態にあるものを含むが、これらに限定されない）を導入するための他の既知の方法により投与されてもよい。細胞はまた、かかる細胞に対する所望の影響、またはかかる細胞中の活性を増殖するか、あるいはそれをもたらすために、本発明のタンパク質の存在下で、*ex vivo*で培養してもよい。続いて、治療した細胞は、治療目的で*in vivo*に導入することができる。

【0265】

4.9.3 有効な投与量

本発明で使用するのに適した薬学的組成物は、有効成分が、その対象とする目的を達成す

50

るのに有効な量で含有される組成物を含む。より具体的には、治療上有効な量は、治療中の被験体の現存の症状の発達を防ぐか、あるいはその症状を回復するのに有効な量を意味する。有効な量の決定は、特に本明細書に提供する詳細な開示を鑑みて、十分に当業者の能力内である。本発明の方法で使用される任意の化合物に関して、治療上有効な用量は、最初は適切な *in vitro* アッセイから推定することができる。例えば、用量は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するのに使用することができる循環濃度範囲を達成するように動物モデルにおいて処方することができる。例えば、用量は、細胞培養において決定されるように IC_{50} （すなわち、タンパク質の生物活性の最大の半分の阻害を達成する試験化合物濃度）を含む循環濃度範囲に達成するように、動物モデルにおいて処方することができる。かかる情報を用いて、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。

10

【0266】

治療上有効な用量とは、患者において、症状の回復、あるいは生存の延長をもたらす化合物の量を指す。かかる化合物の毒性および治療効率は、細胞培養物、または実験動物において標準的な薬学的手順（例えば、 LD_{50} （集団の50%に対する致死用量）および ED_{50} （集団の50%に治療上有効な用量）を決定するための）により決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比が治療指数であり、それは、 LD_{50} と ED_{50} との間の比として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。これらの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトで使用するための投与量範囲を処方する際に使用することができる。かかる化合物の投与量は、好ましくは、毒性がほとんどないか、または全くない ED_{50} を含む循環濃度範囲内にある。投与量は、使用する投薬形態、および利用される投与経路に応じて、この範囲内を変更してもよい。正確な処方、投与経路、および投与量は、患者の状態を考慮して、個々の医師により選択され得る。例えば、Finglet al., 1975, in 「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Ch. 1 p. 1を参照されたい。投与量および間隔は、所望の効果、または最小有効濃度（MEC）を維持するのに十分な活性部分の血漿レベルを提供するように、個別に調製され得る。MECは、各化合物に関して多種多量であるが、*in vitro* データから推定することができる。MECを達成するのに必要な投与量は、個々の特性および投与経路に依存する。しかしながら、HPLCアッセイまたはバイオアッセイを用いて、血漿濃度を決定することができる。

20

30

【0267】

投薬間隔はまた、MEC値を用いて決定することができる。化合物は、時間の10～90%、好ましくは30～90%、最も好ましくは50～90%に関して、MECを超える血漿レベルを維持するレジメンを用いて投与するべきである。局所投与または選択的取り込みの場合では、薬剤の有効な局所濃度は、血漿濃度に関連しない場合がある。

【0268】

本発明のポリペプチドまたは他の組成物に関する例示的投薬レジメンは、一日当たり約0.01mg/kg～100mg/kg（体重）の範囲であり、好ましい用量は、一日当たり約0.1mg/kgから25mg/kg（患者の体重）であり、成人および子供で変更する。投薬は、一日一回であってもよく、あるいは投与量を、より長い間隔または短い間隔で送達してもよい。

40

【0269】

投与される組成物の量は、当然のことながら、治療中の被験体、被験体の年齢および体重、苦痛の重篤性、投与様式、および処方医の判断に依存する。

【0270】

4. 9. 4 包装

組成物は、望ましい場合、有効成分を含有する1つまたはそれより多い単位投薬形態を含有し得るパックまたはディスペンサー装置にて付与されてもよい。パックは、例えば金属またはプラスチック箔（例えば、ブリスターパック）を含んでもよい。パックまたはディ

50

スペンサー装置に、投与の説明書を添えてもよい。相溶性薬学的キャリア中に配合された本発明の化合物を含む組成物を、調製し、適切な容器に入れ、適応症の治療に関してラベルしてもよい。

【0271】

4. 10 抗体

4. 10. 1 ヒト抗体

完全ヒト抗体とは、CDRを含む、軽鎖および重鎖の両方の本質的に完全な配列が、ヒト遺伝子に起因する抗体分子に関する。かかる抗体は、本明細書中では「ヒト抗体」または「完全ヒト抗体」と称される。ヒトモノクローナル抗体は、トリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法 [Kozbor, et al., Immunol Today, 4 : 72 (1983) を参照]、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技法 [Cole, et al., 1985 In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 を参照] により調製することができる。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実施に利用されてもよく、またヒト抗体ハイブリドーマにより [Cote, et al., Proc Natl Acad Sci USA 80:2026-2030 (1983) を参照]、あるいはin vitroでのエプスタインバーウイルスを用いてヒトB細胞を形質転換することにより [Cole, et al., 1985 In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 を参照] 産生されてもよい。

【0272】

さらに、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含むさらなる技法を用いて産生することができる [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)、Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]。同様に、ヒト抗体は、トランスジェニックマウス、例えば内因性免疫グロブリン遺伝子を部分的または完全に不活性化したマウスに、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することにより作製することができる。曝露時に、ヒト抗体産生が観察され、それは、遺伝子再配列、構築、および抗体レパートリーを含むすべての点でヒト見られるのと酷似している。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,661,016号、ならびにMarks等 [Bio/Technology, 10:779-783 (1992)]、Lonberg等 [Nature, 368:856-859 (1994)]、Morrisson [Nature, 368:812-13 (1994)]、Fishwild等 [Nature Biotechnology, 14:845-51 (1996)]、Neuberger [Nature Biotechnology, 14:826 (1996)]、およびLonberg and Huszar [Intern: Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)] に記載されている。

【0273】

ヒト抗体はさらに、抗原による曝露に応答して、動物内因性抗体でなく完全ヒト抗体を産生するように改変したトランスジェニック非ヒト動物を用いて産生してもよい (PCT国際公開第94/02602号を参照)。非ヒト宿主における重および軽免疫グロブリン鎖をコードする内因性遺伝子を無能にし、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする活性な遺伝子座を宿主ゲノムに挿入する。ヒト遺伝子を、例えば必須のDNAセグメントを含有する酵母人工染色体を用いて組み込む。次に、所望の改変全てを提供する動物は、完全相補体よりも少ない改変を含有する中間トランスジェニック動物と交配させることで子孫として得られる。かかる非ヒト動物の好ましい実施形態はマウスであり、PCT国際公開第96/33735号および同第96/34096号に開示されているように、Xenomouse (商標) と称される。この動物は、完全ヒト免疫グロブリンを分泌するB

細胞を産生する。抗体は、例えば所望する免疫原感作した後の動物からポリクローナル抗体の調製物として、あるいはモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのような動物由来の不活化B細胞から直接得ることができる。さらに、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子を回収して、発現させて、抗体を直接得ることができるか、あるいはさらに改変させて、例えば単鎖F_v分子のような抗体類似体を得ることができる。内因性免疫グロブリン重鎖の発現を欠如したマウスとして例示される、非ヒト宿主を生産する方法の例は、米国特許第5,939,598号に開示されている。それは、遺伝子座の再配列を防止するために、および再配列した免疫グロブリン重鎖遺伝子座の転写物の形成を防止するために、胚幹細胞において少なくとも1つの内因性重鎖遺伝子座由来のJセグメント遺伝子を欠失させることを含む方法により得ることができ、欠失は、選択マーカーをコードする遺伝子を含有するターゲティングベクターにより達成され、胚幹細胞から体細胞および生殖細胞が選択マーカーをコードする遺伝子を含有するトランスジェニックマウスを生産する。

10

【0274】

ヒト抗体のような所定の抗体を産生する方法は、米国特許第5,916,771号に開示されている。それは、培養においてある1つの哺乳動物宿主細胞に重鎖をコードするヌクレオチド配列を含有する発現ベクターを導入することと、別の哺乳動物細胞に軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含有する発現ベクターを導入することと、2つの細胞を融合して、ハイブリッド細胞を形成することとを含む。ハイブリッド細胞は、重鎖および軽鎖を含有する抗体を発現する。

20

【0275】

この手法におけるさらなる改良では、免疫原上の臨床的に関連あるエピトープを同定する方法、および高親和性で関連エピトープに免疫特異的に結合する抗体の選定に関する方法は、PCT国際公開第99/53049号に開示されている。

【0276】

4.10.2 Fab断片および単鎖抗体

本発明によれば、本発明の抗原タンパク質に特異的な単鎖抗体の産生に関する技法を適応させることができる（例えば、米国特許第4,946,778号参照）、さらに、タンパク質、またはそれらの誘導体、断片、類似体もしくは相同体に対する望ましい特異性を有するモノクローナルF_{ab}断片の迅速でかつ効率のよい同定を可能にするための、F_{ab}発現ライブラリー〔例えば、Huse, et al., Science, 246:1275-1281 (1989)〕の構築のための方法を適応させることができる。(i) 抗体分子のペプシン消化により産生されるF_{(ab)2}断片、(ii) F_{(ab)2}断片のジスルフィド架橋を還元することにより生成されるF_{ab}断片、(iii) パパイインおよび還元剤で抗体分子を処理することにより生成されるF_{ab}断片、および(iv) F_v断片が挙げられるが、これらに限定されない、タンパク質抗原に対するイディオタイプを含有する抗体断片は、当該技術分野で既知の技術により生産され得る。

30

【0277】

4.10.3 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2種の抗原に結合特異性を有するモノクローナル（好ましくは、ヒトまたはヒト化）抗体である。この場合では、結合特異性の1つが、本発明の抗原タンパク質に対するものである。第2の結合標的は、任意の他の抗原であり、好適には、細胞表面タンパク質または受容体もしくは受容体サブユニットである。

40

【0278】

二重特異性抗体を作製する方法は当該技術分野で既知である。伝統的に、二重特異性抗体の組換え産生は、免疫グロブリン重鎖／軽鎖二対の同時発現に基づいており、ここで2つの重鎖は、異なる特異性を有する[Milstein and Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)]。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな分類により、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、10個の異なる抗体分子の潜在的混合物を生産し、そのうちのたった1つが、正確な二重特異性構造を有する。

50

正確な分子の精製は通常、アフィニティークロマトグラフィ工程により達成される。同様の手順が、1993年5月13日に公開された国際公開第93/08829号、およびTrauncker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

【0279】

所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体-抗原組合せ部位）は、免疫グロブリン定常配列に融合させることができる。融合は好ましくは、ヒンジ、CH2、およびCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常領域とである。融合の少なくとも1つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含有する第1の重鎖定常領域（CH1）を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合、および望ましい場合は免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを、別個の発現ベクターに挿入して、適切な宿主生物に同時トランスフェクトする。二重特異性抗体を生成するさらなる詳細に関しては、例えば、Sureshet al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

【0280】

国際公開第96/27011号に記載される別のアプローチによれば、抗体分子の対間の界面は、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体の割合を最大限にするように操作することができる。好ましい界面は、抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第1の抗体分子の界面由来の1つまたはそれより多い小アミノ酸側鎖を、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置き換える。大きな側鎖（複数可）と同一または同様の大きさを有する代償性「空洞」は、大きなアミノ酸側鎖を、より小さな側鎖（例えば、アラニンまたはスレオニン）で置き換えることで、第2の抗体分子の界面上に創出される。これは、ホモ二量体のような他の望ましくない最終生成物を上回ってヘテロ二量体の収率を増加させるメカニズムを提供する。

【0281】

二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片（例えば、 $F(a b')_2$ 二重特異性抗体）として調製することができる。抗体断片から二重特異性抗体を生成する技法は、文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、キメラ結合を用いて調製することができる。Brennan et al., Science, 229:81 (1985)は、無傷抗体がタンパク質分解的に切断されて、 $F(a b')_2$ 断片を生成する手順について記載している。これらの断片は、ジチオール還元剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されて、ビシナルジチオールを安定化して、かつ分子内ジスルフィド形成を防止する。次に、生成された $F a b'$ 断片を、チオニトロベンゾエート（TNB）誘導体に変換する。続いて、 $F a b' - T N B$ 誘導体は、メルカプトエチルアミンによる還元により $F a b' -$ チオールに再変換されて、等モル量の他の $F a b' - T N B$ 誘導体と混合されて、二重特異性抗体を形成する。産生された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化用の作用物質として使用することができる。

【0282】

さらに、 $F a b'$ 断片は、大腸菌から直接回収されて、化学的にカップリングされて、二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は、完全ヒト化二重特異性抗体 $F(a b')_2$ 分子の産生について記載している。各 $F a b'$ 断片は、大腸菌から別個に分泌され、*in vitro*での指向性化学的カップリングに付されて、二重特異性抗体を形成した。こうして形成された二重特異性抗体は、ErB2受容体を過剰発現する細胞、および正常ヒトT細胞に結合することが可能であり、ヒト乳癌標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の溶解活性を誘発することが可能であった。

【0283】

組換え細胞培養から直接二重特異性抗体断片を作製および単離する様々な技法についても記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて産生されている（Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547

ー1553 (1992))。F o s および J u m タンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合による2つの異なる抗体のF a b ' 部分に連結させた。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元して、モノマーを形成し、続いて再酸化して、抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法はまた、抗体ホモ二量体の産生にも利用することができる。H o l l i n g e r e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 90 : 6444-6448 (1993) により記載される「ダイアボディ (d i a b o d y)」技術は、二重特異性抗体断片を作製する代替的メカニズムを提供した。断片は、短すぎて、同じ鎖上の2つのドメイン間での対形成を可能としないリンカーにより軽鎖可変ドメイン (V_L) に連結された重鎖可変ドメイン (V_H) を含む。したがって、1つの断片の V_H および V_L ドメインを、別の断片の相補的 V_H および V_L ドメインと対形成させ、それにより2つの抗原結合部位を形成する。単鎖F v (s F v) 二量体を用いた二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略もまた報告されている。例えば、G r u b e r e t a l . , J . I m m u n o l . , 152 : 5368 (1994) を参照されたい。

10

【0284】

二価以上の原子価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる [T u t t e t a l . , J . I m m u n o l . , 147 : 60 (1991)]。

【0285】

例示的な二重特性抗体は、2つの異なるエピトープに結合することができ、その少なくとも1つが、本発明のタンパク質抗原に源を有する。あるいは、特定の抗原を発現する細胞に対して細胞防御メカニズムを集中させるように、免疫グロブリン分子の抗原アームを、T細胞受容体分子 (例えば、C D 2、C D 3、C D 28、またはB7)、またはF c γ R I (C D 64)、F c γ R I I (C D 32) およびF c γ R I I I (C D 16) のようなI g G用のF c受容体 (F c γ R) のような白血球上の誘発分子に結合するアームと組み合わせることができる。二重特異性抗体はまた、特定の抗原を発現する細胞に、細胞障害剤を誘導するのにも使用することができる。これらの抗体は、抗原結合アーム、およびE O T U B E、D P T A、D O T A、またはT E T Aのような細胞障害剤または放射性核種キレート化剤を結合するアームを保有する。所定の別の二重特異性抗体は、本明細書中に記載するタンパク質抗原を結合し、さらに組織因子 (T F) を結合する。

20

30

【0286】

4. 10. 4 異種結合抗体

異種結合抗体も本発明の範囲内である。異種結合抗体は、2つの共有結合された抗体から構成される。かかる抗体は、例えば、免疫系細胞を望ましくない細胞へとターゲッティングするために (米国特許第4, 676, 980号)、またH I V感染の治療用に (国際公開第91/00360号、国際公開第92/200373号、欧州特許第03089号) 提唱されている。抗体は、架橋剤を包含するものを含む、合成タンパク質化学における既知の方法を用いてi n v i t r oで調製することができることが意図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を用いて、あるいはチオエーテル結合を形成することにより構築することができる。この目的に適切な試薬の例としては、イミノチオレート、

40

【0287】

4. 10. 5 エフェクター機能操作

例えば癌を治療する際の抗体の有効性を増大するように、エフェクター機能に関して本発明の抗体を改変することが望ましい。例えば、システイン残基 (複数) を、F c領域に導入することができ、それによりこの領域中に鎖間ジスルフィド結合形成を可能にする。こうして生成されたホモ二量体抗体は、改善された内部移行能力および/または増大した補体媒介性細胞死滅、および抗体依存性細胞障害性 (A D C C) を有することができる。C a r o n e t a l . , J . E x p M e d . , 176 : 1191-1195 (19

50

92)、およびShopes, J. Immunol., 148:2918-2922 (1992)を参照されたい。増大された抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体は、Wolff et al. Cancer Research, 53:2560-2565 (1993)に記載されるように、ヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製することができる。あるいは、二重Fc領域有する抗体を操作することができ、それにより増大した補体溶解およびADCC能力を有することができる[Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989)]。

【0288】

4. 10. 6 免疫結合体

本発明はまた、化学療法剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素的に反応性のある毒素、あるいはそれらの断片）、または放射性同位体（すなわち、放射性結合体）のような細胞障害剤に結合させた抗体を含む免疫結合体に関する。

【0289】

かかる免疫結合体の生成に有用な化学療法剤は上記に記載されている。使用することができるものとして酵素的に活性な毒素およびその断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、エンドトキシンA鎖（緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）由来）、リシンA毒素、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ（*Aleurites fordii*）のタンパク質、ジアンチン（*dianthin*）タンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（*Phytolacca americana*）タンパク質（PAPI、PAPII、およびPAP-S）、モルモルディカ・キャランチャ（*momordica charantia*）阻害剤、カルシン（*curcin*）、クロチン、サポナリア・オフィシナリス（*saponaaria officinalis*）阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン（*mitogellin*）、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンが挙げられる。様々な放射性核種が、放射性結合抗体の産生に利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、および ^{186}Re が挙げられる。

【0290】

抗体と細胞障害剤との結合体は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート（SPDP）、イミノチオレート（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデート（*adipimide*）HCl）、活性エステル（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビズアジド化合物（例えば、ビス（p-アジドベンジル）ヘキサンジアミン）、ビスジアゾニウム誘導体（例えば、ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン2, 6-ジイソシアネート）、およびビス活性フッ素化合物（例えば、1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン）のような様々な二官能性タンパク質カップリング剤を用いて作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987)に記載されるように調製することができる。炭素14標識したイソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（MX-DTPA）は、抗体に放射性ヌクレオチドを結合するための例示的なキレート剤である。国際公開第94/11026号を参照。

【0291】

別の実施形態では、抗体は、腫瘍プレターゲットングに利用するための「受容体」（例えば、ストレプトアビジン）に結合させることができ、ここで抗体-受容体結合体は、患者に投与されて、続いて清浄剤を用いて循環から未結合の結合体を除去し、次に「リガンド」（例えば、アビジン）を投与して、続いて細胞障害剤に結合させる。

【0292】

4. 11 コンピュータ可読配列

この実施形態の一用途では、本発明のヌクレオチド配列は、コンピュータ可読媒体上に記録することができる。本明細書中で使用する場合、「コンピュータ可読媒体」は、コンピ

ュータにより直接読み取ることができ、かつアクセスすることができる任意の媒体を指す。かかる媒体としては、磁気記憶媒体（例えば、フロッピーディスク、ハードディスク記憶媒体、および磁気テープ）、光記憶媒体（例えば、CD-ROM）、電気記憶媒体（例えば、RAMおよびROM）、および磁気／光記憶媒体のようなこれらの種類のハイブリッドが挙げられるが、これらに限定されない。当業者は、どのようにして現在既知のコンピュータ可読媒体のいずれかを用いて、その上に本発明のヌクレオチド配列を記録したコンピュータ可読媒体を含む製品を創出することができるかを容易に理解することができる。

【0293】

様々なデータ記憶構造物は、本発明のヌクレオチド配列をその上に記録したコンピュータ可読媒体を創出するのに当業者に利用可能である。データ記憶構造物の選択は一般に、記憶される情報にアクセスするのに選択される手段に基づく。さらに、様々なデータプロセッサプログラムおよびフォーマットを用いて、コンピュータ可読媒体上に本発明のヌクレオチド配列情報を記憶させることができる。配列情報は、WordPerfectおよびMicrosoft Wordのような市販のソフトウェアにおいてフォーマット済みのワールドプロセッシングテキストファイルで表すことができるか、あるいはDB2、Sybase、Oracle等のようなデータベースアプリケーションに記憶されたASCIIファイルの形態で表すことができる。本発明のヌクレオチド配列情報を記憶させたコンピュータ可読媒体を得るために、当業者は、多数のデータプロセッサ構造化フォーマット（例えばテキストファイルまたはデータベース）を容易に適応させることができる。

【0294】

コンピュータ可読形態にあるヌクレオチド配列配列番号27、29、33、37、もしくは39のいずれか、またはそれらの代表的断片、あるいは配列番号27、29、33、37、または39のヌクレオチド配列のいずれかに少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を提供することにより、当業者は、様々な目的で配列情報にルーチンでアクセスすることができる。当業者がコンピュータ可読媒体に提供される配列情報にアクセスすることができるコンピュータソフトウェアが公的に利用可能である。以下の例は、Sybaseシステム上でBLAST [Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)]、およびBLAZE [Brutlag et al., Comp. Chem., 17:203-207 (1993)] 検索アルゴリズムを実行するソフトウェアをどのように用いて、核酸配列内のオープンリーディングフレーム(ORF)を特定するかを実証する。かかるORFは、タンパク質コード断片であってもよく、発酵反応および商業的に有用な代謝産物の産生に使用される酵素のような商業的に重要なタンパク質を生産するのに有用であり得る。

【0295】

本明細書中で使用する場合、「コンピュータベースシステム」は、本発明のヌクレオチド配列情報を解析するのに使用される、ハードウェア手段、ソフトウェア手段、およびデータ記憶手段を指す。本発明のコンピュータベースシステムの最小ハードウェア手段は、中央演算処理装置(CPU)、インプット手段、アウトプット手段、およびデータ記憶手段を含む。当業者は、現在利用可能なコンピュータベースシステムの任意の1つが本発明で使用するのに適切であることを容易に理解することができる。上述のように、本発明のコンピュータベースシステムは、本発明のヌクレオチド配列を記憶させたデータ記憶手段、ならびに検索手段を支持および実行するための必要なハードウェア手段およびソフトウェア手段を含む。本明細書中使用する場合、「データ記憶手段」は、本発明のヌクレオチド配列情報を記憶することができるメモリー、または本発明のヌクレオチド配列情報を記憶させた製品にアクセスすることができるメモリーアクセス手段を指す。

【0296】

本明細書中で使用する場合、「検索手段」は、データ記憶手段内に記憶された配列情報と、標的配列または標的構造モチーフを比較するためのコンピュータベースシステム上で実行される1つまたはそれより多いプログラムを指す。検索手段は、特定の標的配列もしくは

は標的モチーフを適合させる既知の配列の断片または領域を特定するのに使用される。様々な既知のアルゴリズムは公的に開示されており、検索手段を実施するための様々な市販のソフトウェアが、本発明のコンピュータベースシステムで使用されるか、または使用され得る。かかるソフトウェアの例としては、Smith-Waterman、Mac Pattern (EMBL)、BLASTN、およびBLASTA (NPOLYPEPTIDEIA) が挙げられるが、これらに限定されない。当業者は、ホモロジー検索を実施するため利用可能なアルゴリズムまたは実行用ソフトウェアパッケージのいずれか1つが本コンピュータベースシステムにおいて使用するのに適応させることができることを容易に理解することができる。本明細書で使用する場合、「標的配列」は、6つ以上のヌクレオチド、または2つ以上のアミノ酸を有する任意の核酸あるいはアミノ酸配列であり得る。当業者は、より長い標的配列ほど、標的配列がデータベース中のランダム発生として提示される可能性が低いことを容易に理解するであろう。標的配列の最も好ましい配列長は、約10～100個のアミノ酸、あるいは約30～300個のヌクレオチド残基である。しかしながら、遺伝子発現およびタンパク質プロセッシングに参与する配列断片のような商業的に重要な断片に関する検索は、長さがより短い場合もあることが理解されよう。

【0297】

本明細書中で使用されるように、「標的構造モチーフ」または「標的モチーフ」は、任意の合理的に選定された配列または配列の組合せを指し、ここで配列(複数可)は、標的モチーフのフォールディング時に形成される三次元立体配置に基づいて選択される。当該技術分野で既知の様々な標的モチーフが存在する。タンパク質標的モチーフとしては、酵素活性部位およびシグナル配列が挙げられるが、これらに限定されない。核酸標的モチーフとしては、プロモーター配列、ヘアピン構造、誘導性発現要素(タンパク質結合配列)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0298】

4. 12 三重らせん形成

さらに、広範に記載される場合、本発明の断片は、三重らせん形成あるいはアンチセンスDNAまたはRNAにより遺伝子発現を制御するのに使用することができ、これらの方法の両方が、DNAまたはRNAへのポリヌクレオチド配列の結合に基づく。これらの方法で使用するのに適したポリヌクレオチドは通常、20～40塩基長であり、転写に参与した遺伝子領域[三重らせん: Lee et al., Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979)、Cooney et al., Science, 152 41: 456 (1988)、およびDervan et al., Science, 251: 1360 (1991)を参照]、またはmRNA自体[アンチセンス: Olmno, J. Neurochem., 56: 560 (1991)、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC press, Boca Raton, FL (1988)]に相補的であるように設計される。三重らせん形成が最適に、DNAからのRNA転写を遮断する結果をもたらす一方で、アンチセンスRNAハイブリダイゼーションは、mRNA分子のポリペプチドへの翻訳を阻止する。両技法は、モデル系で有効であることが実証されている。本発明の配列中に含まれる情報は、アンチセンスまたは三重らせんオリゴヌクレオチドの設計に必要である。

【0299】

4. 13 診断アッセイおよびキット

本発明はさらに、任意に適切な標識と結合されるか、またはそうでなければ標識に連結している本発明の核酸プローブまたは抗体を用いて、試料中の本発明のORFの1つまたはそれらの相同体の存在あるいは発現を同定する方法を提供する。

【0300】

一般に、本発明のポリヌクレオチドを検出する方法は、試料を、ポリヌクレオチドに結合して、それと複合体を形成する化合物と、上記複合体を形成するのに十分な期間を接触させ、上記複合体を検出し、もし複合体が検出される場合、本発明のポリヌクレオチドが試

料中で検出されること、を含むことができる。かかる方法はまた、試料を、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、本発明のポリヌクレオチドにアニーリングする核酸プライマーと、かかる条件下で接触させ、アニーリングしたポリヌクレオチドを増幅し、もしポリヌクレオチドが増幅される場合、本発明のポリヌクレオチドが細胞中で検出されること、を含むことができる。

【0301】

一般に、本発明のポリペプチドを検出する方法は、試料を、ポリヌクレオチドに結合して、それと複合体を形成する化合物と、上記複合体を形成するのに十分な期間接触させ、上記複合体を検出し、もし複合体が検出される場合、本発明のポリペプチドが試料中で検出されること、を含むことができる。

10

【0302】

詳細には、かかる方法は、本発明の1つまたはそれより多い抗体、あるいは1つまたはそれより多い核酸プローブとともに試験試料をインキュベートすることと、試験試料内の構成成分への核酸プローブまたは抗体の結合に関してアッセイすることを含む。

【0303】

試験試料とともに核酸プローブまたは抗体をインキュベートするための条件は様々である。インキュベーション条件は、アッセイで使用する方式、使用する検出方法、およびアッセイで使用する核酸プローブまたは抗体のタイプおよび性質に依存する。当業者は、一般に利用可能なハイブリダイゼーション、増幅または免疫学的アッセイ方式のいずれか1つが、本発明の核酸プローブまたは抗体を利用するのに容易に適應させることができることを理解されよう。かかるアッセイの例は、Chard, T., An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986)、Bullocki, G. R. et al., Techniques in Immunocytochemistry, Academic Press, Orlando, FL Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983), Vol. 3 (1985)、Tijssen, P., Practice and Theory of immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985)に見出すことができる。本発明の試験試料としては、細胞、細胞のタンパク質もしくは膜抽出物、または痰、血液、血清、結晶または尿のような生物学的液体が上げられる。上述の方法で使用される試験試料は、アッセイ方式、検出方法の性質、およびアッセイされるべき試料として使用される組織、細胞または抽出物に基づいて多種多様である。細胞のタンパク質抽出物または膜抽出物を調製する方法は、当該技術分野で既知であり、利用される系と適合性である試料を得るために容易に適應させることができる。

20

30

【0304】

本発明の別の実施形態では、本発明のアッセイを実施するのに必要な試薬を含有するキットが提供される。具体的に、本発明は、(a) 本発明のプローブまたは抗体の1つを含む第1の容器、および(b) 1つまたはそれより多い以下の：洗浄試薬、結合プローブまたは抗体の存在を検出することが可能な試薬を含む1つまたはそれより多い他の容器を含む、1つまたはそれより多い容器を、嚴重に閉じ込めて収容するコンパートメントキットを提供する。

40

【0305】

詳細には、コンパートメントキットは、試薬が別個の容器に含有された任意のキットである。かかる容器としては、小ガラス容器、プラスチック容器、またはプラスチックもしくは紙の細片が挙げられる。かかる容器は、あるコンパートメントから別のコンパートメントへ試薬を効率的に移動させることが可能であり、その結果試料および試薬は、交差汚染されず、各容器の作用物質または溶液を、あるコンパートメントから別のコンパートメン

50

トへ、定量的に添加することができる。かかる容器は、試験試料を入れる容器、アッセイで使用する抗体を含有する容器、洗浄試薬（例えば、リン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝液等）を含有する容器、および結合抗体またはプローブを検出するのに使用される試薬を含有する容器を含む。検出試薬のタイプとしては、標的核酸プローブ、標識二次抗体、あるいは代替物としては、一次抗体が標識される場合、標識抗体と反応することが可能な酵素的または抗体結合試薬が挙げられる。当業者は、開示した本発明のプローブおよび抗体が、当業者に既知の確立されたキット方式の1つに容易に組み込ませることができることを容易に理解されよう。

【0306】

4. 14 医療用イメージング

本発明の新規ポリペプチドおよび結合パートナーは、本発明の分子を発現する部位（例えば、本発明のポリペプチドが、炎症または感染のイメージング部位に関する免疫応答に関与する場合）の医療用イメージングに有用である。例えば、Kunkel et al., 米国特許第5, 413, 778号を参照されたい。かかる方法は、標識またはイメージング剤の科学的結合、薬学的に許容可能なキャリア中の標識ポリペプチドの被験体への投与、および標的部位での *in vivo* での標識ポリペプチドのイメージングを含む。

【0307】

4. 15 スクリーニングアッセイ

本発明の単離タンパク質およびポリヌクレオチドを用いて、本発明はさらに、配列番号27、29、33、37、または39に記載のヌクレオチド配列のいずれかに相当するORFによりコードされるポリペプチドに結合するか、あるいは核酸によりコードされるポリペプチドの特定ドメインに結合する作用物質を獲得および同定する方法を提供する。詳細には、上記方法は：

(a) 本発明のORFによりコードされる単離タンパク質、または本発明の核酸と作用物質を接触させ、

(b) 作用物質が上記タンパク質または上記核酸に結合するかどうかを決定する工程を含む。

【0308】

したがって、概して、本発明のポリヌクレオチドに結合する化合物を同定するかかる方法は、化合物を、本発明のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチド／化合物複合体を形成するのに十分な時間を接触させ、上記複合体を検出し、もしポリヌクレオチド／化合物複合体が検出される場合、本発明のポリヌクレオチドに結合する化合物が同定されること、を含むことができる。

【0309】

したがって、同様に、概して、本発明のポリペプチドに結合する化合物を同定するかかる方法は、化合物を、本発明のポリペプチドと、ポリペプチド／化合物複合体を形成するのに十分な時間接触させ、上記複合体を検出し、もしポリヌクレオチド／化合物複合体が検出される場合、本発明のポリヌクレオチドに結合する化合物が特定されること、を含むことができる。

【0310】

本発明のポリペプチドに結合する化合物を同定する方法はまた、細胞において、本発明のポリペプチドと、ポリペプチド／化合物複合体を形成するのに十分な時間化合物を接触させ、上記複合体は、細胞内の受容体遺伝子配列の発現を駆動し、レポーター遺伝子配列発現を検出することにより上記複合体を検出し、もし上記ポリペプチド／化合物複合体複合体が検出される場合、本発明のポリヌクレオチドを結合する化合物が特定されること、を含むことができる。

【0311】

かかる方法により同定された化合物としては、本発明のポリペプチドの活性を調節する（すなわち、化合物の非存在下で観察される活性に対して、その活性を増加または減少させる）化合物を挙げることができる。あるいは、かかる方法により同定された化合物は、本

10

20

30

40

50

発明のポリヌクレオチドの発現を調節する（すなわち、化合物の非存在下で観察される発現レベルに対して、発現を増加または減少させる）化合物を挙げることができる。本発明の方法により同定された化合物のような化合物は、活性／発現を調節するその能力に関して、当業者には既知の標準的なアッセイを用いて試験することができる。

【0312】

上記アッセイでスクリーニングされる作用物質は、ペプチド、炭水化物、ビタミン誘導体、または他の薬学的作用物質であり得るが、これらに限定されない。作用物質は、タンパク質モデリング技法を用いて、ランダムに選定およびスクリーニングされ得るか、あるいは合理的に選定または設計され得る。

【0313】

ランダムスクリーニングに関して、ペプチド、炭水化物、薬学的作用物質等のような作用物質は、ランダムに選定されて、本発明のORFによりコードされるタンパク質に結合するそれらの能力に関してアッセイされる。あるいは、作用物質は、合理的に選定または設計される。本明細書中で使用する場合、作用物質が特定のタンパク質の立体配置に基づいて選択される場合、その作用物質は、「合理的に選定または設計される」と言われる。例えば、当業者は、合理的に設計された抗ペプチドペプチド（例えば、Hurby et al., Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides, 「In Synthetic Peptides, A User's Guide, W. H. Freeman, NY (1992), pp. 289-307、およびKaspiczak et al., Biochemistry 28: 9230-8 (1989)を参照）、あるいは薬学的作用物質等を生成するために、特定のペプチド配列に結合することが可能なペプチド、薬学的作用物質等を生成するための現在利用可能な手順を容易に適応させることができる。

【0314】

上述のもののほかに、本発明の作用物質に1つの種類を、大まかに記載する場合、本発明のORFまたはEMFの1つに結合することにより、遺伝子発現を制御するのに使用することができる。上述のように、かかる作用物質は、ランダムにスクリーニングされ得るか、または合理的に設計／選定され得る。ORFまたはEMFのターゲッティングにより、当業者は、発現制御用の同じEMFに依存する単一ORFまたは複数ORFの発現を調節する配列特異的または要素特異的作用物質を設計することが可能である。DNA結合作用物質の1つの種類は、DNAもしくはRNAにハイブリダイズするか、あるいはDNAもしくはRNAに結合することにより三重らせん形成を形成する塩基残基を含有する作用物質である。かかる作用物質は、古典的なホスホジエステル、リボ核酸骨格に基づくことができるか、あるいは塩基結合能力を有する様々なスルフィドリルまたは高分子誘導体であり得る。

【0315】

これらの方法で使用するのに適した作用物質は通常、20～40個の塩基を有しており、転写に関与した遺伝子領域〔三重らせん：Lee et al., Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979)、Cooney et al., Science, 241: 456 (1988)、およびDervan et al., Science, 251: 1360 (1991)を参照〕、またはmRNA自体〔アンチセンス：Okano, J. Neurochem., 56: 560 (1991)、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC press, Boca Raton, FL (1988)〕に相補的であるように設計される。三重らせん形成が最適に、DNAからのRNA転写を遮断する結果をもたらす一方で、アンチセンスRNAハイブリダイゼーションは、mRNA分子のポリペプチドへの翻訳を阻止する。両技法は、モデル系で有効であることが実証されている。本発明の配列中に含まれる情報は、アンチセンスまたは三重らせんオリゴヌクレオチドおよび他のDNA結合作用物質の設計に必要である。

【0316】

本発明のORFの1つによりコードされるタンパク質に結合する作用物質は、診断剤として使用することができる。本発明のORFの1つによりコードされるタンパク質に結合する作用物質は、薬学的組成物を生成するための既知の技法を用いて配合することができる。

【0317】

4. 16 プローブとしての核酸の使用

本発明の別の態様は、天然に存在するヌクレオチド配列とハイブリダイズすることが可能なポリペプチド特異的核酸ハイブリダイゼーションプローブを提供することである。本発明のハイブリダイゼーションプローブは、ヌクレオチド配列配列番号27、29、33、37、または39のいずれかに由来され得る。相当する遺伝子は限定数の組織のみで発現されるため、ヌクレオチド配列配列番号27、29、33、37、または39のいずれかに由来する核酸プローブは、試料中のかかる組織の細胞型のRNAの存在の指標として使用することができる。

【0318】

例えば *in situ* ハイブリダイゼーションのような任意の適切なハイブリダイゼーション技法を使用することができる。米国特許第4,683,195号および同第4,965,188号に記載されるようなPCRは、ヌクレオチド配列に基づいたオリゴヌクレオチドに関するさらなる使用を提供する。PCRで使用されるかかるプローブは、組換え起源のものであってもよく、化学的に合成されてもよく、あるいはその両方の混合物であってもよい。プローブは、同一配列の検出のための別個のヌクレオチド配列、または密接に関連したゲノム配列の同定のための考え得る配列の縮重プールを含む。

【0319】

核酸用の特定のハイブリダイゼーションプローブを生産する他の手段としては、mRNAプローブの生産のための、ベクターへの核酸配列のクローニングが挙げられる。かかるベクターは当該技術分野で既知であり、市販されており、またT7またはSP6 RNAポリメラーゼおよび適切な放射性標識ヌクレオチドの添加を用いて *in vitro* でRNAプローブを合成するのに使用してもよい。ヌクレオチド配列は、それらの個々のゲノム配列のマッピング用のハイブリダイゼーションプローブを構築するのに使用されてもよい。本明細書中に提供されるヌクレオチド配列は、既知の遺伝子および／または染色体マッピング技法を用いて、染色体または染色体の特定領域に対してマッピングされ得る。これらの技法としては、*in situ* ハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する連鎖分析、既知の染色体に特異的なライブラリーまたは流れ分類した (*flow-sorted*) 染色体調製物を用いたハイブリダイゼーションスクリーニング等が挙げられる。染色体広がり (*chromosome spreads*) の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションの技法は、他の場所にも記載されているが、Verma et al (1988) *Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques*, Pergamon Press, New York NYに記載されている。

【0320】

染色体調製物の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション、および他の物理的染色体マッピング技法は、さらなる遺伝子マップデータと関連させてもよい。遺伝子マップデータの例は、1994 *Genome Issue of Science* (265:1981 f)に見出すことができる。物理的染色体マップ上の核酸の位置と特定の疾患（または特定の疾患にかかりやすい素因）との相関関係は、当該遺伝病と関連したDNA領域の範囲を定めることを助け得る。本発明のヌクレオチド配列は、正常な保有者と罹患した個体との間の遺伝子配列の差異を検出するのに使用され得る。

【0321】

4. 17 支持体結合性オリゴヌクレオチドの調製

オリゴヌクレオチド、すなわち小核酸セグメントは、一般に自動オリゴヌクレオチド合成機を用いて実施されるように、例えば化学的手段により直接オリゴヌクレオチドを合成す

ることにより容易に調製され得る。

【0322】

支持体結合性オリゴヌクレオチドは、ガラス、ポリスチレン、またはテフロンのような任意の適切な支持体を用いて、当業者に既知の任意の方法により調製され得る。1つの戦略は、標準的な合成機により合成されるオリゴヌクレオチドを正確にスポッティングすることである。固定化は、受動吸着を用いて [Inouye & Hondo, J. Clin Microbiol, 28(6):1462-73 (1990)]、UV光を用いて [Nagata et al. (1985); Dahlen et al. (1987); Morrissey & Collins, Mol. Cell Probes, 3(2):189-207 (1989)] を用いて、あるいは塩基修飾DNAの共有結合により [Keller et al., 1988; 1989] (参照文献はすべて、具体的に本明細書中に援用される) 達成することができる。

10

【0323】

使用され得る別の戦略は、リンカーとしての強力なビオチン-ストレプトアビジン相互作用の使用である。例えば、Broude et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 91(8):3072-6 (1984) は、ビオチン化プローブの使用について記載しているが、これらは、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズ上に固定化された二重鎖プローブである。ストレプトアビジン被覆ビーズは、Dynal, Oslo から購入され得る。当然のことながら、この同じ連結化学は、ストレプトアビジンで任意の表面を被覆するのに適用可能である。ビオチン化プローブは、様々な供給源 (例えば、Operon Technologies (Alameda, CA) のような) から購入され得る。

20

【0324】

Nunc Laboratories (Naperville, IL) はまた、使用することができる適切な材料を販売している。Nunc Laboratories は、DNA を Covalink NH と呼ばれるマイクロウェル表面に共有結合できる方法を開発した。Covalink NH は、さらなる共有結合のための架橋ヘッドとして作用する第二アミノ基 ($>NH$) でグラフトしたポリスチレン表面である。Covalink Modules は、Nunc Laboratories から購入することができる。DNA 分子は、ホスホルアミデート結合により 5' 末端のみで Covalink に結合されてもよく、1 pmol より多い DNA の固定化を可能にする [Rasmussen et al., Anal Biochem., 198(1):138-42 (1991)]。

30

【0325】

5' 末端での DNA 分子の共有結合のための Covalink NH 細片の使用について記載されている [Rasmussen et al., 1991]。この技術では、ホスホルアミデート結合を使用する [Chu et al., Nucleic Acids, 11(18):6513-29 (1983)]。単一共有結合のみを用いた固定化が好ましい場合に、これは有益である。ホスホルアミデート結合は、2 nm 長のスペーサーアームによりポリスチレン表面上に共有結合的にグラフトされたスペーサーアームの末端に位置される Covalink NH 第二アミノ基に DNA を連結する。ホスホルアミデートによる Covalink NH にオリゴヌクレオチドを連結するために、オリゴヌクレオチド末端は、5' 末端リン酸基を有さなくてはならない。おそらく、ビオチンが Covalink に共有結合し、続いて使用されるストレプトアビジンがプローブを結合することさえ可能である。

40

【0326】

より具体的には、結合方法は、水中に DNA を溶解させること ($7.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$) と、 95°C で 10 分間変性させることと、10 分間氷上で冷却することを含む。次に、氷冷 0.1 M 1-メチルイミダゾール ($\text{pH } 7.0$) (1-MeIm_7) を、最終濃度 10 mM 1-MeIm_7 となるように添加する。次に、ssDNA 溶液を、氷上に固定した Covalink NH 細片に分取する ($75 \mu\text{l}/\text{ウェル}$)。

50

【0327】

10 mM 1-MeIm₇ 中に溶解したカルボジイミド (0.2 M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC)) を新たに作製し、25 μl をウェルごとに添加する。細片を 50 °C で 5 時間インキュベートする。インキュベーション後、細片を、例えば Nunc-Immuno Wash を用いて洗浄する：まずウェルを 3 回洗浄し、続いて洗浄用溶液を用いて 5 分間細片を浸し、最終的に細片を 3 回洗浄する (ここで、洗浄用溶液は、50 °C に加熱した 0.4 N NaOH、0.25 % SDS である)。

【0328】

本発明で使用するためのさらなる適切な方法は、PCT 特許出願国際公開第 90/033 82 号 (Southern & Maskos) (参照により本明細書に援用される) に記載される方法が意図される。支持体に結合されたオリゴヌクレオチドを調製する方法は、支持体により保有された脂肪族水酸基に、ホスホジエステル共有結合によりリン酸基を通じてヌクレオチド 3' 試薬を結合することを含む。次に、オリゴヌクレオチドを、支持されたヌクレオチド上で合成し、支持体からオリゴヌクレオチドが切断されない標準的な条件下で、合成オリゴヌクレオチド鎖から保護基を除去する。適切な試薬としては、ヌクレオシドホスホルアミダイトおよびヌクレオシドリソニ化水素が挙げられる。

【0329】

DNA プロブアレイの調製のためのオンチップ戦略を使用してもよい。例えば、Fodor et al., Science, 251 (4995): 767-73 (参照により本明細書に援用される) により記載されるように、アドレス可能なレーザ活性化光脱保護を、直接ガラス表面上でのオリゴヌクレオチドの化学合成で使用してもよい。プロブはまた、Van Ness et al., Nucleic Acids Res., 19 (12): 3345-50 (1991) に記載されるようにナイロン支持体上に固定されてもよく、あるいは Duncan & Cavalier, Anal. Biochem., 169 (1): 104-8 (1988) の方法を用いてテフロンに連結されてもよい (参照文献はすべて、具体的に参照により本明細書中に援用される)。

【0330】

Van Ness et al., (1991) に記載されるように、ナイロン支持体にオリゴヌクレオチドを連結することは、アルキル化、およびシアヌル酸塩化物を用いたオリゴヌクレオチドの 5'-アミンの選択的活性化により、ナイロン表面の活性化を必要とする。

【0331】

支持体結合性オリゴヌクレオチドを調製する 1 つの特定の方法の 1 つは、Pease et al., Proc., Natl. Acad. Sci., USA, 91 (11): 5022-6 (1994) により記載される光生成合成を利用することである。これらの著者等は、固定化オリゴヌクレオチドプロブのアレイ (DNA チップ) を生成する現在のフォトリソグラフィ技法を使用した。高密度小型化アレイ中のオリゴヌクレオチドプロブの合成を誘導するのに光が使用されるこれらの方法は、感光性 5'-保護 N-アシルデオキシヌクレオシドホスホルアミダイト、表面リンカー化学、および可変性コンビナトリアル合成戦略を利用する。256 個の空間的に規定されたオリゴヌクレオチドプロブのマトリックスは、この方法で生成され得る。

【0332】

4.18 核酸断片の調製

核酸は、任意の増幅工程なく、cDNA、ゲノム DNA、染色体 DNA、顕微解剖した染色体バンド、コスミドまたは YAC 挿入物、および RNA (mRNA を含む) のような任意の適切な供給源から得られ得る。例えば、Sambrook 等 (1989) は、哺乳動物細胞から高分子量 DNA を単離するための 3 つのプロトコルについて記載している (p. 9.14~9.23)。

【0333】

DNA断片は、M13、プラスミドまたはλベクター中でクローンとして調製されてもよく、かつ／またはPCRもしくは他の増幅方法により、ゲノムDNAまたはcDNAから直接調製してもよい。試料は、マルチウェルプレート中で調製されてもよく、あるいは分取されてもよい。約100～1000ngのDNAを、最終容量2～500ml中に調製してもよい。

【0334】

次に、核酸は、例えばSambrook等(1989)の9.24～9.28に記載されるような制限酵素の使用、超音波によるせん断、およびNaOH処理を含む、当業者に既知の方法のいずれかにより断片化される。

【0335】

Schrieffer et al., Nucleic Acids Res., 18(24):7455-6 (1990)に記載されるように、低圧せん断もまた適切である。この方法では、DNA試料を、様々な低～中圧で、小さなフレンチプレスセルに通す。レバー装置は、セルへの低～中圧の制御された印加を可能にする。これらの研究は、低圧せん断が音波および酵素DNA断片方法に対する有用な代替法であることを示す。

【0336】

1つの特に適切なDNAの断片化方法は、Fitzgerald et al., Nucleic Acids Res., 20(14):3753-62 (1992)に記載される2塩基認識エンドヌクレアーゼCviJIを用いた方法であることを意図される。これらの著者等は、ショットガンクローニングおよびシーケンシングに適切であることを意図する特定サイズへの迅速なDNAの断片化および分画のためのアプローチについて記載している。

【0337】

制限エンドヌクレアーゼCviJIは通常、GとCとの間で認識配列PuGCPyを切断して、平滑末端を残す。典型的な反応条件は、この酵素(CviJI**)の特異性を変更し、小分子pUC19(2688塩基対)由来のDNA断片の準ランダム分布をもたらす。Fitzgerald等(1992)は、迅速なゲルろ過方法によりサイズ分画され、末端修復なしでlacZ-M13クローニングベクターに直接連結させたpUC19のCviJI**消化物を用いて、この断片戦略のランダム性を定量的に評価した。76個のクローンの配列分析により、CviJI**は、PuGCPy部位のほかに、PyGCPy部位およびPuGCPuを制限し、新たな配列データがランダム断片化と一致した速度で蓄積されることがわかった。

【0338】

文献で報告されているように、音波処理およびアダロースゲル分画に比較したこのアプローチの利点としては、少量のDNAが必要であること(2～5μgではなく、0.2～0.5μg)、およびより少ない工程を伴うこと(前連結反応、末端修復、化学的抽出、またはアガロースゲル電気泳動、および溶出は必要とされない)が挙げられる。

【0339】

核酸断片が得られるか、または調製される様式に関係なく、ハイブリダイゼーションに利用可能な一本鎖片を付与するためにDNAを変性させることが重要である。これは、80～90℃で2～5分間、DNA溶液をインキュベートすることにより達成される。次に、溶液を迅速に2℃にまで冷却して、DNA断片をチップと接触させる前にDNA断片が再生することを防止する。リン酸基はまた、当該技術分野で既知の方法によりゲノムDNAから除去されなくてはならない。

【0340】

4.19 DNAアレイの調製

アレイは、ナイロン膜のような支持体上にDNA試料をスポッティングすることで調製され得る。スポッティングは、金属ピンアレイ(その位置は、マイクロタイタープレート中のウェルのアレイに相当する)を用いて実施され、ナイロン膜にDNA溶液約20nlを転写するまで繰り返され得る。オフセット印刷により、ウェルの密度よりも高いドット密

10

20

30

40

50

度が達成される。使用する標識タイプに依存して、 1 mm^2 中に1～25ドットが収容されてもよい。幾つかの予め選択した数の横列および縦列にスポッティングすることを回避することで、別個のサブセット（サブアレイ）が形成され得る。1つのサブアレイ中の試料は、異なる個体由来のDNA（または同じ遺伝子）の同じゲノムセグメントであってもよく、あるいは異なる重複したゲノム部分であってもよい。サブアレイはそれぞれ、同じ試料のレプリカスポッティングを表してもよい。一例では、選択遺伝子セグメントを、64人の患者から増幅してもよい。各患者に関して、増幅した遺伝子セグメントは、96ウェルプレート中に存在してもよい（ウェルはすべて、同じ試料を含有する）。64人の患者それぞれ用のプレートを調製する。96ピン装置を使用することで、試料はすべて、 $8 \times 12\text{ cm}$ 膜上にスポッティングされ得る。サブアレイは、各患者から1つずつ64個の試料を含有してもよい。96個のサブアレイが同一である場合、ドットスパンは、 1 mm^2 であってもよく、サブアレイ間に 1 mm の空間が存在してもよい。

10

【0341】

別のアプローチは、物理的スペーサー、例えば膜上にわたって成形したプラスチックグリッドにより仕切られてもよい膜またはプレート（NUNC, Naperville, Illinoisから入手可能）を使用することであり、グリッドは、マルチウェルプレートの基部に適用した膜、または疎水性細片の種類と同様である。固定物理的リンカーは、平面蛍光貯蔵スクリーンまたはX線フィルムへの暴露によるイメージングには好ましくない。

20

【0342】

本発明は、以下の実施例で説明される。本開示を考慮して、当業者は、本発明の範囲内で多くの他の実施形態および変形がなされ得ることを理解されよう。したがって、本発明の広範な態様は、以下の実施例の開示により限定されないことを意図する。本発明は、本発明の単一態様の説明として意図される例示的实施形態により範囲を限定されず、機能的に等価な組成物および方法が本発明の範囲内である。実際に、本発明の実施における数多くの変更および変形が、この好ましい実施形態を考慮して、当業者の心に浮かぶことが予測される。したがって、本発明の範囲に課せられるべき唯一の制限は、併記の特許請求の範囲に見られるものである。

【0343】

本明細書の主要部分内で引用した参考文献はすべて、それらの全体が参照により本明細書に援用される。

30

【0344】

5. 実施例

実施例1

ヒト細胞のcDNAライブラリーからの配列番号1～21の単離

大多数の新規核酸は、標準的なPCR、Sequencing By Hybridization法による配列サイン解析、およびサンガーシーケンシング技法を用いて、ヒト胎児肝臓、脾臓、卵巣、成人脳、肺腫瘍、脊髄、頸部、卵巣、内皮細胞、臍帯、胎盤、リンパ球、肺線維芽細胞、胎児脳、および精巣から調製されるcDNAライブラリーから得られた。ライブラリーの挿入物を、挿入物に隣接するベクター配列に特異的なプライマーを用いて、PCRにより増幅させた。これらの試料をナイロン膜上にスポッティングして、オリゴヌクレオチドプローブにより応答させて（interrogate）配列サインを付与した。クローンを、類似または同一の配列の群に集めて、単一の代表的クローンを、ゲルシーケンシング用に各群から選定した。次に、増幅挿入物の5'配列を、典型的なサンガーシーケンシングプロトコルにおいて、逆M13シーケンシングプライマーを用いて推定した。PCR産物を精製して、蛍光色素ターミネーターサイクルシーケンシングに付した。シングルパスゲルシーケンシングを、377 Applied Biosystems（ABI）シーケンサーを用いて行った。これらの挿入物を、このライブラリーからはこれまで得られておらず、かつ公的データベースでこれまで報告されていない新規配列として同定した。これらの配列は、添付の配列表で、配列番号1～21として示す。

40

50

【0345】

実施例 2

配列番号 22 および 24 の構築物

本発明の新規核酸（配列番号 22 および 24）は、上記実施例 1 に記載する方法により、cDNA ライブラリーから得られる配列から構築された。最終的な配列は、シード（seed）として EST 配列を使用することで構築した。次に、再帰的アルゴリズムを用いて、この構築物に属する EST 配列を含有する Hyseq's データベースからさらなる配列を引き寄せることで、伸長した構築物にシードを伸長させた。完全コンティグが構築されると、アルゴリズムは終了した。構築物へのコンポーネント配列の含入は、300 を超える BLAST スコアおよび 95 % を超える % 同一性を有する伸長構築物に対する BLASTN ヒットに基づいていた。 10

【0346】

構築した配列（配列番号 22 または 24）に関する隣接結果が、Fastxy アルゴリズムを用いた、Genpept リリース 114 に対する FASTA バージョン 3 検索により得られた。Fastxy は、コドン内フレームシフトを許容する FASTA アラインメントの改良バージョンである。隣接結果は、それぞれの構築物に関して最も近い相同体を Genpept から示した（隣接結果は、構築物がコードする翻訳アミノ酸配列を含有する）。隣接結果を以下に記載する：

【0347】

【表 1】

20

アクセッション番号	説明	Smith-Waterman スコア	%同一性
Z35597	ホヤ貝ニドゲン前駆タンパク質と未知の弱い相同性（blastp スコア 71）、cDNA EST EMBL	760	36.188

30

【0348】

以下に記載するように、ポリペプチドは、配列番号 22（または 24）によりコードされることが予測された。ポリペプチドは、既知のポリペプチドと、翻訳新規ポリヌクレオチドとの比較に基づいてポリペプチドを選定する FASTY と呼ばれるソフトウェアプログラム（hyyp://fasta.bioch.virginia.edu から利用可能）を用いて予測された（W. R. Pearson, Methods in Enzymology, 183:63-98（1990）、参照により本明細書に援用される）。

【0349】

【表 2】

アミノ酸セグメントの1番目のアミノ酸残基に相当する予測開始ヌクレオチド位置	アミノ酸セグメントの最終アミノ酸残基に相当する予測終結ヌクレオチド位置	コードされたポリペプチドのアミノ酸組成（ここで、A=アラニン、C=システイン、D=アスパラギン酸、E=グルタミン酸、F=フェニルアラニン、G=グリシン、H=ヒスチジン、I=イソロイシン、K=リシン、L=ロイシン、M=メチオニン、N=アスパラギン、P=プロリン、Q=グルタミン、R=アルギニン、S=セリン、T=スレオニン、V=バリン、W=トリプトファン、Y=チロシン、X=未知、*=終止コドン、/=ヌクレオチド欠失の可能性、\=ヌクレオチド挿入の可能性）
2 6 6 9	1 3 8 8	PRVRPRVRTDHNYYISRIYGPSDSASRDWV NIDQMEKDKVKIHLGNTHRQAARVNLSFD FPFYGHFLREITVATGGFIYTGEVVHRMLTA TQYIAPLMANFDPFSVRNSTVRYFDNGTALV VQWDHVHLQDNYNLGSFTFQATILLMDGRI FGYKEIPVLVTQISSTNHPVKVGLSDAFVVV HRIQQIPNVRRRTIYIYHRVELQMSKITNISA VEMTLPPTCLQFNRCGPCVSSQIGFNCWSCS KLQRCSSGFDRHRQDWVDSGCPEESKEKMC ENTEPVETFLEPPQP*ERQPPSSGS*LPPE/DA VTSQFPTSLPTEDDTKIALHLKDNGASTDDS AAEKKGGTLHAGLIVGILJLVIVATAILVTV YMYHHPTSAASIFFIERRPSRWPAMKFRGRS GHPAYAEVEPVGEKEGFVSEQC (SEQ ID NO: 35)

10

20

30

40

50

【0350】

実施例 3

配列番号 27 の構築物

本発明の新規核酸（配列番号 27）は初めに、上記実施例 1 に記載する方法により、cDNA ライブラリーから得られる配列から構築された。最終的な配列は、シードとして EST 配列を使用することで構築した。次に、再帰的アルゴリズムを用いて、伸長した構築物に、この構築物に属する EST 配列を含有する Hyseq's データベースからさらなる配列を引き寄せることで、シードを伸長させた。完全コンティグが構築されると、アルゴリズムは終了した。構築物へのコンポーネント配列の含入は、300 を超える BLAST スコアおよび 95% を超える % 同一性を有する伸長構築物に対する BLAST ヒットに基づいていた。

【0351】

この初期配列を用いて、初期配列を含む EST の増幅用に、適切なプライマーを設計した。産物をクローニングした。DNA を単離し、適切な制限酵素で切断し、連結して、再クローニングして、完全長コンティグを生成した。次に、完全長産物をクローニングして、377 Applied Biosystems (ABI) シーケンサーを用いてシーケンシングした。このヌクレオチド配列は、配列番号 27 と同一であった。

【0352】

あるいは、完全長幹細胞因子様 DNA を、Marathon-ready 脾臓 cDNA ライブラリー (Clontech) から、適切なプライマーを用いて PCR 増幅した。第一 PCR 産物を、ネステッド PCR プライマーを用いてさらに増幅した。第二 PCR の産物

を、377 Applied Biosystems (ABI) シーケンサーを用いて配列決定した。この産物は、配列番号27と同一であった。

【0353】

実施例4

配列番号23および25の構築物

RHPAP (Univ. of Washington) を用いて、完全長遺伝子cDNA配列および相当するタンパク質配列を、構築物から生成した。任意のフレームシフトおよび間違っただけの終止コドンを、手動編集により正した。編集後、配列は、Genbank (すなわち、Genepeptリリース115) に対してFASTYおよび/またはBLASTを用いてチェックした。編集プロセスで使用し得た他のコンピュータプログラムは、p10
hrredPhrapおよびConsed (University of Washington)、ならびにed-ready、ed-ext、およびcgenzip-2 (Hyseq, Inc.) であった。

【0354】

以下に記載するように、ポリペプチド (配列番号28) は、配列番号27によりコードされることが予測された。ポリペプチドは、既知のポリヌクレオチドと、翻訳された新規ポリヌクレオチドとの比較に基づいてポリペプチドを選定するBLASTXと呼ばれるソフトウェアプログラムを用いて予測された。開始メチオニンは、配列番号3の位置123で始まり、推定終止コドンTAAは、ヌクレオチド配列の位置1710から始まる。

【0355】

配列番号28の幹細胞成長因子様ポリペプチドは、グリコシル化されていない予測分子量およそ59.2 kDaを有するおよそ529個のアミノ酸タンパク質である。BLASTPアルゴリズムを用いたタンパク質データベース検索 [Altschul S. F. et al., J. Mol. Evol., 36:290-300 (1993)、およびAltschul S. F. et al., J. Mol. Biol., 21:403-10 (1990)、参照により本明細書に援用される] は、配列番号28が、腫瘍内皮マーカー7前駆タンパク質に相同的であることを示す。

【0356】

図2は、幹細胞成長因子様ポリペプチド配列番号28によりコードされるタンパク質と、腫瘍内皮マーカー7前駆タンパク質配列番号36 [St. Croix et al., Science, 289:1197-1201] との間のBLASTXアミノ酸配列アライメントを示し、2つの配列が、441個のアミノ酸残基にわたって72%類似性、および同じ441個のアミノ酸残基にわたって57%同一性を共有することを示している。

【0357】

予測されるおよそ30残基のシグナルペプチドは、配列番号28のコードされたおよそ残基1～残基30である (シグナルペプチドは、配列番号30に記載される)。細胞外部分は、それ自体で有用である。これは、哺乳動物細胞での発現および切断産物のシーケンシングにより確認することができる。シグナルペプチド領域は、Neural Network SignalP V1.1プログラム [Nielsen et al, Int. J. Neur. Syst. 8:581 (1997)] (Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmarkから)、およびKyte/Doolittleアルゴリズム [Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157:105 (1982)] を用いた疎水性解析を用いて予測された。切断部位は、コンピュータプログラムにより予測されるのと異なり得ることは当業者に理解されよう。配列番号31は、シグナルペプチドが配列番号28から除去される場合に生じるペプチドである。

【0358】

予測されるおよそ28残基の膜貫通領域は、配列番号28のコードされたおよそ残基452～残基479であり (配列番号23)、それは、哺乳動物細胞における発現により確認

10

20

30

40

50

され得る。膜貫通領域は、Neural Network SignalP V1.1プログラム[Nielsen et al, Int. J. Neur. Syst. 8:581 (1997)](Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmarkから)、およびKyte/Doolittleアルゴリズム[Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157:105 (1982)]を用いた疎水性解析を用いて予測された。膜貫通領域は、コンピュータプログラムにより予測されるのと異なり得ることは当業者に理解されよう。

【0359】

ポリペプチド(配列番号25)は、以下に記載するように、配列番号24によってコードされることが予測された。このポリペプチドは、既知のポリヌクレオチドと、翻訳された新規ポリヌクレオチドとの比較に基づいてポリペプチドを選定するBLASTXと呼ばれるソフトウェアプログラムを用いて予測された。開始メチオニンは、配列番号24の位置107で始まり、推定終止コドンTAAは、ヌクレオチド配列の位置1280から始まる。

10

【0360】

配列番号25の幹細胞成長因子様ポリペプチド(配列番号23と同一)は、グリコシル化されていない予測分子質量およそ50kDaを有するおよそ392個のアミノ酸タンパク質である。BLASTPアルゴリズムを用いたタンパク質データベース検索[Altschul S. F. et al., J. Mol. Evol., 36:290-300 (1993)、およびAltschul S. F. et al., J. Mol. Biol., 21:403-10 (1990)、参照により本明細書に援用される]は、配列番号25が、腫瘍内皮マーカー7前駆タンパク質に相同的であることを示す。

20

【0361】

予測されるおよそ28残基の膜貫通領域は、配列番号25のコードされたおよそ残基315～残基342である(配列番号23)。それは、哺乳動物細胞における発現により確認され得る。膜貫通領域は、Neural Network SignalP V1.1プログラム[Nielsen et al, Int. J. Neur. Syst. 8:581 (1997)](Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmarkから)、およびKyte/Doolittleアルゴリズム[Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157:105 (1982)]を用いた疎水性解析を用いて予測された。膜貫通領域は、コンピュータプログラムにより予測されるのと異なり得ることは当業者に理解されよう。

30

【0362】

実施例5

A. 可溶性幹細胞因子様ポリヌクレオチド(配列番号33)およびポリペプチド(配列番号34)のクローニングならびに発現

可溶性幹細胞因子様ポリペプチドを発現するために、完全長幹細胞因子様DNAを、Marathon-ready脾臓cDNAライブラリー(Clontech)からPCR増幅した。第一PCR産物を、適切な細胞系で発現させると可溶性幹細胞因子様ポリペプチドを生成するような、ネステッドPCRプライマーを用いてさらに増幅した。第二PCRの産物(配列番号33)を、EcoRIとXhoI部位との間でpCDNA3.1/Myc-His(+)-Aにクローニングした。可溶性幹細胞因子様ポリペプチドをコードするプラスミド、および対照ベクターを、FuGENE-6トランスフェクション試薬(Roche)を用いてCHO細胞にトランスフェクトした。培地、細胞溶解産物、および不溶性細胞片を、SDS-PAGE、続いて抗myc抗体を用いたウェスタンブロッティングで分析した。予想通り、95%を超える可溶性幹細胞因子様ポリペプチドが(配列番号34)が分泌され、培地に存在することがわかった。

40

【0363】

50

同様のアプローチを用いて、配列番号34を発現する293細胞の安定な細胞系もまた生成した。これらをさらにクローニングして、高発現体 (e x p r e s s o r)、中発現体、および低発現体を選定した。

【0364】

B. 昆虫および細菌細胞からの配列番号34の発現ならびに精製
幹細胞因子様タンパク質を、下記の通りに昆虫細胞で発現させた。

【0365】

幹細胞成長因子様遺伝子 (配列番号33) のC末端膜貫通ドメイン欠失型を、p I B / V 5 - H i s T O P O T A クローニングベクター (I n v i t r o g e n C o r p o r a t i o n) にPCRによりクローニングした。ベクター中の幹細胞因子様DNAは、M y c / H i s タグを用いて、あるいは任意のタグを用いずに生成した。昆虫細胞 (H i g h F i v e T M, I n v i t r o g e n) を、I n s e c t S e l e c t T M S y s t e m (I N v i t r o g e n) を用いることで、タグを含有する幹細胞成長因子様プラスミドDNAでトランスフェクトした。幹細胞成長因子様タンパク質の発現は、一過性発現により確認された。発現された幹細胞成長因子様タンパク質を含有する培地を、S D S - P A G E 上で分離して、幹細胞成長因子様タンパク質を、ウェスタンブロット分析により同定した。幹細胞成長因子様タンパク質の大規模な生産のために、U l t i m a t e I n s e c t T M S e r u m - F r e e 培地 (I n v i t r o g e n) を入れたフラスコに、耐性細胞を拡大させた。細胞を27℃約100m p h で4日間振とうした。精製のタンパク質を含有する上清培地を遠心分離により回収した。

10

20

【0366】

幹細胞因子様タンパク質を、下記の通りに細菌細胞で発現させた。

【0367】

膜貫通ドメインをもたない成熟幹細胞成長因子様遺伝子 (配列番号33) を、I n v i t r o g e n の発現ベクター (P C R T 7 / N T - T O P O) にクローニングした。生じたプラスミドを、大腸菌B L - 2 1 (D E 3) p L y s 株で発現させた。アンピシリンを含有する (100m g / m L) L B 培地において37℃で細胞を増殖させた。次に、幹細胞成長因子様タンパク質の発現を、I P T G (最終濃度1m M) で誘導し、細胞をさらに4時間増殖させて、回集した。S D S - P A G E、およびウェスタンブロッティングによる幹細胞成長因子様産生の分析を上記で詳述するようになった。

30

【0368】

昆虫細胞培養物からの幹細胞成長因子様タンパク質の精製は、下記の通りに実施した。H i s でタグ付けした幹細胞成長因子様を含有する昆虫U l t i m a t e 培地は、適切な量の1M N a O H を添加することでp H 7. 5とした。次に、溶液に1m M P M S F (最終濃度) を補充して、精製プロセス中のタンパク質分解性切断を防止した。0. 2ミクロンフィルター (N a l g e n e 製のS u r f a c t a n t F r e e C e l l u l o s e A c e t a t e 1000m L フィルターユニット) に培地を通して、粒状物質を除去した。得られた溶液を10倍濃縮して、同時に、10k D a の膜カットオフサイズを有するダイアフィルトレーションカートリッジを用いて、20m M リン酸ナトリウム (p H 7. 5) により平衡化した。10倍濃縮し、ダイアフィルター処理した (d i a f i l t e r e d) 培地を、20m M リン酸ナトリウム (p H 7. 5) で平衡化したN i - N T A カラム上に載せた。300m M N a C l および20m M イミダゾールを含有する20m M リン酸ナトリウム (p H 7. 5) によりカラムを洗浄することにより、保持されない成分を除去した。H i s でタグ付けした幹細胞成長因子様タンパク質を同じ緩衝液およびイミダゾールの線形勾配 (20~300m M) を用いて溶出させた。溶出したタンパク質を上述のように同定した。幹細胞成長因子様を含有するプール分画を、10k D a の膜カットオフサイズを有するA m i c o n 製のs t i r c e l l を用いて、P B S 緩衝液により平衡化した。このプロセスはまた、イミダゾールの除去をもたらした。次に、タンパク質を、機能性研究用に、P B S 緩衝液中におよそ10m g / m L にまで濃縮した。

40

【0369】

50

細菌培養物からの幹細胞成長因子様タンパク質の精製は、以下の通りに実施した。封入体として幹細胞成長因子様タンパク質を発現する大腸菌を、10倍容量 (wt/vol) の抽出緩衝液 (50 mM NaPO_4 、pH 7.0) で、さらに抽出緩衝液中に6 M塩酸グアニジンを含む緩衝液で抽出した。可溶化幹細胞成長因子様タンパク質を、上述のようにNi-NTAカラム上で分画した。このアフィニティ精製から得られるフォールディングしていない型の幹細胞成長因子様タンパク質に、D T Tおよびグルタチオンから構成されるリフォールディング緩衝液とともにインキュベーションすることで天然立体構造を得られた。リフォールディングされた試料を、20 mM トリス、0.1 % ツイーンで平衡化し、100 mL にまで濃縮した (10倍濃縮) 後、イオン交換体QセファロースおよびS Pセファロース上での高速液体クロマトグラフィを行った。さらなるプロトコルがまた、6 M塩酸グアニジンの代わりに8 M尿素を用いて、適切なリフォールディング条件に関して開発された。

【0370】

実施例6

初代ヒト細胞における配列番号33の発現

幹細胞成長因子様ポリペプチドをコードするMarathon脾臓ライブラリー増幅からの第二ネステッドPCRの産物を、適切な正および逆PCRプライマーを用いて、適切なクローニング部位でMSCVレトロウイルスベクター (Clontech) にクローニングした (実施例3に記載されるように)。次に、レトロウイルスベクターを、パッケージング細胞系に (FUGENE-6トランスフェクション試薬) を用いてトランスフェクトし、幹細胞成長因子様DNAを含む大量のレトロウイルスを生産した。レトロウイルス含有上清を、パッケージングされた細胞系から調製し、間質細胞と混合し、レトロウイルス形質導入により、幹細胞成長因子様タンパク質を発現する形質導入間質細胞を下記の通りに分析した。

【0371】

A. 液体培養アッセイ：造血幹細胞は、商業的に購入されるか、または製造業者が推奨するプロトコルを用いて精製される。約 1×10^4 個の幹細胞を、幹細胞因子様タンパク質 (配列番号33) を発現する間質細胞、または対照ベクターを発現する間質細胞からの上清とともに、96ウェルプレート中で平板培養した。培養を、毎日顕微鏡で検査して、計数した。図3Aおよび図3Bに見られるように、幹細胞因子様ポリペプチドを発現する間質細胞からの上清は、造血幹細胞の総細胞計数およびコロニー数の有意な増加をもたらした。実験は2度繰り返した。細胞数の平均増加は、2.5倍である (図3A) であると同時に、コロニー計数の増加は、1.54倍であった (図3B)。以下の表は、別個の実験それぞれの結果を要約している。

【0372】

【表3】

タンパク質源	造血幹細胞の成長および形態の変化
実験1	
幹細胞因子様 (配列番号33) 形質導入間質細胞	(+)
対照ベクター形質導入間質細胞	(-)
実験2	
幹細胞因子様 (配列番号33) 形質導入間質細胞	(+)
対照ベクター形質導入間質細胞	(-)

【0373】

B. 間質細胞関連培養アッセイ：適切な組織由来の間質細胞は、商業的供給メーカーから得た。約 1×10^4 個のマウス造血幹細胞を、約 1×10^4 個の形質導入または対照間質

細胞とともに共培養した。ある種の実験では、形質導入間質細胞からの上清を、幹細胞と野生型間質細胞との共培養に添加した。培養を、毎日顕微鏡で検査して、計数した。図4 Aおよび図4 Bに見られるように、幹細胞因子様ポリペプチドを発現する間質細胞は、造血幹細胞の総細胞計数およびコロニー数の増加をもたらした。実験は4度繰り返した。細胞数の平均増加は、3.2倍である(図3 A)であると同時に、コロニー計数の増加は、3.2倍であった(図3 B)。以下の表は、別個の実験それぞれの結果を要約している。

【0374】

【表4】

間質細胞源	造血幹細胞の成長および形態の変化
実験1	
幹細胞因子様(配列番号33) 形質導入間質細胞	(+)
対照ベクター形質導入間質細胞	(-)
実験2	
幹細胞因子様(配列番号33) 形質導入間質細胞	(+)
対照ベクター形質導入間質細胞	(-)
実験3	
幹細胞因子様(配列番号33) 形質導入間質細胞	(+)
対照ベクター形質導入間質細胞	(-)
実験4	
幹細胞因子様(配列番号33) 形質導入間質細胞および野生型 間質細胞	(+)
対照ベクター形質導入間質細胞 および野生型間質細胞	(-)

10

20

30

40

50

【0375】

C. 間質関連培養アッセイ：適切な組織由来の間質細胞は、商業的供給メーカーから得た。約 1×10^4 個の幹細胞を、約 1×10^4 個の形質導入間質細胞とともに共培養した。培養物を、毎日顕微鏡で観察して、フローサイトメリー染色を行い、細胞系列分化を決定した。

【0376】

実施例7

配列番号1～22、24、26～27、29、または33を用いた発現研究

様々な組織における配列番号1～22、24、26～27、33の発現を半定量的ポリメラーゼ連鎖反応ベースの技法を用いて分析した。ヒトcDNAライブラリーを、所定の組織(例えば、成体膀胱、成体脳、成体心臓、成体腎臓、成体リンパ節、成体肝臓、成体肺、成体卵巣、成体胎盤、成体直腸、成体脾臓、成体精巣、骨髄、胸腺、甲状腺、胎児腎臓、胎児肝臓、胎児肝臓-脾臓、胎児皮膚、胎児脳、胎児白血球およびマクロファージを含む)からの発現遺伝子の供給源として使用した。遺伝子特異的プライマーを用いて、配列番号1～22、24、26～27、29、または33配列の一部を試料から増幅した。増幅産物をアガロースゲル上で分離して、ナイロンフィルターに転写して、化学的に連結し

た。次にフィルターを、クレノウポリメラーゼ、ランダムプライム方法を用いて、配列番号1～22、24、26～27、29、または33から生成した放射性標識した(^{33}P -dCTP)二重鎖プローブとハイブリダイズさせる。フィルターを洗浄して(高ストリンジェント)、それを用いて数時間ホスホイメージングスクリーンを感光させる。バンドは、特定ライブラリーにおける配列番号1～22、24、26～27、29、または33配列を含むcDNAの存在を、すなわち相当する細胞型または組織におけるmRNA発現を示す。

【0377】

実施例8

配列番号37マウス遺伝子(#2728)断片の単離

パッケージの折り込み(insert leaflets)に従って、ISOGEN(Nippon Gene Co., Ltd., Japan)20mL中のマウスAGM-S3-A9細胞(1.4×10^8 個の細胞)から全RNAを調製した。mRNA精製キット(Amersham Pharmacia, Inc., U.S.A.)のプロトコルに従って、全RNA(1mg)からメッセンジャーRNAを精製した。SuperScriptプラスミドシステム(GIBCO Lifetech, Inc., U.S.A.)を用いてオリゴdTでプライミングしたメッセンジャーRNAからcDNAを合成して、pSPORT1(GIBCO Lifetech, Inc., U.S.A.)を挿入した。AGM-S3-A9細胞特異的cDNAを、SBH法(Hyseq, Inc., U.S.A.)によりライブラリーから獲得した。得られたクローンのヌクレオチド配列を、ABI377 DNAシーケンサー(Perkin Elmer, Inc., U.S.A.)により決定した。配列を、ホモロジー検索方法により解析し、その結果マウス遺伝子(#2728)を新規遺伝子として同定した。得られたヌクレオチド配列は、配列番号37のヌクレオチド番号1499～2857に相当する。

【0378】

実施例9

配列番号37完全長マウス遺伝子(#2728)の単離

パッケージの折り込みに従って、ISOGEN(Nippon Gene Co., Ltd., Japan)20mL中のAGM-S3-A9細胞(1.4×10^8 個の細胞)から全RNAを調製した。mRNA精製キット(Amersham Pharmacia, Inc., U.S.A.)のプロトコルに従って、全RNA(1mg)からメッセンジャーRNAを精製した。パッケージの折り込みに従って、SMART cDNAライブラリー構築キット(CLONTECH, Inc., U.S.A.)により、調製されたメッセンジャーRNA2mgからcDNAライブラリーを構築した。ライブラリーは、約400,000個の独立クローンを含有しており、15個の画分に分けた。各画分を用いて、以下の条件下PCRを実施して、#2728 cDNAを含有する画分を同定した。

【0379】

下記プライマーは、実施例8で得られたマウス#2728部分的遺伝子断片の配列を基に合成した。鋳型としてAGM-S3-A9 cDNAライブラリーの各画分を用いて、PCRを35サイクルで実施した。各サイクルは、94℃で30秒、55℃で30秒、および72℃で1分から構成されていた。

【0380】

プライマー#2728F: AGCAAATACCCAAATGTTCTGAA (1744～1764) (配列番号41)

プライマー#2728R: AGATGTCACAGCTCTCTGCTGTT (2100～2120) (配列番号42)

【0381】

PCR産物を2%アガロースゲル電気泳動に付し、PCR産物が予測サイズを有する画分を特定した。2つの陽性画分を2つのディッシュにそれぞれ播種して(直径15cm、50,000個のプラークで)、37℃で10時間インキュベートした。1つのディッシュ

10

20

30

40

50

中のプラークをそれぞれ、ナイロンフィルターBiodynne (Pall, Inc., U. S. A.) に転写して、ナイロンフィルター上のDNAをUV架橋により固定化した。³²P-標識DNAプローブを用いてスクリーニングを実施した。

【0382】

鋳型としてマウス#2728部分的遺伝子断片を含有するプラスミドを用いて、プライマーとして#2728RおよびT7を用いて、プローブを下記の通りに調製した。PCRを35サイクルで実施した。各サイクルは、94℃で30秒、55℃で30秒、および72℃で1分から構成されていた。PCR産物を2%アガロースゲル電気泳動に付し、増幅断片をJETSOB (Genomed, GER) により精製した。³²P-標識DNAプローブは、鋳型としてPCR増幅断片25ngを用いて、Megaprime標識キット (Amersham Pharmacia, Inc., U. S. A.) により調製した。

【0383】

プライマーT7: TAATACGACTCACTATAGGG (配列番号43)

【0384】

パッケージされたリーフレットに従って、ExpressHybSolution (CLONTECH, Inc., U. S. A.) を用いたハイブリダイゼーションおよび洗浄を実施した。ハイブリダイズしたナイロンフィルターを1日X線フィルム (Fujifilm Photo Film Co., Ltd., Japan) に感光させた。X線フィルムを、Fujifilm製の自動現像装置を用いて現像した。最高のシグナル強度を有する単一プラークをディッシュから採取して、ディッシュ (直径10cm) 上に再び播種して、約200個のプラークを生成させた。上述した方法によりスクリーニングを再び実施して、単一陽性プラークを単離した。SMART cDNAライブラリー構築キットに関するパッケージの折り込みに従って、得られたファージクローンをを用いて、大腸菌BM25.8を感染させた。感染した単一コロニーを、100μg/mLのアンプシリンを含有するLB培地3mL中に接種して、30℃で一晩インキュベートした。RPMキット (BIO 101, Inc., U. S. A.) を用いて、培養細胞からプラスミド約10mgを精製した。

【0385】

挿入DNA断片の5'末端にある配列を、ABI377DNAシーケンサーにより、Triplex 5' LD-Insert Screening Amplimerプライマー (CLONTECH, Inc., U. S. A.) を用いて決定した。挿入DNA断片のヌクレオチド配列は、配列番号37の位置890にあるヌクレオチドから始まることがわかった。さらに、挿入DNA断片の完全長配列をABI377DNAシーケンサーにより決定し、配列番号37におけるヌクレオチド890~2857を含むことがわかった。

【0386】

Amplimerプライマー: CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT (配列番号44)

【0387】

さらに、プライマー#2728 RACE1 (配列923~952) を、得られた配列を基に合成した。以下の条件: それぞれが94℃で20秒、68℃で30秒および72℃で4分から構成される5サイクル、それぞれが94℃で20秒、60度で30秒および72℃で4分から構成される5サイクル、ならびにそれぞれが94℃で20秒、55℃で30秒および72℃で4分から構成される20サイクル下で、プライマーとして#2728R RACE1およびM13Reverseを、また鋳型としてpSPORT1AGM-S3A9 cDNAライブラリーを用いることで、LA Taq (Takara Shuzo Co., Ltd., Japan) を用いてPCRを実施した。増幅断片を、pGEM-T Easyベクター (Promega, Inc., U. S. A.) と連結し、大腸菌DH5aに形質転換した。形質転換した細胞を、100μg/mLのアンプシリンを含有するLB寒天培地上で平板培養した。単離コロニーを、PCR用反応混合物に添加して (そ

れぞれ10 μ L)、94℃で5分間インキュベートした。最終濃度0.2 mMにて、プライマーT7（配列番号43）およびSP6（配列番号47）を用いて、それぞれが94℃で30秒、55℃で30秒、および72℃で1分から構成される35サイクルでPCRを実施した。PCR産物を2%アガロースゲル電気泳動に付して、増幅断片を確認した。PCR増幅断片が得られた大腸菌を、100 μ g/mlのアンプシリンを含有するLB培地3 mLに接種して、37℃で一晩培養した。RPMキット（BIO 101, Inc., U. S. A.）を用いて、培養細胞からプラスミドを精製し、プラスミド約10 mgが得られた、クローンのヌクレオチド配列を、ABI 377 DNAシーケンサーにより決定した。得られたヌクレオチド配列は、配列番号37のヌクレオチド1～952であることがわかった。

10

【0388】

RACE1プライマー：A A C T G G A A C C G G T C T G T T A A A A A G T G A C A A（配列番号45）

M13プライマー：C A G G A A A C A G C T A T G A C（配列番号46）

SP6プライマー：G A T T T T A G G T G A C A C T A T A G（配列番号47）

【0389】

実施例10

ヒト遺伝子#2728（配列番号39）のクローニング

配列番号37のヌクレオチド配列に基づいて、Genbankの遺伝子データベースをBLASTプログラムを用いて検索し、ヒトEST配列AI935880、AI052185、AI937502、およびAI858126が、マウス#2728配列と相同性を示すことがわかった。続いて、下記プライマーを、これらのヒトESTの配列に基づいて合成した。

20

【0390】

H2728Fプライマー：C A T T C C T C C G G C T G C G A G A A A G G A（配列番号48）

H2728Rプライマー：A T T T C T T T G C A A C C C T G C A C C T A A（配列番号49）

【0391】

ヒト遺伝子を単離する試みとしては、SuperScriptシステム（GIBCO-BRL, Inc., U. S. A.）を用いて、胎盤mRNA 3 mgからオリゴdTでプライミングによりcDNA（CLONETECH, Inc. U. S. A.）を合成した。鋳型としてこのcDNA、プライマーとしてH2728FおよびH2728R、ならびにPlatinum Pfx DNAポリメラーゼ（GIBCO Lifetech, Inc., U. S. A.）を用いてPCRを実施した。増幅断片を単離して、pCR-BLuntベクター（Invitrogen, Inc., U. S. A.）に連結して、大腸菌株DH5aに形質転換した。形質転換細胞を、100 μ g/mlのアンプシリンを含有するLB培地上で平板培養して、単一コロニーを単離した。単離コロニーを反応混合物に添加して（それぞれ10 μ L）、94℃で5分間インキュベートした。最終濃度0.2 mMにて、T7およびSP6プライマーを用いて、それぞれが94℃で30秒、55℃で30秒、および72℃で2分から構成される35サイクルでPCRを実施した。PCR産物を2%アガロースゲル電気泳動に付して、増幅断片を確認した。PCR増幅断片が得られた大腸菌を、100 μ g/mlのアンプシリンを含有するLB培地3 mLに接種して、37℃で一晩インキュベートした。RPMキット（BIO 101, Inc., U. S. A.）を用いて、培養細胞からプラスミドを精製し、プラスミド約10 mgが得られた、プラスミド挿入物のヌクレオチド配列を、ABI 377 DNAシーケンサーにより決定し、それがマウス#2728配列のヒトオルソログであることが確認された。得られたヌクレオチド配列は、配列番号39に記載される。

30

40

【0392】

実施例11

50

間質細胞におけるヒトおよびマウス#2728遺伝子の発現

A. マウス#2728遺伝子の発現用のレトロウイルスベクターの調製

マウス#2728配列からのオープンリーディングフレーム配列（配列番号37におけるヌクレオチド塩基番号873～2465）を、以下の手順により間質細胞における発現用のレトロウイルスベクターにクローニングした。

【0393】

mRNA精製キット（Amersham Pharmacia, Inc., U.S.A.）を用いて、AGM-S3-A9細胞由来の全RNA 1mgから、メッセンジャーRNAを精製した。常法により、メッセンジャーRNAからcDNAを合成した。m2780 or fRおよびm2728 or fRプライマー、鋳型として上記cDNA、ならびにPlatinum Pfx DNAポリメラーゼ（GIBCO Lifetech, Inc., U.S.A.）を用いて、それぞれが94℃で20秒、55℃で30秒、および68℃で2分で構成される30サイクルでPCRを実施した。

【0394】

m2780 or fF: CCGCTCGAGCCACCATGGCAAGGTTCCGGA
GGGCCGAC（配列番号50）

m2728 or fR: CGGAATTCTTATTGGTTCACCTCTGTCTG（配
列番号51）

【0395】

増幅断片を制限酵素MfeI（NEW ENGLAND Bio Labs INC., U.S.A.）およびXhoIで消化して、電気泳動に付した。次に、DNA断片をJET
SORB（Genomed, Inc., Germany）により精製し、あらかじめE
coRIおよびXhoIで消化したpMX-IRES-GFPベクター（T. Kita
mura博士, Institute of Medical Science, Univ
ersity of Tokyoから提供）に連結し、pMX-IRES-GFPベクター
は、pMXレトロウイルスベクターにIRES GFP（内部リボソーム侵入部位グリー
ン蛍光タンパク質）を挿入することで調製した。組換えベクターを、大腸菌株DH5aに
形質転換して、細胞を、100μg/mlのアンプシリンを含有するLB寒天培地上で平
板培養した。単離コロニーを採取して、100μg/mlのアンプシリンを含有するLB
培地100mLに接種し、QIAGEN tip100（QIAGEN, Inc., U.S.A.）を用いて培養細胞からプラスミドを精製した。挿入遺伝子の配列を常法により
決定し、挿入配列が配列番号37の一部を含有することが確認された。

【0396】

B. ヒト#2728遺伝子の発現用のレトロウイルスベクターの調製

マウス#2728遺伝子に対するヒトオルソログからのオープンリーディングフレーム配
列（配列番号39におけるヌクレオチド596～2185）を、間質細胞における発現用
のレトロウイルスベクターに挿入した。

【0397】

まず、オリゴdTでプライミングしたSuperScript IIシステム（GIBCO
-BRL, Inc., U.S.A.）を用いて、胎盤mRNA 3μgからcDNAを合
成した。h2728 or fFおよびh2728 or fRプライマー、鋳型として上記で調
製したcDNA、ならびにPlatinum Pfx DNAポリメラーゼ（GIBCO
Lifetech, Inc., U.S.A.）を用いて、それぞれが94℃で20秒
、55℃で30秒、および68℃で2分で構成される30サイクルでPCRを実施した。

【0398】

h2728 or fF: ccgctc g a g c c a c c A T G G C G A G G T T C C C G A
A G G C C G A C（配列番号53）

h2728 or fR: c c g g a a t t c T T A G C A C T G C T C T G A T A C A A T
A A A（配列番号54）

【0399】

増幅断片を制限酵素EcoRIおよびXhoIで消化して、電気泳動に付した。次に、増幅DNA断片をJETSORB (Genomed, Inc., Germany)により精製し、あらかじめEcoRIおよびXhoIで消化したpMX-IRES-GFPベクターに連結した。組換えベクターを、大腸菌株DH5aに形質転換して、細胞を、100 μ g/mlのアンプシリンを含有するLB寒天培地上で平板培養した。単離コロニーを採取して、100 μ g/mlのアンプシリンを含有するLB培地100 mLに接種し、QIAGEN tip 100 (QIAGEN, Inc., U.S.A.)を用いてプラスミドを精製した。挿入遺伝子の配列を常法により決定し、挿入配列が配列番号39の一部を含有することが確認された。

【0400】

10

C. マウス#2728遺伝子の間質細胞への移入

BOSC23細胞(2×10^6 個)を、コラーゲンI型コート60mmディッシュ(Ashihitechnoglass Co., Ltd.)上に播種し、10%FCSを含有するDMEM培地中で、37℃で、CO₂5%および湿度100%下でインキュベートし、インキュベーションの12~18時間後、DMEM培地を、OPTI MEM培地(GIBCO BRL, Inc.)2 mLで取り替えた。

【0401】

マウス#2728配列をコードするプラスミド(上述のように調製した)約3 μ gを、OPTI MEM培地100 μ Lに希釈したLIPOFECTAMINE試薬(GIBCO BRL, Inc.)18 μ Lに添加し、室温で30分間インキュベートした。このDNA溶液を、BOSC23細胞培地に添加して、約5時間後、20%FCSを含有するDMEM培地(GIBCO BRL, Inc.)2 mLを培地に添加した。リボソームは(内部リボソーム侵入部位)IRESにおいてmRNAの中央に結合することができるため、2つの遺伝子は、1つの転写ユニット中でIRESの5'および3'末端に連結させることで、1つのmRNAから発現させることができる。上記で調製したプラスミドにおいて、#2728遺伝子に関するcDNAを、IRESの5'側に挿入し、グリーン蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を3'側に挿入した。この系では、#2728遺伝子の発現は、蛍光標示式セルソーター(FACS)を用いてGFPの発現を検出することでモニタリングすることができる。

20

【0402】

30

約24時間後、培地を、10%FACSを含有するDMEM4 mLで取り替え、約48時間、インキュベーションを続けた後、培地を単離した。培地を、0.45 μ mフィルターに通してろ過した後に、1200 $\times$ gで16時間遠心分離し、上清を廃棄して、ウイルスペレットを得た。

【0403】

AGM-s3-A9細胞またはAGM-S3-A7細胞(それぞれ 1×10^4 個の細胞)を、24ウェルプレート(FALCON, Inc.)上に播種して、10%FCSを含有するMEM α 培地(GIBCO BRL, Inc.)1 mL中でインキュベートした。播種して12~18時間後、10%FCSを含有するMEM α 培地中にウイルスペレットを懸濁させて、間質細胞用の培地を、ウイルス懸濁培地1 mLで取り替えた。POLYBRENE(Sigma, Inc., SEQUA-BRENE)を、最終濃度10 μ g/mLにまで、ウイルス懸濁培地に添加し、700 $\times$ gで45分間培養プレートを遠心した後、混合物を37℃で、CO₂5%および湿度100%下でインキュベートした。48時間後、培地を、10%FCSを含有するMEM α 1 mLで取り替えて、24時間、インキュベーションを続けた。次に、培養細胞を6ウェルプレート(FALCON, Inc.)にサブシード(subseed)して、10%FCSを含有するMEM α 培地3 mL中でインキュベートした。サブシードの48時間後、間質細胞におけるGFP発現を、FACS(Vantage, Becton Dickinson, Inc.)を用いて確認し、80%以上の細胞が#2828遺伝子を発現することがわかった。

40

【0404】

50

実施例 1 2

ヒト臍帯血からの CD 3 4 陽性幹細胞の単離

ヒト臍帯血は、凝固を防止するためにヘパリン添加したシリンジを用いて、Standard of Official Conduct Committee at Pharmaceutical Research Laboratories, Kirin Brewery Co., Ltd. に従って得られた。ヘパリン処理した臍帯血を、Lymphoprep (NYCOMED PHARMA, Inc.) に入れ、室温で 30 分間、400 × g で遠心分離し、単核細胞を得た。単核細胞分画中の赤血球を、室温で 2 分間、塩化アンモニウム緩衝溶液 (0.83% NH₄Cl-トリス-HCl 20 mM、pH 6.8) で処理することにより溶血させた。PBS-FCS で細胞を洗浄した後、単核細胞懸濁液にヒト IgG (10 mg) を添加して、混合物を氷冷条件下で 10 分間維持した。細胞を PBS-FCS で洗浄し、CD 2、CD 11 c (得られた ATCC ハイブリドーマから精製)、CD 19 (Pharmingen, Inc.)、CD 15、CD 41 (Leinco Technologies, Inc.)、およびグリコホリン A (Cosmo Bio, Co., Ltd.) のようなヒト分化血球に特異的な抗原に対するビオチン化抗体を、単核細胞懸濁液に添加し、混合物を氷上で 20 分間保持した。PBS-FAS で洗浄した後、5% FCS、10 mM EDTA、および 0.05% NaN₃ を含有する PBS (PBS-ECS-EDTA-NaN₃) 1 mL 中に細胞を再懸濁させた。ストレプトアビジン結合磁気ビーズ (BioMag, PerSeptive Diagnostics, Inc.) を細胞懸濁液に添加して、混合物を氷上で 40 分間維持した。分化関連抗原を発現する分化血球を、磁気分離機 (Dyna1 MPC-1, Dynal, Inc.) を用いて除去して、FITC 標識抗 CD 3 4 抗体 (Immunotech S. A., Marseilles, France) を、残った分化血球抗原陰性細胞分画に添加した。混合物を氷上で 20 分間インキュベートし、CD 3 4 陽性分画を、セルソーターにより単離し、造血幹細胞集団を提供した。

【0405】

実施例 1 3

ヒト造血幹細胞および # 2 7 2 8 ヒト遺伝子を発現する間質細胞の共培養

AGM-S3-A9 細胞、AGM-s3-A7 細胞、または # 2 7 2 9 遺伝子を発現する AGM-S3-A9 細胞もしくは AGM-s3-A7 細胞 (それぞれ 1×10^5 個の細胞) を、24 ウェル培養ディッシュ上に接種し、10% FCS を含有する MEM α 培地中で 1 日インキュベートし、集密にまで成長させ、上述の CD 3 4 陽性造血幹細胞を、10% FCS を含有する MEM α 培地 1 mL 中で上述の間質細胞 (500 個の細胞/ウェル) とともにインキュベートした。1 週間後、同じ培地をさらに 1 mL 共培養に添加した。2 週間後、間質細胞およびヒト血球を収集して、以下に記載するように、間質細胞の、造血幹細胞の生存度を支持する能力に関して評価した。

【0406】

実施例 1 4

コロニーアッセイによる造血幹細胞および/または造血前駆細胞の成長の評価 共培養細胞を、メチルセルロース培養系でアッセイし、三重反復試験で評価した。メチルセルロース培養系は、10 ng/mL のヒト SCF、ヒト IL-3、ヒト IL-6、ヒト G-CSF およびヒト TPO、ならびに 2 IU/mL の EPO を、MethoCult 4230 (Stem Cell Technologies Inc.) に添加することで調製され、6 ウェル培養ディッシュ (Falcon, Inc.) で培養を実施した。使用した様々な造血因子は、組換え技法を用いて調製して、純度を保証した。インキュベーションの 2 週後に、形成したコロニーを、顕微鏡下で観察し、CFU-GM (顆粒球マクロファージコロニー形成ユニット)、BFU-E (赤血球バースト形成ユニット)、および CFU-E ミックス (赤血球混合コロニー形成ユニット) の数を計数した。マウス # 2 7 2 8 遺伝子を発現する AGM-s3-A9 と共培養した CD 3 4 陽性造血細胞のコロニー形成能力を図 5 に示す。ヒト # 2 7 2 8 遺伝子を発現する AGM-s3-A7 と共培養した CD 3

4 陽性造血幹細胞のコロニー形成能力を図6に示す(#2728-2(007-2))。マウス#2728遺伝子を発現するAGM-s3-A9細胞、またはヒト#2728遺伝子を発現するAGM-s3-A7細胞との共培養におけるヒト造血幹細胞、BFU-EおよびCFU-Cの数の増加は、#2728遺伝子が、直接的あるいは間接的に、造血幹細胞の成長および生存を支持する能力を有することを示した。

【0407】

実施例15

マウス造血幹細胞アッセイ

大腿骨髄を得て、PBS中に懸濁させた。マウス骨髄単球を、比重遠心分離方法を用いて濃縮し、染色用緩衝液(5%FCSおよび0.05%NaN₃を含有するPBS)中に再懸濁させた。幹細胞分画は、Osawa, M. et al., Science 273: 242-245, 1996の方法に従って、単球懸濁液から得られた。

【0408】

FITC結合CD34抗体、フィコエリトリン結合Sca-1抗体、およびアロフィコシアニンc-キット(すべてPharmingen, Inc. 製)、ならびに分化関連抗原CD45R、CD4、CD8、Gr-1、Ter119およびCD11cに特異的な6個のビオチン化抗体(すべてPharmingen, Inc. 製)を、骨髄単球懸濁液に添加して、混合物を氷上で20分間維持した。次に、細胞を染色用緩衝液で2度洗浄し、CD34陰性、Sca-1陽性、c-キット陽性およびLin陰性細胞を、FACS(Vantage, Becton Dickinson, Inc.)を用いて単離した。

【0409】

30個の造血幹細胞(CD34陰性、Sca-1陽性、c-キット陽性およびLin陰性細胞)を、マウス#2728遺伝子を発現するAGM-s3-A9と7日間共培養した。培養の7日後に収集した細胞をすべて、X線(8.5Gy)を照射した5匹のC57BL/6-Ly5.2マウス(Charles River, Inc., 8週齢、雄)に、 2×10^5 個の総骨髄細胞(C57BL/6-Ly5.2マウス、Charles River, Inc.)とともに、尾静脈への注射により移植した。

【0410】

移植後、末梢血を収集して分析した。蒸留水(350μL)を末梢血50μLに添加して、混合物を30秒間インキュベートして、溶血させた。PBS(2倍濃度)を添加した後、溶血させた溶液を遠心分離して、白血球を得た。抗CD16抗体、FITC結合抗CD45.1抗体、フィコエリトリン結合Gr-1およびCD11c抗体、ならびにアロフィコシアニン結合CD90(Thy1)およびCD45R(B220)抗体(すべて抗体はPharmingen, Inc. から購入)を、あらかじめ染色用緩衝液(5%FCSおよび0.05%NaN₃を含有するPBS)で一度洗浄した白血球とともにインキュベートし、混合物を氷上で30分間インキュベートした。インキュベートした細胞を再び染色用緩衝液中で洗浄して、FACSを用いて分析した。

【0411】

結果を図7Aおよび図7Bに示す。#2728マウス遺伝子を発現するAGM-s3-A9細胞と共培養した造血幹細胞を移植した動物は、トランスフェクトしていないAGM-s3-A9細胞または対照ベクターのみを発現する細胞と共培養した造血幹細胞を移植した動物と比較して高い割合でキメラ化を示した。高い割合のキメラ化は、移植の2ヵ月後、骨髄性細胞系列およびリンパ系細胞系統の両方において依然として確認された。結果は、#2728遺伝子を発現する間質細胞とともに培養した造血幹細胞および/または造血前駆細胞は、#2728遺伝子産物と接触されない細胞と比較して、より激しく増殖したことを示す。これらの結果は、#2728遺伝子産物が、直接的あるいは間接的に、造血幹細胞および/または造血前駆細胞の生存および成長を高める能力を有することを示した。

【0412】

実施例16

モノクローナル抗体の産生

当該技術分野で既知の様々な方法が、本発明のポリペプチドおよび／またはその断片、誘導体、類似体、もしくは相同体に対するモノクローナル抗体の産生に使用され得る。培養における連続細胞系により抗体分子の産生を提供する任意の技法を使用してもよい。これらとしては、トリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法 [Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4:72を参照]、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技法 [Cole, et al., 1985 In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96を参照] が挙げられるが、これらに限定されない。不死化抗体産生細胞系は、発癌遺伝子DNAによるBリンパ球の直接形質転換、あるいはエプスタインバーウイルスによるトランスフェクション (例えば、M. Schreier et al., 「Hybridoma Techniques」 (1980)、Hammerling et al., 「Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas」 (1981)、Kennett et al., 「Monoclonal Antibodies」 (1980)、また米国特許第4,341,761号、同第4,399,121号、同第4,427,783号、同第4,444,887号、同第4,451,570号、同第4,466,917号、同第4,472,500号、同第4,491,632号、および同第4,493,890号) のような、融合以外の技法により創出することができる。

【0413】

抗体の産生では、所望の抗体に関するスクリーニングが、当該技術分野で既知の技法、例えばラジオイムノアッセイ、ELISA (酵素免疫アッセイ)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射線アッセイ、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、in situ イムノアッセイ (例えば、コロイド金、酵素または放射性同位体標識を用いて)、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ (例えば、ゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ)、補体固定アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動アッセイ等により達成することができる。イムノアッセイにおける結合の検出に関する多くの手段が当該技術分野で既知であり、本発明の範囲内である。例えば、本発明のポリペプチドの特異的エピトープを認識する抗体を選定するために、ハイブリドーマを用いてもたらされるアッセイを実行して、かかるエピトープを含有するポリペプチド断片に結合する産物の同定を実施することができる。特定の動物種からのポリペプチドに特異的な抗体の選定に関して、選定は、当該動物種の細胞により発現されるか、あるいはその細胞から単離されるポリペプチドとの陽性結合の検出に基づく。抗体による結合の特異性は、本発明の範囲を超える密接に関連した幹細胞因子と併用して、本発明のポリペプチドを使用することにより決定される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

配列番号22の、配列番号1～21との概要的アラインメントを示す図である。

【図2】

幹細胞成長因子様ポリペプチド配列番号28と腫瘍内皮マーカー7前駆タンパク質配列番号36 (St. Croix et al., Science, 289, 1197-1201) との間のBLASTXアミノ酸アラインメントを示す図であり、2つの配列が、441個のアミノ酸残基にわたって72%類似性、および同じ441個のアミノ酸残基にわたって57%同一性を共有することを示している。ここで、A=アラニン、C=システイン、D=アスパラギン酸、E=グルタミン酸、F=フェニルアラニン、G=グリシン、H=ヒスチジン、I=イソロイシン、K=リシン、L=ロイシン、M=メチオニン、N=アスパラギン、P=プロリン、Q=グルタミン、R=アルギニン、S=セリン、T=スレオニン、V=バリン、W=トリプトファン、Y=チロシン。ギャップは、ダッシュとして表されている。

【図3】

図 3 A および図 3 B

幹細胞因子様ポリペプチドを発現する間質細胞由来の上清により引き起こされる造血幹細胞の総細胞数およびコロニー数の増加を示す図である。

【図 4】

図 4 A および図 4 B

幹細胞因子様ポリペプチドを発現する間質細胞より引き起こされる造血幹細胞の総細胞数およびコロニー数の増加を示す図である。

【図 5】

マウス # 2 7 2 8 遺伝子を発現する A G M - s 3 - A 9 細胞とともに 2 週間共培養した C D 3 4 陽性造血幹細胞のコロニー形成能を示す図である。

10

【図 6】

ヒト # 2 7 2 8 遺伝子を発現する A G M - s 3 - A 7 細胞とともに 2 週間共培養した C D 3 4 陽性造血幹細胞のコロニー形成能を示す図である。

【図 7】

図 7 A および図 7 B

2 7 2 8 遺伝子を発現する A G M - s 3 - A 9 細胞とともに共培養した造血幹細胞を移植した動物は、# 2 7 2 8 遺伝子をもたない A G M - s 3 - A 9 細胞または対照ベクターのみを発現する細胞とともに共培養した造血幹細胞を移植した動物と比較して、より高い割合でキメラ現象を示したことを示す図である。

【図 8】

20

図 8 A および図 8 B

ベクター形質導入間質細胞および S C F - 2 形質導入間質細胞 (2) と造血幹細胞の共培養を示す図である。

【図 9】

図 9 A および図 9 B

ベクター形質導入間質細胞または S C F - 2 形質導入間質細胞から供給される培養物を補充した造血幹細胞を示す図である。

【図 2】

$$\begin{array}{c}
 5 \\
 \downarrow \\
 352 \quad 2 \quad \text{HT-SEGO ID NO 18 sign no. 1 (length 352), 395, between 332 and 2} \\
 \downarrow \\
 417 \quad 6 \quad \text{HT-SEGO ID NO 18 sign no. 1 (length 417), 1005, between 417 and 3} \\
 \downarrow \\
 3 \quad 337 \quad \text{HT-SEGO ID NO 18 sign no. 1 (length 415), 985, between 3 and 337} \\
 \downarrow \\
 21 \quad 464 \quad \text{HT-SEGO ID NO 13 sign no. 1 (length 464), 935, between 21 and 464} \\
 \downarrow \\
 463 \quad \text{HT-SEGO ID NO 14 sign no. 1 (length 462), 935, between 463 and 10} \\
 \downarrow \\
 18 \quad 429 \quad \text{HT-SEGO ID NO 12 sign no. 1 (length 420), 535, between 18 and 429} \\
 \downarrow \\
 1 \quad 397 \quad \text{HT-SEGO ID NO 16 sign no. 1 (length 400), 385, between 1 and 397} \\
 \downarrow \\
 10 \quad 411 \quad \text{HT-SEGO ID NO 17 sign no. 1 (length 413), 905, between 1 and 411} \\
 \downarrow \\
 15 \quad 34 \quad \text{HT-SEGO ID NO 18 sign no. 1 (length 409), 395, between 15 and 34} \\
 \downarrow \\
 336 \quad 234 \quad \text{HT-SEGO ID NO 2 sign no. 1 (length 234), 935, between 9 and 234} \\
 \downarrow \\
 7 \quad 141 \quad \text{HT-SEGO ID NO 19 sign no. 1 (length 142), 365, between 331 and 3} \\
 \downarrow \\
 403 \quad 7 \quad \text{HT-SEGO ID NO 21 sign no. 1 (length 404), 1005, between 403 and 7} \\
 \downarrow \\
 53 \quad 264 \quad \text{HT-SEGO ID NO 3 sign no. 1 (length 452), 385, between 1 and 264} \\
 \downarrow \\
 57 \quad 457 \quad \text{HT-SEGO ID NO 8 sign no. 1 (length 457), 985, between 1 and 457} \\
 \downarrow \\
 37 \quad 464 \quad \text{HT-SEGO ID NO 8 sign no. 1 (length 467), 985, between 1 and 464} \\
 \downarrow \\
 5 \quad 497 \quad \text{HT-SEGO ID NO 7 sign no. 1 (length 499), 1005, between 4 and 497} \\
 \downarrow \\
 8 \quad 404 \quad \text{HT-SEGO ID NO 8 sign no. 1 (length 404), 985, between 8 and 404} \\
 \downarrow \\
 407 \quad \text{HT-SEGO ID NO 3 sign no. 1 (length 407), 985, between 407 and 3}
 \end{array}$$

```
BLASTN 2.0a10MP-WashU [05-Feb-1998] Build sol2.5-ultra 01:47:25 05-Feb-1998)

Reference:  Clish, Warren (1998-1999).  Unpublished.
Aitchison, Stephen P., Warren (1998), Webb Miller, Eugene N. Myers, and David J.
Lipsman (1999).  Basic Local alignment search tool.  J. Mol. Biol. 215:403-10.

Notice:  this program and its default parameter settings are optimized to find
nearly identical sequences rapidly.  To identify weak similarities encoded in
nucleic acid, use BLASTX, TBLASTN or TBLASTX.

Query=  temporary sequence
(2668 letters)

Database=  temp/seqfile.64767.6560546875
1 sequences; 3095 total letters.

Searching done

                                     Smallest
                                     Sun
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:

                                     High Probability
                                     Score P(N)  N
temporary sequence                  13220  0.0   1
```

```

Temporary sequence
Length = 3095

Minus strand H5Ws:

Score = 13220 (1983.5 bits), Expect = 0.0, p = 0.0
Identities = 2644/2644 (100%). Positives = 2644/2644 (100%). Strand = Minus / Plus

Query: 2644 TATGAGACAGAACTATCATATATATGATGAGTCTGTCGACGACGGGA 2585
      452 TATGAGACAGAACTATCATATATATGATGAGTCTGTCGACGACGGGA 513
Sbjct: 452 TATGAGACAGAACTATCATATATATGATGAGTCTGTCGACGACGGGA 513

Query: 2644 TTTATGCTGATCATGAGCAAGTGGAAAAAGTAAATGAGATCATGAGATATCT 2585
      512 TTTATGCTGATCATGAGCAAGTGGAAAAAGTAAATGAGATCATGAGATATCT 573
Sbjct: 512 TTTATGCTGATCATGAGCAAGTGGAAAAAGTAAATGAGATCATGAGATATCT 573

Query: 2644 CATATCTCATGTCGAGCTGCAGAGTAACTCTCTGCTCAATTTTCAATTTATGGGCA 2465
      572 CATATCTCATGTCGAGCTGCAGAGTAACTCTCTGCTCAATTTTCAATTTATGGGCA 633
Sbjct: 572 CATATCTCATGTCGAGCTGCAGAGTAACTCTCTGCTCAATTTTCAATTTATGGGCA 633

Query: 2644 CTTCACTGAGATCATCTGTCGAGCGGGGTTTATCATCACTGAGAGAACTGTACA 2405
      632 CTTCACTGAGATCATCTGTCGAGCGGGGTTTATCATCACTGAGAGAACTGTACA 693
Sbjct: 632 CTTCACTGAGATCATCTGTCGAGCGGGGTTTATCATCACTGAGAGAACTGTACA 693

Query: 2644 TGGATGCTTACGACGACAGCATATATGACATTTTATGCTGAAATTTGATCCCATCT 2345
      692 TGGATGCTTACGACGACAGCATATATGACATTTTATGCTGAAATTTGATCCCATCT 753
Sbjct: 692 TGGATGCTTACGACGACAGCATATATGACATTTTATGCTGAAATTTGATCCCATCT 753

Query: 2644 ATCGGAAATTCAGTGTAGATATTTTGAATATGGCAGACATCTGTGTCAGATGGGA 2285
      752 ATCGGAAATTCAGTGTAGATATTTTGAATATGGCAGACATCTGTGTCAGATGGGA 813
Sbjct: 752 ATCGGAAATTCAGTGTAGATATTTTGAATATGGCAGACATCTGTGTCAGATGGGA 813

Query: 2284 CATGATCATCTTCAAGATATATATACCTGGAGAGCTCTCATCATCGAGCAAGCTCT 2225
      812 CATGATCATCTTCAAGATATATATACCTGGAGAGCTCTCATCATCGAGCAAGCTCT 873
Sbjct: 812 CATGATCATCTTCAAGATATATATACCTGGAGAGCTCTCATCATCGAGCAAGCTCT 873

Query: 2224 ATGAGTGGAGGATATCATCTTGGATCAAAAGAAATTTCTTCTCTTGCACAGATAG 2165
      872 ATGAGTGGAGGATATCATCTTGGATCAAAAGAAATTTCTTCTCTTGCACAGATAG 933
Sbjct: 872 ATGAGTGGAGGATATCATCTTGGATCAAAAGAAATTTCTTCTCTTGCACAGATAG 933

```

配列番号28幹細胞成長因子様(SCGF-likeとして表記)タンパク質と、肺癌内皮マーカータンパク質配列番号36とのBLASTPアナライズ

Subject:	932	TTGACGACATGATCCAGTGGAAAGTGCGATCTCGACAGCATCTGGCTGTGGAT	991
Query:	2104	CGAGCAATCTCCGATGTTCTGGAGAGACAACTTATGAAATACACAGGCTAAGACATCA	2648
Subject:	992	CGAGCAATCTCCGATGTTCTGGAGAGACAACTTATGAAATACACAGGCTAAGACATCA	2648
Subject:	2044	AATGTCACTGAGATACCAAGATCTGCGCTGGAGATGCTGCCCTATGCGCATGCTCTCA	1986
Subject:	1952	AATGTCAAAATTCACGAGATCTGCGCTGGAGATGCTGCCCTATGCGCATGCTCTCA	1123
Subject:	1984	GTTTACAGATCTGGCGCGCTGTATATCTTCAGATGGCTTACGCTGATGCTGTGTAG	
Query:	1132	TTTTAAGAGATGGCGCGCTGTATATCTTCAGATGGCTTACGCTGATGCTGTGTAG	1177
Subject:	1924	TAAATCTTCAGAGATCTTCAGTGGATTTGATCTCTATCGCGAGCATGCTGGACAGTG	186
Subject:	1172	TAAATCTTCAGAGATCTTCAGTGGATTTGATCTCTATCGCGAGCATGCTGGACAGTG	186
Query:	1864	ATGCTCTGAGATCTCAAAAGAGAGATGTGTGAGATACAGACCAATGGAATCTCTC	123
Subject:	1232	ATGCTCTGAGATCTCAAAAGAGAGATGTGTGAGATACAGACCAATGGAATCTCTC	329
Query:	1804	TGGACACCGACACCACTATGAGGACGACCAACCCAGTCAAGGCTCTAACTACACAG	174
Subject:	1292	TGGACACCGACACCACTATGAGGAGGACGACCAACCCAGTCTTAATCTACACAG	129
Subject:	1744	AMGAGCGATGACTCTCAAGTTCTACGACAGCGCTCCCTACAGAAAGATATACAGAGTAC	168
Subject:	1392	AMGAGCGATGACTCTCAAGTTCTACGACAGCGCTCCCTACAGAAAGATATACAGAGTAC	142
Query:	1484	ACTAGATCTAAAGATTAATGGCTCTCTACAGATACAGATGCTCACTGAGAGAAAGGGG	1618
Subject:	1618	ACTAGATCTAAAGATTAATGGCTCTCTACAGATACAGATGCTCACTGAGAGAAAGGGG	1618
Query:	1624	AMCCTCTCAAGCTGGCGCTGATGTTGGAATCTCTCATCTGGTCTCATATTGACGACG	156
Subject:	1472	AMCCTCTCAAGCTGGCGCTGATGTTGGAATCTCTCATCTGGTCTCATATTGACGACG	156
Query:	1564	ATTATCTGACAGCTCTATTATATATACACCGCCAGATCAGACAGAGATCTTTAT	
Subject:	1532	GATCTCTGTGACGCTCTATTATATATACACCGCCAGATCAGACAGAGATCTTTAT	
Query:	1504	TAGAGACCGCCGACAGAGATGCGCTGGATGAGTTTAAAGAAAGGCTCTGGACATCTCTC	14
Subject:	1592	TAGAGACCGCCGACAGAGATGCGCTGGATGAGTTTAAAGAAAGGCTCTGGACATCTCTC	1592
Query:	1444	CTATCTGTGACAGTACAGCATGCTGGAGAGAAAGGCTTTATATATACAGACGCTCTA	
Subject:	1652	CTATCTGTGATTTGACAGCTGCTGGAGAGAAAGGCTTTATATATACAGACGCTCTA	17
Query:	1384	AAATTTCTAGACACAGACCAACCACTCATCTGGTTTACAGATCTTAAACATAAATTTTC	13
Subject:	1312	AAATTTCTAGACACAGACCAACCACTCATCTGGTTTACAGATCTTAAACATAAATTTTC	13
Subject:	1724	CTATACAGCTTTAAGACAAACACCAACCAACCAACCAAGCTCTAGGCTCTGTAGCG	12
Subject:	1772	CTATACCTTTAAGACAAACCAACCAACCAACCAACCAAGCTCTAGGCTCTGTAGCG	
Subject:	1864	TGAGAGACAGATGTTCTGGCGATCTCGGCGCGAGCAACCAAGGTTAAACAAAACT	12
Subject:	1212	TGAGAGATACAGTTCTTGACAGATCTCGGCGCGAGCAACCAAGGTTAAACAAAACT	12
Query:	1204	AAATCTATACAGATACGATTTCACTGACATACATCTCCGATGGAGTGTGATCTATCTA	13

C

```

Query: 2144 TAGTTCACTTCGGAAATCTCCCTGGACTTATCTGAATGACAGAGATTATAAGCTTT 1085
Sbjct: 1952 TAGTTCACTTCGGAAATCTCCCTGGACTTATCTGAAGATGACAGAGATTATAAGCTTT 2011

Query: 1084 TGGCTTAGGTGACGGTTTCAAGGGATGACAAAAAATCTAATAAGCTTTAGT 1025
Sbjct: 2012 TGGCTTAGGTGACGGTTTCAAGGGATGACAAAAAATCTAATAAGCTTTAGT 2071

Query: 1024 CATGAGGAGATGACAGCTTTGTTTCAAAATGTTCTCTGAATGTTCTCAAGAGTACTTTTTC 905
Sbjct: 2072 CATGAGGAGATGACAGCTTTGTTTCAAAATGTTCTCTGAATGTTCTCAAGAGTACTTTTTC 2131

Query: 954 CAAGAGCTGAAAGCTTTGACTCAAAAGAGCATGATGAATGTTCTCAAGATGCTTAAGAA 905
Sbjct: 2132 CAAGAGCTGAAAGCTTTGACTCAAAAGAGCATGATGAATGTTCTCAAGATGCTTAAGAA 2191

Query: 904 AACAGCCATGCAAGAGTGAAGACAAACACAAAAATAGAGATTTCTACATTTCAAAAC 845
Sbjct: 2192 AACAGCCATGCAAGAGTGAAGACAAACACAAAAATAGAGATTTCTACATTTCAAAAC 2251

Query: 844 AGATGTTGCGCAAGAGATGTTTCTGCTGCTAGATCATCTGTACCAAGATTTCA 785
Sbjct: 2252 AGATGTTGCGCAAGAGATGTTTCTGCTGCTAGATCATCTGTACCAAGATTTCA 2311

Query: 784 TCACCTTACAGAACGATCTTTATCCGTACAGAGAGTTCAGAGCTGTCTGCTCTTC 725
Sbjct: 2312 TCACCTTACAGAACGATCTTTATCCGTACAGAGAGTTCAGAGCTGTCTGCTCTTC 2371

Query: 724 CTTTGTAAATGATGCTTTCTATGAGCTGTGACAAAATTTCCAGCAATTAGCTAAGCA 665
Sbjct: 2372 CTTTGTAAATGATGCTTTCTATGAGCTGTGACAAAATTTCCAGCAATTAGCTAAGCA 2431

Query: 664 TTGGGAGAGAGGGGTGCAAAACGGGCTTTCTGTTTCTGCTCTGAGATGAAACATC 605
Sbjct: 2432 TTGGGAGAGAGGGGTGCAAAACGGGCTTTCTGTTTCTGCTCTGAGATGAAACATC 2491

Query: 604 TGATTTATGCTTTATGAGAGCTTACTCTCAATCCCAACTGTTAACTCCATGAACCA 545
Sbjct: 2492 TGATTTATGCTTTATGAGAGCTTACTCTCAATCCCAACTGTTAACTCCATGAACCA 2551

Query: 544 CAGTGTCTGCTGCTGATGGAACAAAGGAAACAGATGAAGAGTCTCTTAATCATTT 485
Sbjct: 2552 CAGTGTCTGCTGCTGATGGAACAAAGGAAACAGATGAAGAGTCTCTTAATCATTT 2611

Query: 484 TGAACAAAAATGTTAAGGATTTTAAACATATGATATTTTAAATTTATGCTTTTCA 425
Sbjct: 2612 TGAACAAAAATGTTAAGGATTTTAAACATATGATATTTTAAATTTATGCTTTTCA 2671

Query: 424 GTACTAAACACCAATTCATGCTGATCTGCTGCTGATAGAGCCATTCAGCTGAGATGC 365
Sbjct: 2672 GTACTAAACACCAATTCATGCTGATCTGCTGCTGATAGAGCCATTCAGCTGAGATGC 2731

Query: 364 CATACAAAGATGAAAAACCTGCTGATATACATACATATTTCTTTAAGCAGATAGT 305
Sbjct: 2732 CATACAAAGATGAAAAACCTGCTGATATACATACATATTTCTTTAAGCAGATAGT 2791

Query: 304 AGTTACATTAATATATATATATATATATTTTGTATTAACATCAAGAGGAGATC 245
Sbjct: 2792 AGTTACATTAATATATATATATATATATTTTGTATTAACATCAAGAGGAGATC 2851

Query: 244 TTGTGACTCTAAGAGTGCCTTTTGTATCAAGACAAAGAGATGATGATGATCATCTGC 185
Sbjct: 2852 TTGTGACTCTAAGAGTGCCTTTTGTATCAAGACAAAGAGATGATGATGATCATCTGC 2911

Query: 184 ATTACTTCATAGAGTTGTAAATATCTCTTAATATAGATATTTTCTGCTCACTAGC 125

```

D

```

Query: 124 AAAAGTGGTTTCAGTTCATGCGCGGCCCATGATGTTCTTGACTATTATGACCTTTTC 65
Sbjct: 2972 AAAAGTGGTTTCAGTTCATGCGCGGCCCATGATGTTCTTGACTATTATGACCTTTTC 3031

Query: 64 GTTTATGTCAACCCCTTCCCTCTCTGCTGCTAAATAAGTGGATGACAGAAAGCTCTTAAT 5
Sbjct: 3032 GTTTATGTCAACCCCTTCCCTCTCTGCTGCTAAATAAGTGGATGACAGAAAGCTCTTAAT 3091

Query: 4 GGAA 1
Sbjct: 3092 GGAA 3095

```

```

Parameters:
  Val0
  B=5
  ctefactor=2.00
  E=10

```

Query	Strand	MatID	Matrix name	Lambda	K	H	As Used	Computed	----
+1	0	-5,-4	Q=10,R=10	0.192	0.173	0.357	same	same	same
-1	0	-5,-4	Q=10,R=10	0.192	0.173	0.357	same	same	same
				0.104	0.0151	0.0600	n/a	n/a	n/a
				0.104	0.0151	0.0600	n/a	n/a	n/a

Query	Strand	MatID	Length	Eff.Length	E	S	W	T	X	E2	S2
+1	0	2668	2668	10.	97	11	n/a	73	0.024	82	
										102	0.43
										73	0.024
										102	0.43

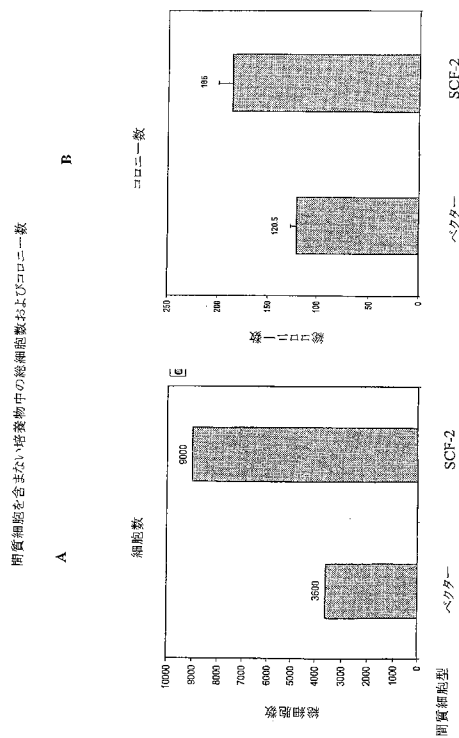
Statistics:

```

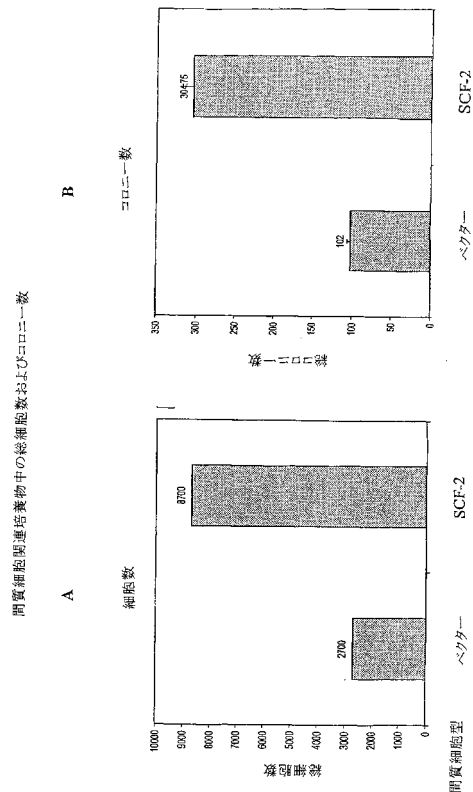
Database: /comp/seqfile.64767.4560546875
Title: temp/seqfile.64767.4560546875
Release date: unknown
Posted date: 4:36 PM PST Dec 21, 2000
Format: FAST
# of letters in database: 3095
# of sequences in database: 1
# of database sequences satisfying E: 1
No. of states in DFA: 257 (257 KB)
Total size of DFA: 318 KB (384 KB)
Time to generate neighborhood: 0.02u 0.01m 0.03t Elapsed: 00:00:00
No. of threads or processors used: 1
Search cpu time: 0.02u 0.01s 0.03t Elapsed: 00:00:00
Total cpu time: 0.05u 0.05s 0.10t Elapsed: 00:00:00
Start: Thu Dec 21 16:36:28 2000 End: Thu Dec 21 16:36:28 2000

```

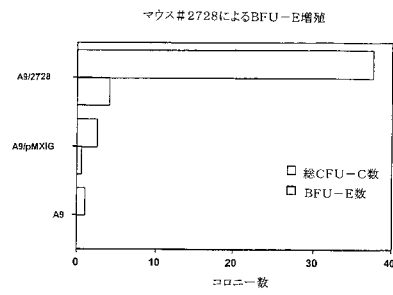
【図 3】



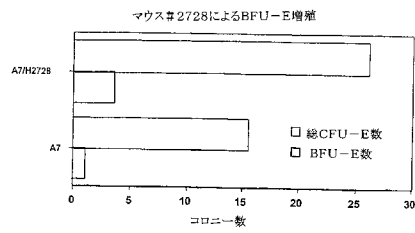
【図 4】



【図 5】

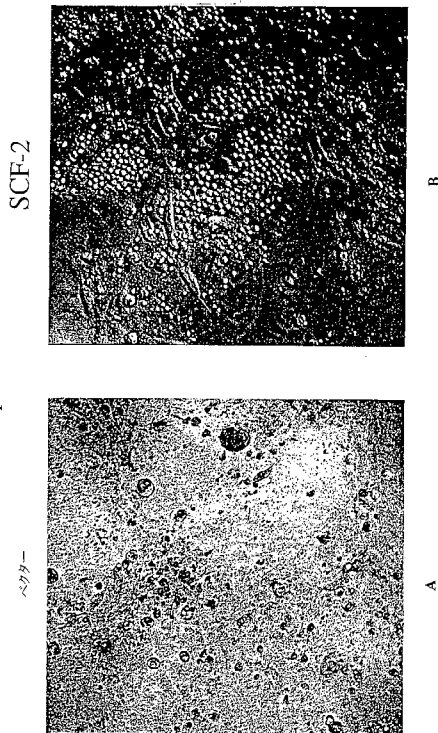


【図 6】



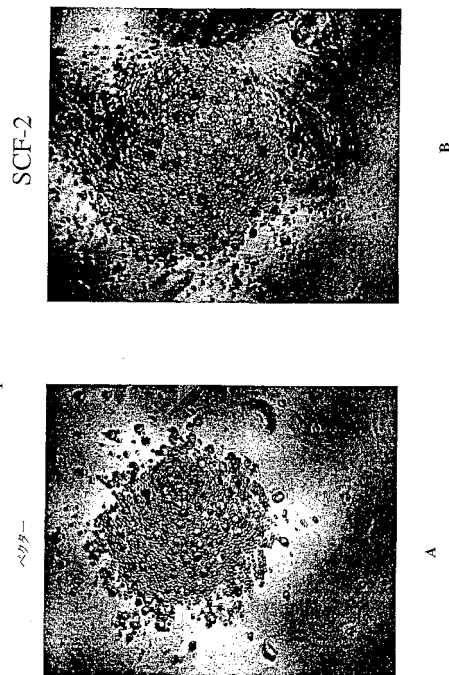
【図 8】

HSCの、ペクター形質導入間質細胞およびSCF-2形質導入間質細胞(2)との共培養
- Exp 041201 -



【図 9】

ペクター形質導入間質細胞またはSCF-2形質導入間質細胞由来の培養上清を供給したHSC
- Exp 041201 -



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 July 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/051868 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/475 (74) Agents: TOYAMA, Tsutomu et al.; Yokoyama Building
6th Floor, 4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku,
Tokyo 103-0004 (JP).
- (21) International Application Number: PCT/JP01/02839
- (22) International Filing Date: 25 July 2001 (25.07.2001) (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
PCT/US00/35260
23 December 2000 (23.12.2000) US (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).
- (71) Applicant: KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA
[JP/JP]; 10-1, Shinkawa 2-chome, Chuo-ku, Tokyo
104-8288 (JP).
- (72) Inventors: NISHIKAWA, Mitsuo; Iyaku Tansaku
Kenkyusho, 3, Miyahara-cho, Takasakishi, Gunma
370-1295 (JP); LABAT, Ivnn; 1735 Steiner Street, San
Francisco, CA 94115 (US); DRMANAC, Radoje, T; 850
East Greenwich Place, Palo Alto, CA 94303 (US); TANG,
Y., Tom; 4230 Ranwic Court, San Jose, CA 95118 (US);
CHAO, Cheng-Chi; 19980 Portal Plaza, Cupertino, CA
95014 (US).
- Published:**
without international search report and to be republished
upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/051868 A2

(54) Title: METHODS AND MATERIALS RELATING TO STEM CELL GROWTH FACTOR-LIKE POLYPEPTIDES AND POLYNUCLEOTIDES

(57) Abstract: The invention novel polynucleotides and polypeptides encoded by such polynucleotides and mutants or variants thereof that correspond to a novel human and mouse secreted stem cell growth factor-like polypeptide. These polynucleotides comprise nucleic acid sequences isolated from cDNA libraries prepared from mouse bone marrow and human fetal liver spleen, ovary, adult brain, lung tumor, spinal cord, cervix, ovary, endothelial cells, umbilical cord, placental, lymphocyte, lung fibroblast, fetal brain, and testis. Other aspects of the invention include vectors containing processes for producing novel human secreted stem cell growth factor-like polypeptides, and antibodies specific for such polypeptides.

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

1

**METHODS AND MATERIALS RELATING TO STEM CELL GROWTH
FACTOR-LIKE POLYPEPTIDES AND POLYNUCLEOTIDES**

This application is a continuation-in-part of International Application No.
PCT/US00/35260, filed December 23, 2000.

1. BACKGROUND

1.1 TECHNICAL FIELD

The present invention provides novel polynucleotides and proteins encoded by such polynucleotides, along with uses for these polynucleotides and proteins, for example in therapeutic, diagnostic and research methods. In particular, the invention relates to a novel stem cell growth factor-like polypeptide.

1.2 BACKGROUND ART

Identified polynucleotide and polypeptide sequences have numerous applications in, for example, diagnostics, forensics, gene mapping, identification of mutations responsible for genetic disorders or other traits, to assess biodiversity, and to produce many other types of data and products dependent on DNA and amino acid sequences. Proteins are known to have biological activity, for example, by virtue of their secreted nature in the case of leader sequence cloning, by virtue of their cell or tissue source in the case of PCR-based techniques, or by virtue of structural similarity to other genes of known biological activity. It is to these polypeptides and the polynucleotides encoding them that the present invention is directed. In particular, this invention is directed to novel stem cell growth factor-like polypeptides and polynucleotides.

Stem cells are defined as cells with the capacity for unlimited or prolonged self-renewal that can produce at least one type of highly differentiated descendent. It is believed that between the stem cells and its terminally differentiated progeny there is an intermediate population of committed progenitors with limited capacity and restricted differentiation potential [Watt and Hogan, Science, 287:1427-1430 (2000)]. Embryonic stem cell division and differentiation give rise to all the differentiated

cells and organs of a multicellular organism. A reserve of stem cells is maintained during the adult life of an organism in order to replenish the terminally differentiated cell populations like hematopoietic cells. It is generally assumed that the adult stem cells are derived from the embryonic stem cells and have only a limited potential for differentiation. Stem cells in general have been extremely difficult to culture and maintain *in vitro*, let alone directing them on a predetermined differentiation pathway.

However, more recently new research have shown that the adult stem cells do possess much wider potential for differentiation than previously thought. It was shown that adult neural stem cells when transplanted in an irradiated host, were able to populate the bone marrow and give rise to myeloid, lymphoid and early hematopoietic cells [Bjornson et al, Science, 283:534-537 (1999)]. Also, for the first time, researchers have been able to culture human embryonic stem cells *in vitro*. The authors showed that human blastocyst cells can be cultured for a prolonged time and could differentiate into variety of different cell types [Thomson et al, Science, 282:1145-1147 (1998)]. This result has opened the door for using autologous transplantation and organ regeneration for treatment of organ failures and degenerative diseases. Precise interactions of multiple receptors on the stem cells with soluble and stromal cell-expressed factors are required for a stem cell to divide and commit to differentiation. It has become apparent that the tissue niches and the microenvironment providing the factors are of the utmost importance. Cytokines like IL-3, IL-6, IL-7, and soluble proteins like flt-3, erythropoietin, and stem cell factor, all have been shown to act in concert to achieve differentiation down a specific pathway. It is thought precise combinations of growth factors, cytokines, and tissue localization could give rise to different differentiated stem cells populations.

Thus, the stem cell growth factor-like polypeptides and polynucleotides of the invention may be used to induce differentiation of embryonic and adult stem cells to give rise to different cell types. They may also be used in the treatment of leukemia, hemophilia, and degenerative diseases like Alzheimer's disease. The polynucleotides and polypeptides of the invention may further be utilized to generate new tissues and organs that may aid patients in need of transplanted tissues.

2. SUMMARY OF THE INVENTION

This invention is based on the discovery of novel stem cell growth factor-like polypeptides, novel isolated polynucleotides encoding such polypeptides, including recombinant DNA molecules, cloned genes or degenerate variants thereof, especially naturally occurring variants such as allelic variants, antisense polynucleotide molecules, and antibodies that specifically recognize one or more epitopes present on such polypeptides, as well as hybridomas producing such antibodies. Specifically, the polynucleotides of the present invention are based on polynucleotides isolated from cDNA libraries prepared from mouse femoral bone and human fetal liver spleen, ovary, adult brain, lung tumor, spinal cord, cervix, ovary, endothelial cells, umbilical cord, placenta, lymphocyte, lung fibroblast, fetal brain, and testis. The compositions of the present invention additionally include vectors such as expression vectors containing the polynucleotides of the invention, cells genetically engineered to contain such polynucleotides, and cells genetically engineered to express polypeptides encoded by such polynucleotides.

The compositions of the invention provide isolated polynucleotides that include, but are not limited to, a polynucleotide comprising the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39; or a fragment thereof, a polynucleotide comprising the full length protein coding sequence thereof (for example, SEQ ID NO: 28, 30-32, 34, 38 or 40), and a polynucleotide comprising the nucleotide sequence of the mature protein coding sequence thereof. The polynucleotides of the present invention also include, but are not limited to, a polynucleotide that hybridizes under stringent hybridization conditions to (a) the complement of any of the nucleotide sequences set forth in SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39; (b) a nucleotide sequence encoding any of SEQ ID NO: 23, 25, 28, 30-32, 34-35, 38 or 40; a polynucleotide which is an allelic variant of any polynucleotides recited above having at least 70% polynucleotide sequence identity to the polynucleotides; a polynucleotide which encodes a species homolog (e.g. orthologs) of any of the peptides recited above; or a polynucleotide that encodes a polypeptide comprising a specific domain or truncation of the polypeptide comprising SEQ ID NO: 23, 25, 28, 31, 38 or 40.

A collection as used in this application can be a collection of only one polynucleotide. The collection of sequence information or unique identifying

information of each sequence can be provided on a nucleic acid array. In one embodiment, segments of sequence information are provided on a nucleic acid array to detect the polynucleotide that contains the segment. The array can be designed to detect full-match or mismatch to the polynucleotide that contains the segment. The collection can also be provided in a computer-readable format.

This invention further provides cloning or expression vectors comprising at least a fragment of a polynucleotide set forth above and host cells or organisms transformed with these expression vectors. Useful vectors include plasmids, cosmids, lambda phage derivatives, phagemids, and the like, that are well known in the art. Accordingly, the invention also provides a vector including a polynucleotide of the invention and a host cell containing the polynucleotide. In general, the vector contains an origin of replication functional in at least one organism, convenient restriction endonuclease sites, and a selectable marker for the host cell. Vectors according to the invention include expression vectors, replication vectors, probe generation vectors, and sequencing vectors. A host cell according to the invention can be a prokaryotic or eukaryotic cell and can be a unicellular organism or part of a multicellular organism.

The compositions of the present invention include polypeptides comprising, but not limited to, an isolated polypeptide selected from the group comprising or consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 28, 30-32, 34, 38 or 40; and/or the corresponding full length or mature protein. Polypeptides of the invention also include polypeptides with biological activity that are encoded by (a) any of the polynucleotides having a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39; or (b) polynucleotides that hybridize to the complement of the polynucleotides of (a) under stringent hybridization conditions. Biologically or immunologically active variants of any of the protein sequences listed as SEQ ID NO: 28, 30-32, 34, 38 or 40 and substantial equivalents thereof that retain biological or immunological activity are also contemplated. The polypeptides of the invention may be wholly or partially chemically synthesized but are preferably produced by recombinant means using the genetically engineered cells (e.g. host cells) of the invention.

The invention also provides compositions comprising a polypeptide of the invention. Pharmaceutical compositions of the invention may comprise a polypeptide of the invention and an acceptable carrier, such as a hydrophilic, e.g., pharmaceutically

acceptable, carrier. The invention also relates to methods for producing a polypeptide of the invention comprising culturing host cells comprising an expression vector containing at least a fragment of a polynucleotide encoding a polypeptide of the invention in a suitable culture medium under conditions permitting expression of the desired polypeptide, and purifying the protein or peptide from the culture or from the host cells. Preferred embodiments include those in which the protein produced by such a process is a mature form of the protein.

Polynucleotides according to the invention have numerous applications in a variety of techniques known to those skilled in the art of molecular biology. These techniques include use as hybridization probes, use as oligomers, or primers, for PCR, use in an array, use in computer-readable media, use for chromosome and gene mapping, use in the recombinant production of protein, and use in generation of antisense DNA or RNA, their chemical analogs and the like. For example, when the expression of an mRNA is largely restricted to a particular cell or tissue type, polynucleotides of the invention can be used as hybridization probes to detect the presence of the particular cell or tissue mRNA in a sample using, *e.g.*, *in situ* hybridization.

In other exemplary embodiments, the polynucleotides are used in diagnostics as expressed sequence tags (ESTs) for identifying expressed genes or, as well known in the art and exemplified by Vollrath et al., Science, 258:52-59 (1992), as expressed sequence tags for physical mapping of the human genome.

The polypeptides according to the invention can be used in a variety of conventional procedures and methods that are currently applied to other proteins. For example, a polypeptide of the invention can be used to generate an antibody that specifically binds the polypeptide. Such antibodies, particularly monoclonal antibodies, are useful for detecting or quantitating the polypeptide in tissue. The polypeptides of the invention can also be used as molecular weight markers, and as a food supplement.

Methods are also provided for preventing, treating, or ameliorating a medical condition associated with abundant expression/activity of a polypeptide of the invention which comprises the step of administering to a mammalian subject a

therapeutically effective amount of a composition comprising a peptide of the present invention and a pharmaceutically acceptable carrier.

In particular, the stem cell growth factor-like polypeptides and polynucleotides of the invention may be used to induce differentiation of embryonic and adult stem cells to give rise to different cell types. They may also be used in the treatment of diseases, for example, leukemia, hemophilia, and degenerative diseases like Alzheimer's disease. The polynucleotides and polypeptides of the invention may further be utilized to generate new tissues and organs that may aid patients in need of transplanted tissues.

The methods of the invention also provide methods for the treatment of disorders as recited herein which comprise the administration of a therapeutically effective amount of a composition comprising a polynucleotide or polypeptide of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier to a mammalian subject exhibiting symptoms or tendencies related to disorders as recited herein. In addition, the invention encompasses methods for treating diseases or disorders as recited herein comprising the step of administering a composition comprising compounds and other substances that modulate the overall activity of the target gene products and a pharmaceutically acceptable carrier. Compounds and other substances can effect such modulation either on the level of target gene/protein expression or target protein activity. Specifically, methods are provided for preventing, treating or ameliorating a medical condition, including viral diseases, which comprises administering to a mammalian subject, including but not limited to humans, a therapeutically effective amount of a composition comprising a polypeptide of the invention or a therapeutically effective amount of a composition comprising a binding partner of (e.g., antibody specifically reactive for) stem cell growth factor-like polypeptides of the invention. The mechanics of the particular condition or pathology will dictate whether the polypeptides of the invention or binding partners (or inhibitors) of these would be beneficial to the individual in need of treatment.

According to this method, polypeptides of the invention can be administered to produce an *in vitro* or *in vivo* inhibition of cellular function. A polypeptide of the invention can be administered *in vivo* alone or as an adjunct to other therapies. Conversely, protein or other active ingredients of the present invention may be

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

7

included in formulations of a particular agent to minimize side effects of such an agent.

The invention further provides methods for manufacturing medicaments useful in the above-described methods.

The present invention further relates to methods for detecting the presence of the polynucleotides or polypeptides of the invention in a sample (e.g., tissue or sample). Such methods can, for example, be utilized as part of prognostic and diagnostic evaluation of disorders as recited herein and for the identification of subjects exhibiting a predisposition to such conditions.

The invention provides a method for detecting a polypeptide of the invention in a sample comprising contacting the sample with a compound that binds to and forms a complex with the polypeptide under conditions and for a period sufficient to form the complex and detecting formation of the complex, so that if a complex is formed, the polypeptide is detected.

The invention also provides kits comprising polynucleotide probes and/or monoclonal antibodies, and optionally quantitative standards, for carrying out methods of the invention. Furthermore, the invention provides methods for evaluating the efficacy of drugs, and monitoring the progress of patients, involved in clinical trials for the treatment of disorders as recited above.

The invention also provides methods for the identification of compounds that modulate (i.e., increase or decrease) the expression or activity of the polynucleotides and/or polypeptides of the invention. Such methods can be utilized, for example, for the identification of compounds that can ameliorate symptoms of disorders as recited herein. Such methods can include, but are not limited to, assays for identifying compounds and other substances that interact with (e.g., bind to) the polypeptides of the invention.

The invention provides a method for identifying a compound that binds to the polypeptide of the present invention comprising contacting the compound with the polypeptide under conditions and for a time sufficient to form a polypeptide/compound complex and detecting the complex, so that if the polypeptide/compound complex is detected, a compound that binds to the polypeptide is identified.

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

8

Also provided is a method for identifying a compound that binds to the polypeptide comprising contacting the compound with the polypeptide in a cell for a time sufficient to form a polypeptide/compound complex wherein the complex drives expression of a reporter gene sequence in the cell and detecting the complex by detecting reporter gene sequence expression so that if the polypeptide/compound complex is detected a compound that binds to the polypeptide is identified.

3. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 shows the schematic alignment of SEQ ID NO: 22 with SEQ ID NO. 1-21.

Figure 2 shows the BLASTX amino acid sequence alignment between stem cell growth factor-like polypeptide SEQ ID NO: 28 and tumor endothelial marker 7 precursor protein SEQ ID NO: 36 (St. Croix et al, Science, 289, 1197-1201), indicating that the two sequences share 72% similarity over 441 amino acid residues and 57% identity over the same 441 amino acid residues, wherein A=Alanine, C=Cysteine, D=Aspartic Acid, E= Glutamic Acid, F=Phenylalanine, G=Glycine, H=Histidine, I=Isoleucine, K=Lysine, L=Leucine, M=Methionine, N=Asparagine, P=Proline, Q=Glutamine, R=Arginine, S=Serine, T=Threonine, V=Valine, W=Tryptophan, Y=Tyrosine. Gaps are presented as dashes.

Figure 3A and 3B shows an increase in total cell count and colony number of hematopoietic stem cells caused by supernatants from stromal cells expressing stem cell factor-like polypeptide.

Figures 4A and 4B shows an increase in total cell count and colony number of hematopoietic stem cells caused by stem cell factor-like polypeptide expressing stromal cells.

Figure 5 shows the colony forming ability of CD34 positive hematopoietic stem cells cocultured with AGM-s3-A9 cells expressing the mouse #2728 gene for 2 weeks.

Figure 6 shows the colony forming ability of CD34 positive hematopoietic stem cells cocultured with AGM-s3-A7 cells expressing the human #2728 gene for 2 weeks.

Figure 7A and 7B shows that the animals transplanted with hematopoietic stem cells cocultured with AGM-S3-A9 cells expressing the #2728 gene showed chimerism at higher rate compared with ones transplanted hematopoietic stem cells cocultured with AGM-S3-A9 cells without the #2728 gene or with the cells expressing control vector alone.

Figures 8A and 8B shows co-culture of hematopoietic stem cells with vector- and SCF-2-transduced stromal cells-(2).

Figures 9A and 9B shows hematopoietic stem cells supplied with culture supplied from vector- or SCF-2-transduced stromal cells.

4. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The stem cell growth factor-like polypeptide of SEQ ID NO: 28 is an approximately 529-amino acid protein with a predicted molecular mass of approximately 59.2-kDa unglycosylated. Protein database searches with the BLASTP algorithm [Altschul S.F. et al., *J. Mol. Evol.*, 36:290-300 (1993) and Altschul S.F. et al., *J. Mol. Biol.*, 21:403-10 (1990), herein incorporated by reference] indicate that SEQ ID NO: 28 is homologous to tumor endothelial marker 7 precursor protein.

Figure 2 shows the BLASTX amino acid sequence alignment between the protein encoded by stem cell growth factor-like polypeptide SEQ ID NO: 28 and tumor endothelial marker 7 precursor protein SEQ ID NO: 36 [St. Croix et al., *Science*, 289:1197-1201], indicating that the two sequences share 72% similarity over 441 amino acid residues and 57% identity over the same 441 amino acid residues.

A predicted approximately thirty-residue signal peptide is encoded from approximately residue 1 through residue 30 of SEQ ID NO: 28 (the signal peptide is set forth in SEQ ID NO: 30). The extracellular portion is useful on its own. This can be confirmed by expression in mammalian cells and sequencing of the cleaved product. The signal peptide region was predicted using Neural Network SignalP V1.1 program [Nielsen et al., *Int. J. Neur. Syst.* 8:581 (1997)] (from Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmark), and hydrophobicity analysis using the Kyte/Doolittle algorithm [Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105 (1982)]. One of skill in the art will recognize that the cleavage site may be

different than that predicted by the computer program. SEQ ID NO: 31 is the resulting peptide when the signal peptide is removed from SEQ ID NO: 28.

A predicted approximately twenty eight-residue transmembrane region is encoded from approximately residue 452 through residue 479 of SEQ ID NO: 28 (the transmembrane region is set forth in SEQ ID NO: 32), which may be confirmed by expression in mammalian cells. The transmembrane region was predicted using Neural Network SignalP V1.1 program [Nielsen et al, Int. J. Neur. Syst. 8:581 (1997)] (from Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmark), and hydrophobicity analysis using the Kyte/Doolittle algorithm [Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105 (1982)]. One of skill in the art will recognize that the transmembrane region may be different than that predicted by the computer program.

The stem cell growth factor-like polypeptide of SEQ ID NO: 25 (identical to SEQ ID NO: 23) is an approximately 392-amino acid protein with a predicted molecular mass of approximately 50 kDa unglycosylated. Protein database searches with the BLASTP algorithm [Altschul S.F. et al., J. Mol. Evol. 36:290-300 (1993) and Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 21:403-10 (1990), herein incorporated by reference] indicate that SEQ ID NO: 25 is homologous to tumor endothelial marker 7 precursor protein.

A predicted approximately twenty eight-residue transmembrane region is encoded from approximately residue 315 through residue 342 of SEQ ID NO: 25 (SEQ ID NO: 32). It may be confirmed by expression in mammalian cells. The transmembrane region was predicted using Neural Network SignalP V1.1 program [Nielsen et al, Int. J. Neur. Syst., 8:581 (1997) (from Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmark)], and hydrophobicity analysis using the Kyte/Doolittle algorithm [Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157:105 (1982)]. One of skill in the art will recognize that the transmembrane region may be different than that predicted by the computer program.

In particular, the stem cell growth factor-like polypeptides and polynucleotides of the invention may be used to induce differentiation of embryonic and adult stem cells to give rise to different cell types. They may also be used in the treatment of leukemia, hemophilia, and degenerative diseases like Alzheimer's disease. The polynucleotides and polypeptides of the invention may further be

utilized to generate new tissues and organs that may aid patients in need of transplanted tissues.

4.1 DEFINITIONS

It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a", "an" and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise.

The term "active" refers to those forms of the polypeptide that retain the biologic and/or immunologic activities of any naturally occurring polypeptide. According to the invention, the terms "biologically active" or "biological activity" refer to a protein or peptide having structural, regulatory or biochemical functions of a naturally occurring molecule. Likewise "biologically active" or "biological activity" refers to the capability of the natural, recombinant or synthetic stem cell growth factor-like peptide, or any peptide thereof, to induce a specific biological response in appropriate animals or cells and to bind with specific antibodies. The term "stem cell growth factor-like biological activity" refers to biological activity that is similar to the biological activity of a stem cell growth factor-like as described herein.

The term "activated cells" as used herein are those cells which are engaged in extracellular or intracellular membrane trafficking, including the export of secretory or enzymatic molecules as part of a normal or disease process.

The terms "complementary" or "complementarity" refer to the natural binding (i.e., hybridization) of polynucleotides by base pairing. For example, the sequence 5'-AGT-3' binds to the complementary sequence 3'-TCA-5'. Complementarity between two single-stranded molecules may be "partial" such that only some of the nucleic acids bind or it may be "complete" such that total complementarity exists between the single stranded molecules. The degree of complementarity between the nucleic acid strands has significant effects on the efficiency and strength of the hybridization between the nucleic acid strands.

The term "embryonic stem cells (ES)" refers to a cell that can give rise to many differentiated cell types in an embryo or an adult, including the germ cells. The term "germ line stem cells (GSCs)" refers to stem cells derived from primordial stem cells that provide a steady and continuous source of germ cells for the production of

gametes. The term "primordial germ cells (PGCs)" refers to a small population of cells set aside from other cell lineages particularly from the yolk sac, mesenteries, or gonadal ridges during embryogenesis that have the potential to differentiate into germ cells and other cells. PGCs are the source from which GSCs and ES cells are derived. The PGCs, the GSCs and the ES cells are capable of self-renewal. Thus, these cells not only populate the germ line and give rise to a plurality of terminally differentiated cells that comprise the adult specialized organs, but are able to regenerate themselves. The term "totipotent" refers to the capability of a cell to differentiate into all of the cell types of an adult organism. The term "pluripotent" refers to the capability of a cell to differentiate into a number of differentiated cell types that are present in an adult organism. A pluripotent cell is restricted in its differentiation capability in comparison to a totipotent cell.

The term "expression modulating fragment," EMF, means a series of nucleotides that modulates the expression of an operably linked open reading frame (ORF) or another EMF.

As used herein, a sequence is said to "modulate the expression of an operably linked sequence" when the expression of the sequence is altered by the presence of the EMF. EMFs include, but are not limited to, promoters, and promoter modulating sequences (inducible elements). One class of EMFs is nucleic acid fragments which induce the expression of an operably linked ORF in response to a specific regulatory factor or physiological event.

The terms "nucleotide sequence" or "nucleic acid" or "polynucleotide" or "oligonucleotide" are used interchangeably and refer to a heteropolymer of nucleotides or the sequence of these nucleotides. These phrases also refer to DNA or RNA of genomic or synthetic origin which may be single-stranded or double-stranded and may represent the sense or the antisense strand, to peptide nucleic acid (PNA) or to any DNA-like or RNA-like material. In the sequences, A is adenine, C is cytosine, G is guanine, and T is thymine, while N is A, T, G, or C. It is contemplated that where the polynucleotide is RNA, the T (thymine) in the sequence herein may be replaced with U (uracil). Generally, nucleic acid segments provided by this invention may be assembled from fragments of the genome and short oligonucleotide linkers, or from a series of oligonucleotides, or from individual nucleotides, to provide a

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

13

synthetic nucleic acid which is capable of being expressed in a recombinant transcriptional unit comprising regulatory elements derived from a microbial or viral operon, or a eukaryotic gene.

The terms "oligonucleotide fragment" or a "polynucleotide fragment", "portion," or "segment" or "probe" or "primer" are used interchangeably and refer to a sequence of nucleotide residues which are at least about 5 nucleotides, more preferably at least about 7 nucleotides, more preferably at least about 9 nucleotides, more preferably at least about 11 nucleotides and most preferably at least about 17 nucleotides. The fragment is preferably less than about 500 nucleotides, preferably less than about 200 nucleotides, more preferably less than about 100 nucleotides, more preferably less than about 50 nucleotides and most preferably less than 30 nucleotides. Preferably the probe is from about 6 nucleotides to about 200 nucleotides, preferably from about 15 to about 50 nucleotides, more preferably from about 17 to 30 nucleotides and most preferably from about 20 to 25 nucleotides. Preferably the fragments can be used in polymerase chain reaction (PCR), various hybridization procedures or microarray procedures to identify or amplify identical or related parts of mRNA or DNA molecules. A fragment or segment may uniquely identify each polynucleotide sequence of the present invention. Preferably the fragment comprises a sequence substantially similar to a portion of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39.

Probes may, for example, be used to determine whether specific RNA or mRNA molecules are present in a cell or tissue or to isolate similar nucleic acid sequences from chromosomal DNA as described by Walsh et al. [Walsh, P.S. et al., PCR Methods Appl 1:241-250 (1992)]. They may be labeled by nick translation, Klenow fill-in reaction, PCR, or other methods well known in the art. Probes of the present invention, their preparation and/or labeling are elaborated in Sambrook, J. et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY; or Ausubel, F.M. et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, both of which are incorporated herein by reference in their entirety.

The nucleic acid sequences of the present invention also include the sequence information from any of the nucleic acid sequences of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or

39. The sequence information can be a segment of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 that uniquely identifies or represents the sequence information of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39. One such segment can be a twenty-mer nucleic acid sequence because the probability that a twenty-mer is fully matched in the human genome is 1 in 300. In the human genome, there are three billion base pairs in one set of chromosomes. Because 4^{20} possible twenty-mers exist, there are 300 times more twenty-mers than there are base pairs in a set of human chromosomes. Using the same analysis, the probability for a seventeen-mer to be fully matched in the human genome is approximately 1 in 5. When these segments are used in arrays for expression studies, fifteen-mer segments can be used. The probability that the fifteen-mer is fully matched in the expressed sequences is also approximately one in five because expressed sequences comprise less than approximately 5% of the entire genome sequence.

Similarly, when using sequence information for detecting a single mismatch, a segment can be a twenty-five mer. The probability that the twenty-five mer would appear in a human genome with a single mismatch is calculated by multiplying the probability for a full match ($1 \div 4^{25}$) times the increased probability for mismatch at each nucleotide position (3×25). The probability that an eighteen mer with a single mismatch can be detected in an array for expression studies is approximately one in five. The probability that a twenty-mer with a single mismatch can be detected in a human genome is approximately one in five.

The term "open reading frame," ORF, means a series of nucleotide triplets coding for amino acids with a single termination codon and is a sequence translatable into protein.

The terms "operably linked" or "operably associated" refer to functionally related nucleic acid sequences. For example, a promoter is operably associated or operably linked with a coding sequence if the promoter controls the transcription of the coding sequence. While operably linked nucleic acid sequences can be contiguous and in the same reading frame, certain genetic elements e.g. repressor genes are not contiguously linked to the coding sequence but still control transcription/translation of the coding sequence.

The term "pluripotent" refers to the capability of a cell to differentiate into a number of differentiated cell types that are present in an adult organism. A pluripotent cell is restricted in its differentiation capability in comparison to a totipotent cell.

The terms "polypeptide" or "peptide" or "amino acid sequence" refer to an oligopeptide, peptide, polypeptide or protein sequence or fragment thereof and to naturally occurring or synthetic molecules. A polypeptide "fragment," "portion," or "segment" is a stretch of amino acid residues of at least about 5 amino acids, preferably at least about 7 amino acids, more preferably at least about 9 amino acids and most preferably at least about 17 or more amino acids. The peptide preferably is not greater than about 200 amino acids, more preferably less than 150 amino acids and most preferably less than 100 amino acids. Preferably the peptide is from about 5 to about 200 amino acids. To be active, any polypeptide must have sufficient length to display biological and/or immunological activity.

The term "naturally occurring polypeptide" refers to polypeptides produced by cells that have not been genetically engineered and specifically contemplates various polypeptides arising from post-translational modifications of the polypeptide including, but not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation and acylation.

The term "translated protein coding portion" means a sequence which encodes for the full length protein which may include any leader sequence or a processing sequence.

The term "mature protein coding sequence" refers to a sequence which encodes a peptide or protein without any leader/signal sequence. The "mature protein portion" refers to that portion of the protein without the leader/signal sequence. The peptide may have the leader sequences removed during processing in the cell or the protein may have been produced synthetically or using a polynucleotide only encoding for the mature protein coding sequence. It is contemplated that the mature protein portion may or may not include an initial methionine residue. The initial methionine is often removed during processing of the peptide.

The term "derivative" refers to polypeptides chemically modified by such techniques as ubiquitination, labeling (e.g., with radionuclides or various enzymes), covalent polymer attachment such as pegylation (derivatization with polyethylene

glycol) and insertion or substitution by chemical synthesis of amino acids such as ornithine, which do not normally occur in human proteins.

The term "variant" (or "analog") refers to any polypeptide differing from naturally occurring polypeptides by amino acid insertions, deletions, and substitutions, created using, *e.g.*, recombinant DNA techniques. Guidance in determining which amino acid residues may be replaced, added or deleted without abolishing activities of interest, may be found by comparing the sequence of the particular polypeptide with that of homologous peptides and minimizing the number of amino acid sequence changes made in regions of high homology (conserved regions) or by replacing amino acids with consensus sequence.

Alternatively, recombinant variants encoding these same or similar polypeptides may be synthesized or selected by making use of the "redundancy" in the genetic code. Various codon substitutions, such as the silent changes which produce various restriction sites, may be introduced to optimize cloning into a plasmid or viral vector or expression in a particular prokaryotic or eukaryotic system. Mutations in the polynucleotide sequence may be reflected in the polypeptide or domains of other peptides added to the polypeptide to modify the properties of any part of the polypeptide, to change characteristics such as ligand-binding affinities, interchain affinities, or degradation/turnover rate.

Preferably, amino acid "substitutions" are the result of replacing one amino acid with another amino acid having similar structural and/or chemical properties, *i.e.*, conservative amino acid replacements. "Conservative" amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues involved. For example, nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan, and methionine; polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine; positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine, and histidine; and negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. "Insertions" or "deletions" are preferably in the range of about 1 to 20 amino acids, more preferably 1 to 10 amino acids. The variation allowed may be experimentally determined by systematically making insertions, deletions, or substitutions of amino acids in a

polypeptide molecule using recombinant DNA techniques and assaying the resulting recombinant variants for activity.

Alternatively, where alteration of function is desired, insertions, deletions or non-conservative alterations can be engineered to produce altered polypeptides. Such alterations can, for example, alter one or more of the biological functions or biochemical characteristics of the polypeptides of the invention. For example, such alterations may change polypeptide characteristics such as ligand-binding affinities, interchain affinities, or degradation/turnover rate. Further, such alterations can be selected so as to generate polypeptides that are better suited for expression, scale up and the like in the host cells chosen for expression. For example, cysteine residues can be deleted or substituted with another amino acid residue in order to eliminate disulfide bridges.

The terms "purified" or "substantially purified" as used herein denotes that the indicated nucleic acid or polypeptide is present in the substantial absence of other biological macromolecules, *e.g.*, polynucleotides, proteins, and the like. In one embodiment, the polynucleotide or polypeptide is purified such that it constitutes at least 95% by weight, more preferably at least 99% by weight, of the indicated biological macromolecules present (but water, buffers, and other small molecules, especially molecules having a molecular weight of less than 1000 daltons, can be present).

The term "isolated" as used herein refers to a nucleic acid or polypeptide separated from at least one other component (*e.g.*, nucleic acid or polypeptide) present with the nucleic acid or polypeptide in its natural source. In one embodiment, the nucleic acid or polypeptide is found in the presence of (if anything) only a solvent, buffer, ion, or other components normally present in a solution of the same. The terms "isolated" and "purified" do not encompass nucleic acids or polypeptides present in their natural source.

The term "recombinant," when used herein to refer to a polypeptide or protein, means that a polypeptide or protein is derived from recombinant (*e.g.*, microbial, insect, or mammalian) expression systems. "Microbial" refers to recombinant polypeptides or proteins made in bacterial or fungal (*e.g.*, yeast) expression systems. As a product, "recombinant microbial" defines a polypeptide or protein essentially

free of native endogenous substances and unaccompanied by associated native glycosylation. Polypeptides or proteins expressed in most bacterial cultures, *e.g.*, *E. coli*, will be free of glycosylation modifications; polypeptides or proteins expressed in yeast will have a glycosylation pattern in general different from those expressed in mammalian cells.

The term "recombinant expression vehicle or vector" refers to a plasmid or phage or virus or vector, for expressing a polypeptide from a DNA (RNA) sequence. An expression vehicle can comprise a transcriptional unit comprising an assembly of (1) a genetic element or elements having a regulatory role in gene expression, for example, promoters or enhancers, (2) a structural or coding sequence which is transcribed into mRNA and translated into protein, and (3) appropriate transcription initiation and termination sequences. Structural units intended for use in yeast or eukaryotic expression systems preferably include a leader sequence enabling extracellular secretion of translated protein by a host cell. Alternatively, where recombinant protein is expressed without a leader or transport sequence, it may include an amino terminal methionine residue. This residue may or may not be subsequently cleaved from the expressed recombinant protein to provide a final product.

The term "recombinant expression system" means host cells which have stably integrated a recombinant transcriptional unit into chromosomal DNA or carry the recombinant transcriptional unit extrachromosomally. Recombinant expression systems as defined herein will express heterologous polypeptides or proteins upon induction of the regulatory elements linked to the DNA segment or synthetic gene to be expressed. This term also means host cells which have stably integrated a recombinant genetic element or elements having a regulatory role in gene expression, for example, promoters or enhancers. Recombinant expression systems as defined herein will express polypeptides or proteins endogenous to the cell upon induction of the regulatory elements linked to the endogenous DNA segment or gene to be expressed. The cells can be prokaryotic or eukaryotic.

The term "secreted" includes a protein that is transported across or through a membrane, including transport as a result of signal sequences in its amino acid sequence when it is expressed in a suitable host cell. "Secreted" proteins include

without limitation proteins secreted wholly (*e.g.*, soluble proteins) or partially (*e.g.*, receptors) from the cell in which they are expressed. "Secreted" proteins also include without limitation proteins that are transported across the membrane of the endoplasmic reticulum. "Secreted" proteins are also intended to include proteins containing non-typical signal sequences (*e.g.* Interleukin-1 Beta, see Krasney, P.A. and Young, P.R., Cytokine, 4(2):134 -143 (1992)) and factors released from damaged cells (*e.g.* Interleukin-1 Receptor Antagonist, see Arend, W.P. et. al., Annu. Rev. Immunol., 16:27-55 (1998)).

Where desired, an expression vector may be designed to contain a "signal or leader sequence" which will direct the polypeptide through the membrane of a cell. Such a sequence may be naturally present on the polypeptides of the present invention or provided from heterologous protein sources by recombinant DNA techniques.

The term "stringent" is used to refer to conditions that are commonly understood in the art as stringent. Stringent conditions can include highly stringent conditions (*i.e.*, hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M NaHPO₄, 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA at 65°C, and washing in 0.1X SSC/0.1% SDS at 68°C), and moderately stringent conditions (*i.e.*, washing in 0.2X SSC/0.1% SDS at 42°C). Other exemplary hybridization conditions are described herein in the examples.

In instances of hybridization of deoxyoligonucleotides, additional exemplary stringent hybridization conditions include washing in 6X SSC/0.05% sodium pyrophosphate at 37°C (for 14-base oligonucleotides), 48°C (for 17-base oligonucleotides), 55°C (for 20-base oligonucleotides), and 60°C (for 23-base oligonucleotides).

As used herein, "substantially equivalent" can refer both to nucleotide and amino acid sequences, for example a mutant sequence, that varies from a reference sequence by one or more substitutions, deletions, or additions, the net effect of which does not result in an adverse functional dissimilarity between the reference and subject sequences. Typically, such a substantially equivalent sequence varies from one of those listed herein by no more than about 35% (*i.e.*, the number of individual residue substitutions, additions, and/or deletions in a substantially equivalent

sequence, as compared to the corresponding reference sequence, divided by the total number of residues in the substantially equivalent sequence is about 0.35 or less). Such a sequence is said to have 65% sequence identity to the listed sequence. In one embodiment, a substantially equivalent, *e.g.*, mutant, sequence of the invention varies from a listed sequence by no more than 30% (70% sequence identity); in a variation of this embodiment, by no more than 25% (75% sequence identity); and in a further variation of this embodiment, by no more than 20% (80% sequence identity) and in a further variation of this embodiment, by no more than 10% (90% sequence identity) and in a further variation of this embodiment, by no more than 5% (95% sequence identity). Substantially equivalent, *e.g.*, mutant, amino acid sequences according to the invention preferably have at least 80% sequence identity with a listed amino acid sequence, more preferably at least 90% sequence identity. Substantially equivalent nucleotide sequence of the invention can have lower percent sequence identities, taking into account, for example, the redundancy or degeneracy of the genetic code. Preferably, nucleotide sequence has at least about 65% identity, more preferably at least about 75% identity, and most preferably at least about 95% identity. For the purposes of the present invention, sequences having substantially equivalent biological activity and substantially equivalent expression characteristics are considered substantially equivalent. For the purposes of determining equivalence, truncation of the mature sequence (*e.g.*, via a mutation which creates a spurious stop codon) should be disregarded. Sequence identity may be determined, *e.g.*, using the Jotun Hein method [Hein, J., *Methods Enzymol.*, 183:626-645 (1990)]. Identity between sequences can also be determined by other methods known in the art, *e.g.* by varying hybridization conditions.

The term "totipotent" refers to the capability of a cell to differentiate into all of the cell types of an adult organism.

The term "transformation" means introducing DNA into a suitable host cell so that the DNA is replicable, either as an extrachromosomal element, or by chromosomal integration. The term "transfection" refers to the taking up of an expression vector by a suitable host cell, whether or not any coding sequences are in fact expressed. The term "infection" refers to the introduction of nucleic acids into a suitable host cell by use of a virus or viral vector.

As used herein, an "uptake modulating fragment," UMF, means a series of nucleotides which mediate the uptake of a linked DNA fragment into a cell. UMFs can be readily identified using known UMFs as a target sequence or target motif with the computer-based systems described below. The presence and activity of a UMF can be confirmed by attaching the suspected UMF to a marker sequence. The resulting nucleic acid molecule is then incubated with an appropriate host under appropriate conditions and the uptake of the marker sequence is determined. As described above, a UMF will increase the frequency of uptake of a linked marker sequence.

Each of the above terms is meant to encompass all that is described for each, unless the context dictates otherwise.

4.2 NUCLEIC ACIDS OF THE INVENTION

The invention is based on the discovery of a novel stem cell growth factor-like polypeptide, the polynucleotides encoding the stem cell growth factor-like polypeptide and the use of these compositions for the diagnosis, treatment or prevention of cancers and other immunological disorders.

The isolated polynucleotides of the invention include, but are not limited to a polynucleotide comprising any of the nucleotide sequences of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39; a fragment thereof; a polynucleotide comprising the full length protein coding sequence thereof, (for example coding for SEQ ID NO: 28, 38 or 40); and a polynucleotide comprising the nucleotide sequence encoding the mature protein coding sequence of the polynucleotides. The polynucleotides of the present invention also include, but are not limited to, a polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to (a) the complement of any of the nucleotides sequences of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39; (b) a polynucleotide encoding any one of the polypeptides of SEQ ID NO: 23, 25, 28, 30-32, 34, 35, 38 or 40; (c) a polynucleotide which is an allelic variant of any polynucleotides recited above; (d) a polynucleotide which encodes a species homolog of any of the proteins recited above; or (e) a polynucleotide that encodes a polypeptide comprising a specific domain or truncation of the polypeptides of SEQ ID NO: 23, 25, 28, 30-32, 34, 35, 38 or 40. Domains of interest may depend on the nature of the encoded polypeptide; e.g., domains in

receptor-like polypeptides include ligand-binding, extracellular, transmembrane, or cytoplasmic domains, or combinations thereof; domains in immunoglobulin-like proteins include the variable immunoglobulin-like domains; domains in enzyme-like polypeptides include catalytic and substrate binding domains; and domains in ligand polypeptides include receptor-binding domains.

The polynucleotides of the invention include naturally occurring or wholly or partially synthetic DNA, e.g., cDNA and genomic DNA, and RNA, e.g., mRNA. The polynucleotides may include all of the coding region of the cDNA or may represent a portion of the coding region of the cDNA.

The present invention also provides genes corresponding to the cDNA sequences disclosed herein. The corresponding genes can be isolated in accordance with known methods using the sequence information disclosed herein. Such methods include the preparation of probes or primers from the disclosed sequence information for identification and/or amplification of genes in appropriate genomic libraries or other sources of genomic materials. Further 5' and 3' sequence can be obtained using methods known in the art. For example, full length cDNA or genomic DNA that corresponds to any of the polynucleotides of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 can be obtained by screening appropriate cDNA or genomic DNA libraries under suitable hybridization conditions using any of the polynucleotides of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 or a portion thereof as a probe. Alternatively, the polynucleotides of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 may be used as the basis for suitable primer(s) that allow identification and/or amplification of genes in appropriate genomic DNA or cDNA libraries.

The nucleic acid sequences of the invention can be assembled from ESTs and sequences (including cDNA and genomic sequences) obtained from one or more public databases, such as dbEST, gbpr, and UniGene. The EST sequences can provide identifying sequence information, representative fragment or segment information, or novel segment information for the full-length gene.

The polynucleotides of the invention also provide polynucleotides including nucleotide sequences that are substantially equivalent to the polynucleotides recited above. Polynucleotides according to the invention can have, e.g., at least about 65%, at least about 70%, at least about 75%, at least about 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, or 89%, more typically at least about 90%, 91%, 92%, 93%, or 94% and

even more typically at least about 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity to a polynucleotide recited above.

Included within the scope of the nucleic acid sequences of the invention are nucleic acid sequence fragments that hybridize under stringent conditions to any of the nucleotide sequences of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 or complements thereof, which fragment is greater than about 5 nucleotides, preferably 7 nucleotides, more preferably greater than 9 nucleotides and most preferably greater than 17 nucleotides. Fragments of, e.g. 15, 17, or 20 nucleotides or more that are selective for (i.e. specifically hybridize to any one of the polynucleotides of the invention) are contemplated. Probes capable of specifically hybridizing to a polynucleotide can differentiate polynucleotide sequences of the invention from other polynucleotide sequences in the same family of genes or can differentiate human genes from genes of other species, and are preferably based on unique nucleotide sequences.

The sequences falling within the scope of the present invention are not limited to these specific sequences, but also include allelic and species variations thereof. Allelic and species variations can be routinely determined by comparing the sequence provided in SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 a representative fragment thereof, or a nucleotide sequence at least 90% identical, preferably 95% identical, to SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 with a sequence from another isolate of the same species. Furthermore, to accommodate codon variability, the invention includes nucleic acid molecules coding for the same amino acid sequences as do the specific ORFs disclosed herein. In other words, in the coding region of an ORF, substitution of one codon for another codon that encodes the same amino acid is expressly contemplated.

The nearest neighbor result for the nucleic acids of the present invention, including SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 can be obtained by searching a database using an algorithm or a program. Preferably, a BLAST which stands for Basic Local Alignment Search Tool is used to search for local sequence alignments [Altschul, S.F., J Mol. Evol., 36:290-300 (1993) and Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 21:403-410 (1990)].

Species homologs (or orthologs) of the disclosed polynucleotides and proteins are also provided by the present invention. Species homologs may be isolated and identified by making suitable probes or primers from the sequences provided herein and screening a suitable nucleic acid source from the desired species.

The invention also encompasses allelic variants of the disclosed polynucleotides or proteins; that is, naturally-occurring alternative forms of the isolated polynucleotide which also encode proteins which are identical, homologous or related to that encoded by the polynucleotides.

The nucleic acid sequences of the invention are further directed to sequences which encode variants of the described nucleic acids. These amino acid sequence variants may be prepared by methods known in the art by introducing appropriate nucleotide changes into a native or variant polynucleotide. There are two variables in the construction of amino acid sequence variants: the location of the mutation and the nature of the mutation. Nucleic acids encoding the amino acid sequence variants are preferably constructed by mutating the polynucleotide to encode an amino acid sequence that does not occur in nature. These nucleic acid alterations can be made at sites that differ in the nucleic acids from different species (variable positions) or in highly conserved regions (constant regions). Sites at such locations will typically be modified in series, *e.g.*, by substituting first with conservative choices (*e.g.*, hydrophobic amino acid to a different hydrophobic amino acid) and then with more distant choices (*e.g.*, hydrophobic amino acid to a charged amino acid), and then deletions or insertions may be made at the target site. Amino acid sequence deletions generally range from about 1 to 30 residues, preferably about 1 to 10 residues, and are typically contiguous. Amino acid insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one to one hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Intrasequence insertions may range generally from about 1 to 10 amino residues, preferably from 1 to 5 residues. Examples of terminal insertions include the heterologous signal sequences necessary for secretion or for intracellular targeting in different host cells and sequences such as FLAG or poly-histidine sequences useful for purifying the expressed protein.

In a preferred method, polynucleotides encoding the novel amino acid sequences are changed via site-directed mutagenesis. This method uses oligonucleotide sequences to alter a polynucleotide to encode the desired amino acid variant, as well as sufficient adjacent nucleotides on both sides of the changed amino acid to form a stable duplex on either side of the site being changed. In general, the techniques of site-directed mutagenesis are well known to those of skill in the art and this technique is exemplified

by publications such as, Edelman et al., DNA 2:183 (1983). A versatile and efficient method for producing site-specific changes in a polynucleotide sequence was published by Zoller and Smith, Nucleic Acids Res., 10:6487-6500 (1982). PCR may also be used to create amino acid sequence variants of the novel nucleic acids. When small amounts of template DNA are used as starting material, primer(s) that differs slightly in sequence from the corresponding region in the template DNA can generate the desired amino acid variant. PCR amplification results in a population of product DNA fragments that differ from the polynucleotide template encoding the polypeptide at the position specified by the primer. The product DNA fragments replace the corresponding region in the plasmid and this gives a polynucleotide encoding the desired amino acid variant.

A further technique for generating amino acid variants is the cassette mutagenesis technique described in Wells et al., Gene, 34:315 (1985); and other mutagenesis techniques well known in the art, such as, for example, the techniques in Sambrook et al., supra, and Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. Due to the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences which encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid sequence may be used in the practice of the invention for the cloning and expression of these novel nucleic acids. Such DNA sequences include those which are capable of hybridizing to the appropriate novel nucleic acid sequence under stringent conditions.

Polynucleotides encoding preferred polypeptide truncations of the invention can be used to generate polynucleotides encoding chimeric or fusion proteins comprising one or more domains of the invention and heterologous protein sequences.

The polynucleotides of the invention additionally include the complement of any of the polynucleotides recited above. The polynucleotide can be DNA (genomic, cDNA, amplified, or synthetic) or RNA. Methods and algorithms for obtaining such polynucleotides are well known to those of skill in the art and can include, for example, methods for determining hybridization conditions that can routinely isolate polynucleotides of the desired sequence identities.

In accordance with the invention, polynucleotide sequences comprising the mature protein coding sequences, coding for any one of SEQ ID NO: 28, 30-32, 34, 34, 38 or 40 or functional equivalents thereof, may be used to generate recombinant DNA molecules that direct the expression of that nucleic acid, or a functional equivalent

thereof, in appropriate host cells. Also included are the cDNA inserts of any of the clones identified herein.

A polynucleotide according to the invention can be joined to any of a variety of other nucleotide sequences by well-established recombinant DNA techniques [see Sambrook J et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY]. Useful nucleotide sequences for joining to polynucleotides include an assortment of vectors, e.g., plasmids, cosmids, lambda phage derivatives, phagemids, and the like, that are well known in the art. Accordingly, the invention also provides a vector including a polynucleotide of the invention and a host cell containing the polynucleotide. In general, the vector contains an origin of replication functional in at least one organism, convenient restriction endonuclease sites, and a selectable marker for the host cell. Vectors according to the invention include expression vectors, replication vectors, probe generation vectors, and sequencing vectors. A host cell according to the invention can be a prokaryotic or eukaryotic cell and can be a unicellular organism or part of a multicellular organism.

The present invention further provides recombinant constructs comprising a nucleic acid having any of the nucleotide sequences of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 or a fragment thereof or any other polynucleotides of the invention. In one embodiment, the recombinant constructs of the present invention comprise a vector, such as a plasmid or viral vector, into which a nucleic acid having any of the nucleotide sequences of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 or a fragment thereof is inserted, in a forward or reverse orientation. In the case of a vector comprising one of the ORFs of the present invention, the vector may further comprise regulatory sequences, including for example, a promoter, operably linked to the ORF. Large numbers of suitable vectors and promoters are known to those of skill in the art and are commercially available for generating the recombinant constructs of the present invention. The following vectors are provided by way of example. Bacterial: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrec99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eukaryotic: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PX1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, and pSVL (Pharmacia).

The isolated polynucleotide of the invention may be operably linked to an expression control sequence such as the pMT2 or pED expression vectors disclosed in

Kaufman et al., *Nucleic Acids Res.* 19, 4485-4490 (1991), in order to produce the protein recombinantly. Many suitable expression control sequences are known in the art. General methods of expressing recombinant proteins are also known and are exemplified in R. Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185:537-566 (1990). As defined herein "operably linked" means that the isolated polynucleotide of the invention and an expression control sequence are situated within a vector or cell in such a way that the protein is expressed by a host cell which has been transformed (transfected) with the ligated polynucleotide/expression control sequence.

Promoter regions can be selected from any desired gene using CAT (chloramphenicol transferase) vectors or other vectors with selectable markers. Two appropriate vectors are pKK232-8 and pCM7. Particular named bacterial promoters include lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR, and trc. Eukaryotic promoters include CMV immediate early, HSV thymidine kinase, early and late SV40, LTRs from retrovirus, and mouse metallothionein-I. Selection of the appropriate vector and promoter is well within the level of ordinary skill in the art. Generally, recombinant expression vectors will include origins of replication and selectable markers permitting transformation of the host cell, e.g., the ampicillin resistance gene of *E. coli* and *S. cerevisiae* TRP1 gene, and a promoter derived from a highly expressed gene to direct transcription of a downstream structural sequence. Such promoters can be derived from operons encoding glycolytic enzymes such as 3-phosphoglycerate kinase (PGK), a-factor, acid phosphatase, or heat shock proteins, among others. The heterologous structural sequence is assembled in appropriate phase with translation initiation and termination sequences, and preferably, a leader sequence capable of directing secretion of translated protein into the periplasmic space or extracellular medium. Optionally, the heterologous sequence can encode a fusion protein including an amino terminal identification peptide imparting desired characteristics, e.g., stabilization or simplified purification of expressed recombinant product. Useful expression vectors for bacterial use are constructed by inserting a structural DNA sequence encoding a desired protein together with suitable translation initiation and termination signals in operable reading phase with a functional promoter. The vector will comprise one or more phenotypic selectable markers and an origin of replication to ensure maintenance of the vector and to, if desirable, provide amplification within the host. Suitable prokaryotic hosts for transformation include *E. coli*, *Bacillus*

subtilis, *Salmonella typhimurium* and various species within the genera *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Staphylococcus*, although others may also be employed as a matter of choice.

As a representative but non-limiting example, useful expression vectors for bacterial use can comprise a selectable marker and bacterial origin of replication derived from commercially available plasmids comprising genetic elements of the well known cloning vector pBR322 (ATCC 37017). Such commercial vectors include, for example, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and GEM 1 (Promega Biotech, Madison, WI, USA). These pBR322 "backbone" sections are combined with an appropriate promoter and the structural sequence to be expressed. Following transformation of a suitable host strain and growth of the host strain to an appropriate cell density, the selected promoter is induced or derepressed by appropriate means (e.g., temperature shift or chemical induction) and cells are cultured for an additional period. Cells are typically harvested by centrifugation, disrupted by physical or chemical means, and the resulting crude extract retained for further purification.

Polynucleotides of the invention can also be used to induce immune responses. For example, as described in Fan et al., Nat. Biotech., 17:870-872 (1999), incorporated herein by reference, nucleic acid sequences encoding a polypeptide may be used to generate antibodies against the encoded polypeptide following topical administration of naked plasmid DNA or following injection, and preferably intramuscular injection of the DNA. The nucleic acid sequences are preferably inserted in a recombinant expression vector and may be in the form of naked DNA.

4.2.1 ANTISENSE NUCLEIC ACIDS

Another aspect of the invention pertains to isolated antisense nucleic acid molecules that can hybridize to, or are complementary to, the nucleic acid molecule comprising the stem cell growth factor-like nucleotide sequence, or fragments, analogs or derivatives thereof. An "antisense" nucleic acid comprises a nucleotide sequence that is complementary to a "sense" nucleic acid encoding a protein (e.g., complementary to the coding strand of a double-stranded cDNA molecule or complementary to an mRNA sequence). In specific aspects, antisense nucleic acid molecules are provided that comprise a sequence complementary to at least about 10, 25, 50, 100, 250 or 500

nucleotides or an entire stem cell growth factor-like coding strand, or to only a portion thereof. Nucleic acid molecules encoding fragments, homologs, derivatives and analogs of a stem cell growth factor-like or antisense nucleic acids complementary to a stem cell growth factor-like nucleic acid sequence of are additionally provided.

In one embodiment, an antisense nucleic acid molecule is antisense to a "coding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding a stem cell growth factor-like protein. The term "coding region" refers to the region of the nucleotide sequence comprising codons which are translated into amino acid residues. In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is antisense to a "conceding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding the stem cell growth factor-like protein. The term "conceding region" refers to 5' and 3' sequences which flank the coding region that are not translated into amino acids (i.e., also referred to as 5' and 3' untranslated regions).

Given the coding strand sequences encoding the stem cell growth factor-like protein disclosed herein, antisense nucleic acids of the invention can be designed according to the rules of Watson and Crick or Hoogsteen base pairing. The antisense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of stem cell growth factor-like mRNA, but more preferably is an oligonucleotide that is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of stem cell growth factor-like mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of stem cell growth factor-like mRNA. An antisense oligonucleotide can be, for example, about 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, or 50 nucleotides in length. An antisense nucleic acid of the invention can be constructed using chemical synthesis or enzymatic ligation reactions using procedures known in the art. For example, an antisense nucleic acid (e.g., an antisense oligonucleotide) can be chemically synthesized using naturally occurring nucleotides or variously modified nucleotides designed to increase the biological stability of the molecules or to increase the physical stability of the duplex formed between the antisense and sense nucleic acids (e.g., phosphorothioate derivatives and acridine substituted nucleotides can be used).

Examples of modified nucleotides that can be used to generate the antisense nucleic acid include: 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xanthine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-

carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine. Alternatively, the antisense nucleic acid can be produced biologically using an expression vector into which a nucleic acid has been subcloned in an antisense orientation (i.e., RNA transcribed from the inserted nucleic acid will be of an antisense orientation to a target nucleic acid of interest, described further in the following section).

The antisense nucleic acid molecules of the invention are typically administered to a subject or generated in situ such that they hybridize with or bind to cellular mRNA and/or genomic DNA encoding a stem cell growth factor-like protein to thereby inhibit expression of the protein (e.g., by inhibiting transcription and/or translation). The hybridization can be by conventional nucleotide complementarity to form a stable duplex, or, for example, in the case of an antisense nucleic acid molecule that binds to DNA duplexes, through specific interactions in the major groove of the double helix. An example of a route of administration of antisense nucleic acid molecules of the invention includes direct injection at a tissue site. Alternatively, antisense nucleic acid molecules can be modified to target selected cells and then administered systemically. For example, for systemic administration, antisense molecules can be modified such that they specifically bind to receptors or antigens expressed on a selected cell surface (e.g., by linking the antisense nucleic acid molecules to peptides or antibodies that bind to cell surface receptors or antigens). The antisense nucleic acid molecules can also be delivered to cells using the vectors described herein. To achieve sufficient nucleic acid molecules, vector constructs in which the antisense nucleic acid molecule is placed under the control of a strong pol II or pol III promoter are preferred.

In yet another embodiment, the antisense nucleic acid molecule of the invention is an alpha-anomeric nucleic acid molecule. An alpha-anomeric nucleic acid molecule forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual alpha-units, the strands run parallel to each other. See, e.g., Gaultier, et al., Nucl. Acids Res., 15: 6625-6641 (1987). The antisense nucleic acid molecule can also comprise a 2'-o-methylribonucleotide [see, e.g., Inoue, et al., Nucl. Acids Res., 15:6131-6148 (1987) or a chimeric RNA-DNA analogue [see, e.g., Inoue, et al., FEBS Lett., 215:327-330 (1987)].

4.2.2 RIBOZYMES AND PNA MOIETIES

Nucleic acid modifications include, by way of non-limiting example, modified bases, and nucleic acids whose sugar phosphate backbones are modified or derivatized. These modifications are carried out at least in part to enhance the chemical stability of the modified nucleic acid, such that they can be used, for example, as antisense binding nucleic acids in therapeutic applications in a subject.

In one embodiment, an antisense nucleic acid of the invention is a ribozyme. Ribozymes are catalytic RNA molecules with ribonuclease activity that are capable of cleaving a single-stranded nucleic acid, such as an mRNA, to which they have a complementary region. Thus, ribozymes (e.g., hammerhead ribozymes as described in Haselhoff and Gerlach, Nature 334:585-591 (1988)) can be used to catalytically cleave stem cell growth factor-like mRNA transcripts to thereby inhibit translation of stem cell growth factor-like mRNA. A ribozyme having specificity for a stem cell growth factor-like-encoding nucleic acid can be designed based upon the nucleotide sequence of a stem cell growth factor-like cDNA disclosed herein. For example, a derivative of a Tetrahymena L-19 IVS RNA can be constructed in which the nucleotide sequence of the active site is complementary to the nucleotide sequence to be cleaved in a stem cell growth factor-like-encoding mRNA. See, e.g., U.S. Patent 4,987,071 to Cech, et al. and U.S. Patent 5,116,742 to Cech, et al. Stem cell growth factor-like mRNA can also be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, e.g., Bartel et al., Science, 261:1411-1418 (1993).

Alternatively, stem cell growth factor-like gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the stem cell

growth factor-like nucleic acid (e.g., the stem cell growth factor-like promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the stem cell growth factor-like gene in target cells. [See, e.g., Helene, *Anticancer Drug Des.*, 6:569-84 (1991); Helene, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660: 27-36 (1992); Maher, *Bioassays*, 14:807-15 (1992)].

In various embodiments, the stem cell growth factor-like nucleic acids can be modified at the base moiety, sugar moiety or phosphate backbone to improve, e.g., the stability, hybridization, or solubility of the molecule. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acids can be modified to generate peptide nucleic acids [see, e.g., Hyrup, et al., *Bioorg Med Chem.*, 4:5-23 (1996)]. As used herein, the terms "peptide nucleic acids" or "PNAs" refer to nucleic acid mimics (e.g., DNA mimics) in which the deoxyribose phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide backbone and only the four natural nucleobases are retained. The neutral backbone of PNAs has been shown to allow for specific hybridization to DNA and RNA under conditions of low ionic strength. The synthesis of PNA oligomers can be performed using standard solid phase peptide synthesis protocols as described in Hyrup, et al., 1996, *supra* and Perry-O'Keefe, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.; USA* 93:14670-14675 (1996).

PNAs of stem cell growth factor-like can be used in therapeutic and diagnostic applications. For example, PNAs can be used as antisense or antigene agents for sequence-specific modulation of gene expression by, e.g., inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of stem cell growth factor-like can also be used, for example, in the analysis of single base pair mutations in a gene (e.g., PNA directed PCR clamping; as artificial restriction enzymes when used in combination with other enzymes, e.g., S1 nucleases (see, Hyrup, et al., 1996, *supra*); or as probes or primers for DNA sequence and hybridization (see, Hyrup, et al., 1996, *supra*; Perry-O'Keefe, et al., 1996, *supra*).

In another embodiment, PNAs of stem cell growth factor-like can be modified, e.g., to enhance their stability or cellular uptake, by attaching lipophilic or other helper groups to PNA, by the formation of PNA-DNA chimeras, or by the use of liposomes or other techniques of drug delivery known in the art. For example, PNA-DNA chimeras of stem cell growth factor-like can be generated that may combine the advantageous properties of PNA and DNA. Such chimeras allow DNA recognition enzymes (e.g.,

RNase H and DNA polymerases) to interact with the DNA portion while the PNA portion would provide high binding affinity and specificity. PNA-DNA chimeras can be linked using linkers of appropriate lengths selected in terms of base stacking, number of bonds between the nucleobases, and orientation [see, Hyrup, et al., 1996, supra]. The synthesis of PNA-DNA chimeras can be performed as described in Hyrup, et al., 1996, supra, and Nucl Acids Res, 24:3357-3363 (1996). For example, a DNA chain can be synthesized on a solid support using standard phosphoramidite coupling chemistry, and modified nucleoside analogs, e.g., 5'-(4-methoxytrityl)amino-5'-deoxy-thymidine phosphoramidite, can be used between the PNA and the 5' end of DNA. See, e.g., Mag, et al., Nucl Acid Res., 17:5973-5988 (1989). PNA monomers are then coupled in a stepwise manner to produce a chimeric molecule with a 5' PNA segment and a 3' DNA segment. See, e.g., Finn, et al., 1996, supra. Alternatively, chimeric molecules can be synthesized with a 5' DNA segment and a 3' PNA segment. See, e.g., Petersen, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 5:1119-11124 (1975).

In other embodiments, the oligonucleotide may include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane [see, e.g., Letsinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6553-6556 (1989); Lemaitre, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 84:648-652 (1987); and PCT Publication No. WO88/09810] or the blood-brain barrier [see, e.g., PCT Publication No. WO 89/10134]. In addition, oligonucleotides can be modified with hybridization-triggered cleavage agents [see, e.g., Krol et al., BioTechniques, 6:958-976 (1988)] or intercalating agents [see, e.g., Zon, Pharm. Res., 5:539-549 (1988)]. To this end, the oligonucleotide can be conjugated to another molecule, e.g., a peptide, a hybridization triggered cross-linking agent, a transport agent, a hybridization-triggered cleavage agent, and the like.

4.3 HOST CELLS

The present invention further provides host cells genetically engineered to contain the polynucleotides of the invention. For example, such host cells may contain nucleic acids of the invention introduced into the host cell using known transformation, transfection or infection methods. The present invention still further provides host cells genetically engineered to express the polynucleotides of the invention, wherein such

polynucleotides are in operative association with a regulatory sequence heterologous to the host cell which drives expression of the polynucleotides in the cell.

The host cell can be a higher eukaryotic host cell, such as a mammalian cell, a lower eukaryotic host cell, such as a yeast cell, or the host cell can be a prokaryotic cell, such as a bacterial cell. Introduction of the recombinant construct into the host cell can be effected by calcium phosphate transfection, DEAE, dextran mediated transfection, or electroporation [Davis, L. et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986)]. The host cells containing one of polynucleotides of the invention, can be used in conventional manners to produce the gene product encoded by the isolated fragment (in the case of an ORF) or can be used to produce a heterologous protein under the control of the EMP.

Any host/vector system can be used to express one or more of the ORFs of the present invention. These include, but are not limited to, eukaryotic hosts such as HeLa cells, Cv-1 cell, COS cells, and Sf9 cells, as well as prokaryotic host such as *E. coli* and *B. subtilis*. The most preferred cells are those which do not normally express the particular polypeptide or protein or which expresses the polypeptide or protein at low natural level. Mature proteins can be expressed in mammalian cells, yeast, bacteria, or other cells under the control of appropriate promoters. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention. Appropriate cloning and expression vectors for use with prokaryotic and eukaryotic hosts are described by Sambrook, et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York (1989), the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

Various mammalian cell culture systems can also be employed to express recombinant protein. Examples of mammalian expression systems include the COS-7 lines of monkey kidney fibroblasts, described by Gluzman, Cell, 23:175 (1981), and other cell lines capable of expressing a compatible vector, for example, the C127, 3T3, CHO, HeLa and BHK cell lines. Mammalian expression vectors will comprise an origin of replication, a suitable promoter, and also any necessary ribosome binding sites, polyadenylation site, splice donor and acceptor sites, transcriptional termination sequences, and 5' flanking nontranscribed sequences. DNA sequences derived from the SV40 viral genome, for example, SV40 origin, early promoter, enhancer, splice, and polyadenylation sites may be used to provide the required nontranscribed genetic

elements. Recombinant polypeptides and proteins produced in bacterial culture are usually isolated by initial extraction from cell pellets, followed by one or more salting-out, aqueous ion exchange or size exclusion chromatography steps. Protein refolding steps can be used, as necessary, in completing configuration of the mature protein. Finally, high performance liquid chromatography (HPLC) can be employed for final purification steps. Microbial cells employed in expression of proteins can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents.

A number of types of cells may act as suitable host cells for expression of the protein. Mammalian host cells include, for example, monkey COS cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, human kidney 293 cells, human epidermal A431 cells, human Colo205 cells, 3T3 cells, CV-1 cells, other transformed primate cell lines, normal diploid cells, cell strains derived from in vitro culture of primary tissue, primary explants, HeLa cells, mouse L cells, BHK, HL-60, U937, HaK or Jurkat cells.

Alternatively, it may be possible to produce the protein in lower eukaryotes such as yeast or in prokaryotes such as bacteria. Potentially suitable yeast strains include *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* strains, *Candida*, or any yeast strain capable of expressing heterologous proteins. Potentially suitable bacterial strains include *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, or any bacterial strain capable of expressing heterologous proteins. If the protein is made in yeast or bacteria, it may be necessary to modify the protein produced therein, for example by phosphorylation or glycosylation of the appropriate sites, in order to obtain the functional protein. Such covalent attachments may be accomplished using known chemical or enzymatic methods.

In another embodiment of the present invention, cells and tissues may be engineered to express an endogenous gene comprising the polynucleotides of the invention under the control of inducible regulatory elements, in which case the regulatory sequences of the endogenous gene may be replaced by homologous recombination. As described herein, gene targeting can be used to replace a gene's existing regulatory region with a regulatory sequence isolated from a different gene or a novel regulatory sequence synthesized by genetic engineering methods. Such regulatory sequences may be comprised of promoters, enhancers, scaffold-attachment regions, negative regulatory

elements, transcriptional initiation sites, regulatory protein binding sites or combinations of said sequences. Alternatively, sequences which affect the structure or stability of the RNA or protein produced may be replaced, removed, added, or otherwise modified by targeting, including polyadenylation signals, mRNA stability elements, splice sites, leader sequences for enhancing or modifying transport or secretion properties of the protein, or other sequences which alter or improve the function or stability of protein or RNA molecules.

The targeting event may be a simple insertion of the regulatory sequence, placing the gene under the control of the new regulatory sequence, e.g., inserting a new promoter or enhancer or both upstream of a gene. Alternatively, the targeting event may be a simple deletion of a regulatory element, such as the deletion of a tissue-specific negative regulatory element. Alternatively, the targeting event may replace an existing element; for example, a tissue-specific enhancer can be replaced by an enhancer that has broader or different cell-type specificity than the naturally occurring elements. Here, the naturally occurring sequences are deleted and new sequences are added. In all cases, the identification of the targeting event may be facilitated by the use of one or more selectable marker genes that are contiguous with the targeting DNA, allowing for the selection of cells in which the exogenous DNA has integrated into the host cell genome. The identification of the targeting event may also be facilitated by the use of one or more marker genes exhibiting the property of negative selection, such that the negatively selectable marker is linked to the exogenous DNA, but configured such that the negatively selectable marker flanks the targeting sequence, and such that a correct homologous recombination event with sequences in the host cell genome does not result in the stable integration of the negatively selectable marker. Markers useful for this purpose include the Herpes Simplex Virus thymidine kinase (TK) gene or the bacterial xanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (gpt) gene.

The gene targeting or gene activation techniques which can be used in accordance with this aspect of the invention are more particularly described in U.S. Patent No. 5,272,071 to Chappel; U.S. Patent No. 5,578,461 to Sherwin et al.; International Application No. PCT/US92/09627 (WO93/09222) by Selden et al.; and International Application No. PCT/US90/06436 (WO91/06667) by Skoultschi et al., each of which is incorporated by reference herein in its entirety.

4.3.1 CHIMERIC AND FUSION PROTEINS

The invention also provides stem cell growth factor-like chimeric or fusion proteins. As used herein, a stem cell growth factor-like "chimeric protein" or "fusion protein" comprises a stem cell growth factor-like polypeptide operatively-linked to a non-stem cell growth factor-like polypeptide. A "stem cell growth factor-like polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a stem cell growth factor-like protein, whereas a "non-stem cell growth factor-like polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein that is not substantially homologous to the stem cell growth factor-like protein, e.g., a protein that is different from the stem cell growth factor-like protein and that is derived from the same or a different organism. Within a stem cell growth factor-like fusion protein the stem cell growth factor-like polypeptide can correspond to all or a portion of a stem cell growth factor-like protein. In one embodiment, a stem cell growth factor-like fusion protein comprises at least one biologically active portion of a stem cell growth factor-like protein. In another embodiment, a stem cell growth factor-like fusion protein comprises at least two biologically active portions of a stem cell growth factor-like protein. In yet another embodiment, a stem cell growth factor-like fusion protein comprises at least three biologically active portions of a stem cell growth factor-like protein. Within the fusion protein, the term "operatively-linked" is intended to indicate that the stem cell growth factor-like polypeptide and the non-stem cell growth factor-like polypeptide are fused in-frame with one another. The non-stem cell growth factor-like polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the stem cell growth factor-like polypeptide.

In one embodiment, the fusion protein is a GST-stem cell growth factor-like fusion protein in which the stem cell growth factor-like sequences are fused to the C-terminus of the GST (glutathione S-transferase) sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of recombinant stem cell growth factor-like polypeptides. In another embodiment, the fusion protein is a stem cell growth factor-like protein containing a heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (e.g., mammalian host cells), expression and/or secretion of stem cell growth factor-like can be increased through use of a heterologous signal sequence.

In yet another embodiment, the fusion protein is a stem cell growth factor-like-immunoglobulin fusion protein in which the stem cell growth factor-like sequences are

fused to sequences derived from a member of the immunoglobulin protein family. The stem cell growth factor-like-immunoglobulin fusion proteins of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject to inhibit an interaction between a stem cell growth factor-like ligand and a stem cell growth factor-like protein on the surface of a cell, to thereby suppress stem cell growth factor-like-mediated signal transduction in vivo. The stem cell growth factor-like-immunoglobulin fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a stem cell growth factor-like cognate ligand. Inhibition of the stem cell growth factor-like ligand/stem cell growth factor-like interaction can be useful therapeutically for both the treatment of proliferative and differentiative disorders, as well as modulating (e.g. promoting or inhibiting) cell survival. Moreover, the stem cell growth factor-like-immunoglobulin fusion proteins of the invention can be used as immunogens to produce anti-stem cell growth factor-like antibodies in a subject, to purify stem cell growth factor-like ligands, and in screening assays to identify molecules that inhibit the interaction of stem cell growth factor-like with a stem cell growth factor-like ligand.

A stem cell growth factor-like chimeric or fusion protein of the invention can be produced by standard recombinant DNA techniques. For example, DNA fragments coding for the different polypeptide sequences are ligated together in-frame in accordance with conventional techniques, e.g., by employing blunt-ended or stagger-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene can be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers. Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers that give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments that can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence [see, e.g., Ausubel, et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1992]. Moreover, many expression vectors are commercially available that already encode a fusion moiety (e.g., a GST polypeptide). A stem cell growth factor-like-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the stem cell growth factor-like protein.

4.4 POLYPEPTIDES OF THE INVENTION

The isolated polypeptides of the invention include, but are not limited to, a polypeptide comprising: the amino acid sequence set forth as any one of SEQ ID NO: 28, 30-32, 34, 38 or 40 or an amino acid sequence encoded by any one of the nucleotide sequences SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 or the corresponding full length or mature protein. Polypeptides of the invention also include polypeptides preferably with biological or immunological activity that are encoded by: (a) a polynucleotide having any one of the nucleotide sequences set forth in SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 or (b) polynucleotides encoding any one of the amino acid sequences set forth as SEQ ID NO: 28, 30-32, 34, 38 or 40 or (c) polynucleotides that hybridize to the complement of the polynucleotides of either (a) or (b) under stringent hybridization conditions. The invention also provides biologically active or immunologically active variants of any of the amino acid sequences set forth as SEQ ID NO: 28, 30-32, 34, 38 or 40 or the corresponding full length or mature protein; and "substantial equivalents" thereof (e.g., with at least about 65%, at least about 70%, at least about 75%, at least about 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, or 89%, more typically at least about 90%, 91%, 92%, 93%, or 94% and even more typically at least about 95%, 96%, 97%, 98% or 99%, most typically at least about 99% amino acid identity) that retain biological activity. Polypeptides encoded by allelic variants may have a similar, increased, or decreased activity compared to polypeptides comprising SEQ ID NO: 28, 30-32, 34, 38 or 40.

Fragments of the proteins of the present invention which are capable of exhibiting biological activity are also encompassed by the present invention. Fragments of the protein may be in linear form or they may be cyclized using known methods, for example, as described in H. U. Saragovi, et al., *Bio/Technology*, 10:773-778 (1992) and in R. S. McDowell, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:9245-9253 (1992), both of which are incorporated herein by reference. Such fragments may be fused to carrier molecules such as immunoglobulins for many purposes, including increasing the valency of protein binding sites.

The present invention also provides both full-length and mature forms (for example, without a signal sequence or precursor sequence) of the disclosed proteins. The protein coding sequence is identified in the sequence listing by translation of the disclosed nucleotide sequences. The mature form of such protein may be obtained by

expression of a full-length polynucleotide in a suitable mammalian cell or other host cell. The sequence of the mature form of the protein is also determinable from the amino acid sequence of the full-length form. Where proteins of the present invention are membrane bound, soluble forms of the proteins are also provided. In such forms, part or all of the regions causing the proteins to be membrane bound are deleted so that the proteins are fully secreted from the cell in which it is expressed.

Protein compositions of the present invention may further comprise an acceptable carrier, such as a hydrophilic, *e.g.*, pharmaceutically acceptable, carrier.

The present invention further provides isolated polypeptides encoded by the nucleic acid fragments of the present invention or by degenerate variants of the nucleic acid fragments of the present invention. By "degenerate variant" is intended nucleotide fragments which differ from a nucleic acid fragment of the present invention (*e.g.*, an ORF) by nucleotide sequence but, due to the degeneracy of the genetic code, encode an identical polypeptide sequence. Preferred nucleic acid fragments of the present invention are the ORFs that encode proteins.

A variety of methodologies known in the art can be utilized to obtain any one of the isolated polypeptides or proteins of the present invention. At the simplest level, the amino acid sequence can be synthesized using commercially available peptide synthesizers. The synthetically-constructed protein sequences, by virtue of sharing primary, secondary or tertiary structural and/or conformational characteristics with proteins may possess biological properties in common therewith, including protein activity. This technique is particularly useful in producing small peptides and fragments of larger polypeptides. Fragments are useful, for example, in generating antibodies against the native polypeptide. Thus, they may be employed as biologically active or immunological substitutes for natural, purified proteins in screening of therapeutic compounds and in immunological processes for the development of antibodies.

The polypeptides and proteins of the present invention can alternatively be purified from cells which have been altered to express the desired polypeptide or protein. As used herein, a cell is said to be altered to express a desired polypeptide or protein when the cell, through genetic manipulation, is made to produce a polypeptide or protein which it normally does not produce or which the cell normally produces at a lower level. One skilled in the art can readily adapt procedures for introducing and expressing either

recombinant or synthetic sequences into eukaryotic or prokaryotic cells in order to generate a cell which produces one of the polypeptides or proteins of the present invention.

The invention also relates to methods for producing a polypeptide comprising growing a culture of host cells of the invention in a suitable culture medium, and purifying the protein from the cells or the culture in which the cells are grown. For example, the methods of the invention include a process for producing a polypeptide in which a host cell containing a suitable expression vector that includes a polynucleotide of the invention is cultured under conditions that allow expression of the encoded polypeptide. The polypeptide can be recovered from the culture, conveniently from the culture medium, or from a lysate prepared from the host cells and further purified. Preferred embodiments include those in which the protein produced by such process is a full length or mature form of the protein.

In an alternative method, the polypeptide or protein is purified from bacterial cells which naturally produce the polypeptide or protein. One skilled in the art can readily follow known methods for isolating polypeptides and proteins in order to obtain one of the isolated polypeptides or proteins of the present invention. These include, but are not limited to, immunochromatography, HPLC, size-exclusion chromatography, ion-exchange chromatography, and immuno-affinity chromatography. See, e.g., Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag (1994); Sambrook, et al., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*. Polypeptide fragments that retain biological/immunological activity include fragments comprising greater than about 100 amino acids, or greater than about 200 amino acids, and fragments that encode specific protein domains.

The purified polypeptides can be used in *in vitro* binding assays which are well known in the art to identify molecules which bind to the polypeptides. These molecules include but are not limited to, for e.g., small molecules, molecules from combinatorial libraries, antibodies or other proteins. The molecules identified in the binding assay are then tested for antagonist or agonist activity in *in vivo* tissue culture or animal models that are well known in the art. In brief, the molecules are titrated into a plurality of cell cultures or animals and then tested for either cell/animal death or prolonged survival of the animal/cells.

In addition, the peptides of the invention or molecules capable of binding to the peptides may be complexed with toxins, e.g., ricin or cholera, or with other compounds that are toxic to cells. The toxin-binding molecule complex is then targeted to a tumor or other cell by the specificity of the binding molecule for SEQ ID NO: 28, 30-32, 34, 38 or 40.

The protein of the invention may also be expressed as a product of transgenic animals, e.g., as a component of the milk of transgenic cows, goats, pigs, or sheep which are characterized by somatic or germ cells containing a nucleotide sequence encoding the protein.

The proteins provided herein also include proteins characterized by amino acid sequences similar to those of purified proteins but into which modification are naturally provided or deliberately engineered. For example, modifications, in the peptide or DNA sequence, can be made by those skilled in the art using known techniques. Modifications of interest in the protein sequences may include the alteration, substitution, replacement, insertion or deletion of a selected amino acid residue in the coding sequence. For example, one or more of the cysteine residues may be deleted or replaced with another amino acid to alter the conformation of the molecule. Techniques for such alteration, substitution, replacement, insertion or deletion are well known to those skilled in the art (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,518,584). Preferably, such alteration, substitution, replacement, insertion or deletion retains the desired activity of the protein. Regions of the protein that are important for the protein function can be determined by various methods known in the art including the alanine-scanning method which involved systematic substitution of single or strings of amino acids with alanine, followed by testing the resulting alanine-containing variant for biological activity. This type of analysis determines the importance of the substituted amino acid(s) in biological activity. Regions of the protein that are important for protein function may be determined by the eMATRIX program.

Other fragments and derivatives of the sequences of proteins which would be expected to retain protein activity in whole or in part and are useful for screening or other immunological methodologies may also be easily made by those skilled in the art given the disclosures herein. Such modifications are encompassed by the present invention.

The protein may also be produced by operably linking the isolated polynucleotide of the invention to suitable control sequences in one or more insect expression vectors,

and employing an insect expression system. Materials and methods for baculovirus/insect cell expression systems are commercially available in kit form from, *e.g.*, Invitrogen, San Diego, Calif., U.S.A. (the MaxBat™ kit), and such methods are well known in the art, as described in Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), incorporated herein by reference. As used herein, an insect cell capable of expressing a polynucleotide of the present invention is "transformed."

The protein of the invention may be prepared by culturing transformed host cells under culture conditions suitable to express the recombinant protein. The resulting expressed protein may then be purified from such culture (*i.e.*, from culture medium or cell extracts) using known purification processes, such as gel filtration and ion exchange chromatography. The purification of the protein may also include an affinity column containing agents which will bind to the protein; one or more column steps over such affinity resins as concanavalin A-agarose, heparin-toyopearl™ or Cibacrom blue 3GA Sepharose™; one or more steps involving hydrophobic interaction chromatography using such resins as phenyl ether, butyl ether, or propyl ether; or immunoaffinity chromatography.

Alternatively, the protein of the invention may also be expressed in a form which will facilitate purification. For example, it may be expressed as a fusion protein, such as those of maltose-binding protein (MBP), glutathione-S-transferase (GST) or thioredoxin (TRX), or as a His tag. Kits for expression and purification of such fusion proteins are commercially available from New England BioLab (Beverly, Mass.), Pharmacia (Piscataway, N.J.) and Invitrogen, respectively. The protein can also be tagged with an epitope and subsequently purified by using a specific antibody directed to such epitope. One such epitope ("FLAG®") is commercially available from Kodak (New Haven, Conn.).

Finally, one or more reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) steps employing hydrophobic RP-HPLC media, *e.g.*, silica gel having pendant methyl or other aliphatic groups, can be employed to further purify the protein. Some or all of the foregoing purification steps, in various combinations, can also be employed to provide a substantially homogeneous isolated recombinant protein. The protein thus

purified is substantially free of other mammalian proteins and is defined in accordance with the present invention as an "isolated protein."

The polypeptides of the invention include analogs (variants). The polypeptides of the invention include stem cell growth factor-like analogs. This embraces fragments of stem cell growth factor-like polypeptide of the invention, as well stem cell growth factor-like polypeptides which comprise one or more amino acids deleted, inserted, or substituted. Also, analogs of the stem cell growth factor-like polypeptide of the invention embrace fusions of the stem cell growth factor-like polypeptides or modifications of the stem cell growth factor-like polypeptides, wherein the stem cell growth factor-like polypeptide or analog is fused to another moiety or moieties, e.g., targeting moiety or another therapeutic agent. Such analogs may exhibit improved properties such as activity and/or stability. Examples of moieties which may be fused to the stem cell growth factor-like polypeptide or an analog include, for example, targeting moieties which provide for the delivery of polypeptide to neurons, e.g., antibodies to central nervous system, or antibodies to receptor and ligands expressed on neuronal cells. Other moieties which may be fused to stem cell growth factor-like polypeptide include therapeutic agents which are used for treatment, for example anti-depressant drugs or other medications for neurological disorders. Also, stem cell growth factor-like polypeptides may be fused to neuron growth modulators, and other chemokines for targeted delivery.

4.4.1 DETERMINING POLYPEPTIDE AND POLYNUCLEOTIDE IDENTITY AND SIMILARITY

Preferred identity and/or similarity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are codified in computer programs including, but are not limited to, the GCG program package, including GAP [Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984); Genetics Computer Group; University of Wisconsin, Madison, WI], BLASTP, BLASTN, BLASTX, FASTA [Altschul, S.F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)], PSI-BLAST [Altschul S.F. et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, herein incorporated by reference], the eMatrix software [Wu et al., *J. Comp. Biol.*, 6:219-235 (1999), herein incorporated by reference], eMotif software [Nevill-Manning et al, *ISMB-97*, 4: 202-209, herein incorporated by reference], the GeneAtlas software Molecular Simulations Inc.

(MSD, San Diego, CA) [Sanchez and Sali, Proc. Natl. Acad. Sci., 95:13597-13602 (1998); Kitson DH et al, (2000) "Remote homology detection using structural modeling – an evaluation" Submitted; Fischer and Eisenberg, Protein Sci., 5:947-955 (1996)], and the Kyte-Doolittle hydrophobicity prediction algorithm [J. Mol Biol, 157:105-31 (1982), incorporated herein by reference]. The BLAST programs are publicly available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and other sources [BLAST Manual, Altschul, S., et al. NCB NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)].

4.5 GENE THERAPY

Mutations in the polynucleotides of the invention gene may result in loss of normal function of the encoded protein. The invention thus provides gene therapy to restore normal activity of the polypeptides of the invention; or to treat disease states involving polypeptides of the invention. Delivery of a functional gene encoding polypeptides of the invention to appropriate cells is effected *ex vivo*, *in situ*, or *in vivo* by use of vectors, and more particularly viral vectors (e.g., adenovirus, adeno-associated virus, or a retrovirus), or *ex vivo* by use of physical DNA transfer methods (e.g., liposomes or chemical treatments). See, for example, Anderson, Nature, (Suppl.) 392(6679):25-20 (1998). For additional reviews of gene therapy technology see Friedmann, Science, 244:1275-1281 (1989); Verma, Scientific American: 68-84 (1990); and Miller, Nature, 357:455-460 (1992). Introduction of any one of the nucleotides of the present invention or a gene encoding the polypeptides of the present invention can also be accomplished with extrachromosomal substrates (transient expression) or artificial chromosomes (stable expression). Cells may also be cultured *ex vivo* in the presence of proteins of the present invention in order to proliferate or to produce a desired effect on or activity in such cells. Treated cells can then be introduced *in vivo* for therapeutic purposes. Alternatively, it is contemplated that in other human disease states, preventing the expression of or inhibiting the activity of polypeptides of the invention will be useful in treating the disease states. It is contemplated that antisense therapy or gene therapy could be applied to negatively regulate the expression of polypeptides of the invention.

Other methods inhibiting expression of a protein include the introduction of antisense molecules to the nucleic acids of the present invention, their complements, or their translated RNA sequences, by methods known in the art. Further, the polypeptides of the present invention can be inhibited by using targeted deletion methods, or the insertion of a negative regulatory element such as a silencer, which is tissue specific.

The present invention still further provides cells genetically engineered *in vivo* to express the polynucleotides of the invention, wherein such polynucleotides are in operative association with a regulatory sequence heterologous to the host cell which drives expression of the polynucleotides in the cell. These methods can be used to increase or decrease the expression of the polynucleotides of the present invention.

Knowledge of DNA sequences provided by the invention allows for modification of cells to permit, increase, or decrease, expression of endogenous polypeptide. Cells can be modified (e.g., by homologous recombination) to provide increased polypeptide expression, by replacing, in whole or in part, the naturally occurring promoter with all or part of a heterologous promoter so that the cells express the protein at higher levels. The heterologous promoter is inserted in such a manner that it is operatively linked to the desired protein encoding sequences. See, for example, PCT International Publication No. WO 94/12650, PCT International Publication No. WO 92/20808, and PCT International Publication No. WO 91/09955. It is also contemplated that, in addition to heterologous promoter DNA, amplifiable marker DNA (e.g., *ada*, *dhfr*, and the multifunctional CAD gene which encodes carbamyl phosphate synthase, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase) and/or intron DNA may be inserted along with the heterologous promoter DNA. If linked to the desired protein coding sequence, amplification of the marker DNA by standard selection methods results in co-amplification of the desired protein coding sequences in the cells.

In another embodiment of the present invention, cells and tissues may be engineered to express an endogenous gene comprising the polynucleotides of the invention under the control of inducible regulatory elements, in which case the regulatory sequences of the endogenous gene may be replaced by homologous recombination. As described herein, gene targeting can be used to replace a gene's existing regulatory region with a regulatory sequence isolated from a different gene or a novel regulatory sequence synthesized by genetic engineering methods. Such regulatory sequences may be comprised of promoters, enhancers, scaffold-attachment regions, negative regulatory elements, transcriptional

initiation sites, regulatory protein binding sites or combinations of said sequences. Alternatively, sequences which affect the structure or stability of the RNA or protein produced may be replaced, removed, added, or otherwise modified by targeting. These sequences include polyadenylation signals, mRNA stability elements, splice sites, leader sequences for enhancing or modifying transport or secretion properties of the protein, or other sequences which alter or improve the function or stability of protein or RNA molecules.

The targeting event may be a simple insertion of the regulatory sequence, placing the gene under the control of the new regulatory sequence, *e.g.*, inserting a new promoter or enhancer or both upstream of a gene. Alternatively, the targeting event may be a simple deletion of a regulatory element, such as the deletion of a tissue-specific negative regulatory element. Alternatively, the targeting event may replace an existing element; for example, a tissue-specific enhancer can be replaced by an enhancer that has broader or different cell-type specificity than the naturally occurring elements. Here, the naturally occurring sequences are deleted and new sequences are added. In all cases, the identification of the targeting event may be facilitated by the use of one or more selectable marker genes that are contiguous with the targeting DNA, allowing for the selection of cells in which the exogenous DNA has integrated into the cell genome. The identification of the targeting event may also be facilitated by the use of one or more marker genes exhibiting the property of negative selection, such that the negatively selectable marker is linked to the exogenous DNA, but configured such that the negatively selectable marker flanks the targeting sequence, and such that a correct homologous recombination event with sequences in the host cell genome does not result in the stable integration of the negatively selectable marker. Markers useful for this purpose include the Herpes Simplex Virus thymidine kinase (TK) gene or the bacterial xanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (*gpt*) gene.

The gene targeting or gene activation techniques which can be used in accordance with this aspect of the invention are more particularly described in U.S. Patent No. 5,272,071 to Chappell; U.S. Patent No. 5,578,461 to Sherwin et al.; International Application No. PCT/US92/09627 (WO93/09222) by Selden et al.; and International Application No. PCT/US90/06436 (WO91/06667) by Skoultschi et al., each of which is incorporated by reference herein in its entirety.

4.6 TRANSGENIC ANIMALS

In preferred methods to determine biological functions of the polypeptides of the invention *in vivo*, one or more genes provided by the invention are either over expressed or inactivated in the germ line of animals using homologous recombination [Capecchi, Science 244:1288-1292 (1989)]. Animals in which the gene is over expressed, under the regulatory control of exogenous or endogenous promoter elements, are known as transgenic animals. Animals in which an endogenous gene has been inactivated by homologous recombination are referred to as "knockout" animals. Knockout animals, preferably non-human mammals, can be prepared as described in U.S. Patent No. 5,557,032, incorporated herein by reference. Transgenic animals are useful to determine the roles polypeptides of the invention play in biological processes, and preferably in disease states. Transgenic animals are useful as model systems to identify compounds that modulate lipid metabolism. Transgenic animals, preferably non-human mammals, are produced using methods as described in U.S. Patent No 5,489,743 and PCT Publication No. WO94/28122, incorporated herein by reference.

Transgenic animals can be prepared wherein all or part of a promoter of the polynucleotides of the invention is either activated or inactivated to alter the level of expression of the polypeptides of the invention. Inactivation can be carried out using homologous recombination methods described above. Activation can be achieved by supplementing or even replacing the homologous promoter to provide for increased protein expression. The homologous promoter can be supplemented by insertion of one or more heterologous enhancer elements known to confer promoter activation in a particular tissue.

The polynucleotides of the present invention also make possible the development, through, e.g., homologous recombination or knock out strategies; of animals that fail to express functional stem cell growth factor-like polypeptide or that express a variant of stem cell growth factor-like polypeptide. Such animals are useful as models for studying the *in vivo* activities of stem cell growth factor-like polypeptide as well as for studying modulators of the stem cell growth factor-like polypeptide.

In preferred methods to determine biological functions of the polypeptides of the invention *in vivo*, one or more genes provided by the invention are either over expressed or inactivated in the germ line of animals using homologous recombination [Capecchi, Science, 244:1288-1292 (1989)]. Animals in which the gene is over expressed, under the regulatory control of exogenous or endogenous promoter elements, are known as transgenic animals.

Animals in which an endogenous gene has been inactivated by homologous recombination are referred to as "knockout" animals. Knockout animals, preferably non-human mammals, can be prepared as described in U.S. Patent No. 5,557,032, incorporated herein by reference. Transgenic animals are useful to determine the roles polypeptides of the invention play in biological processes, and preferably in disease states. Transgenic animals are useful as model systems to identify compounds that modulate lipid metabolism. Transgenic animals, preferably non-human mammals, are produced using methods as described in U.S. Patent No. 5,489,743 and PCT Publication No. WO94/28122, incorporated herein by reference.

Transgenic animals can be prepared wherein all or part of the polynucleotides of the invention promoter is either activated or inactivated to alter the level of expression of the polypeptides of the invention. Inactivation can be carried out using homologous recombination methods described above. Activation can be achieved by supplementing or even replacing the homologous promoter to provide for increased protein expression. The homologous promoter can be supplemented by insertion of one or more heterologous enhancer elements known to confer promoter activation in a particular tissue.

4.7 USES AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF HUMAN STEM CELL GROWTH FACTOR-LIKE POLYPEPTIDE

Polypeptides of the invention having stem cell growth factor-like activity are useful for, but not limited to, cell growth and morphogenesis, including hematopoietic stem cell growth, epithelial cell growth and regulation, ovarian follicle development, promoting nerve cell growth, sustaining neuronal populations, cartilage remodeling, wound repair, immunosuppression, and vascular remodeling. The polypeptides of the invention can therefore be employed in, but not limited to, the prophylaxis or treatment of disorders and diseases caused by or involving wound healing, growth and development, regulation of cartilage growth and development, vascular remodeling (angiogenesis), immunosuppression, follicle growth and development and neurite growth and development. Polypeptides of the invention can also be used in the production of and maintenance of transplants or epidermal grafts.

The polynucleotides and proteins of the present invention are expected to exhibit one or more of the uses or biological activities (including those associated with assays cited herein) identified herein. Uses or activities described for proteins of the present invention

may be provided by administration or use of such proteins or of polynucleotides encoding such proteins (such as, for example, in gene therapies or vectors suitable for introduction of DNA). The mechanism underlying the particular condition or pathology will dictate whether the polypeptides of the invention, the polynucleotides of the invention or modulators (activators or inhibitors) thereof would be beneficial to the subject in need of treatment. Thus, "therapeutic compositions of the invention" include compositions comprising isolated polynucleotides (including recombinant DNA molecules, cloned genes and degenerate variants thereof) or polypeptides of the invention (including full length protein, mature protein and truncations or domains thereof), or compounds and other substances that modulate the overall activity of the target gene products, either at the level of target gene/protein expression or target protein activity. Such modulators include polypeptides, analogs, (variants), including fragments and fusion proteins, antibodies and other binding proteins; chemical compounds that directly or indirectly activate or inhibit the polypeptides of the invention (identified, e.g., via drug screening assays as described herein); antisense polynucleotides and polynucleotides suitable for triple helix formation; and in particular antibodies or other binding partners that specifically recognize one or more epitopes of the polypeptides of the invention.

The polypeptides of the present invention may likewise be involved in cellular activation or in one of the other physiological pathways described herein.

4.7.1 RESEARCH USES AND UTILITIES

The polynucleotides provided by the present invention can be used by the research community for various purposes. The polynucleotides can be used to express recombinant protein for analysis, characterization or therapeutic use; as markers for tissues in which the corresponding protein is preferentially expressed (either constitutively or at a particular stage of tissue differentiation or development or in disease states); as molecular weight markers on gels; as chromosome markers or tags (when labeled) to identify chromosomes or to map related gene positions; to compare with endogenous DNA sequences in patients to identify potential genetic disorders; as probes to hybridize and thus discover novel, related DNA sequences; as a source of information to derive PCR primers for genetic fingerprinting; as a probe to "subtract-out" known sequences in the process of discovering other novel polynucleotides; for selecting and making oligomers for attachment to a "gene chip" or other

support, including for examination of expression patterns; to raise anti-protein antibodies using DNA immunization techniques; and as an antigen to raise anti-DNA antibodies or elicit another immune response. Where the polynucleotide encodes a protein which binds or potentially binds to another protein (such as, for example, in a receptor-ligand interaction), the polynucleotide can also be used in interaction trap assays [such as, for example, that described in Gyuris et al., *Cell*, 75:791-803 (1993)] to identify polynucleotides encoding the other protein with which binding occurs or to identify inhibitors of the binding interaction.

The polypeptides provided by the present invention can similarly be used in assays to determine biological activity, including in a panel of multiple proteins for high-throughput screening; to raise antibodies or to elicit another immune response; as a reagent (including the labeled reagent) in assays designed to quantitatively determine levels of the protein (or its receptor) in biological fluids; as markers for tissues in which the corresponding polypeptide is preferentially expressed (either constitutively or at a particular stage of tissue differentiation or development or in a disease state); and, of course, to isolate correlative receptors or ligands. Proteins involved in these binding interactions can also be used to screen for peptide or small molecule inhibitors or agonists of the binding interaction.

The polypeptides of the invention are also useful for making antibody substances that are specifically immunoreactive with stem cell growth factor-like proteins. Antibodies and portions thereof (e.g., Fab fragments) which bind to the polypeptides of the invention can be used to identify the presence of such polypeptides in a sample. Such determinations are carried out using any suitable immunoassay format, and any polypeptide of the invention that is specifically bound by the antibody can be employed as a positive control.

Any or all of these research utilities are capable of being developed into reagent grade or kit format for commercialization as research products.

Methods for performing the uses listed above are well known to those skilled in the art. References disclosing such methods include without limitation, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis eds., 1989, and *Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques*, Academic Press, Berger, S. L. and A. R. Kimmel eds., 1987.

4.7.2 CYTOKINE AND CELL PROLIFERATION/DIFFERENTIATION ACTIVITY

A polypeptide of the present invention may exhibit activity relating to cytokine, cell proliferation (either inducing or inhibiting) or cell differentiation (either inducing or inhibiting) activity or may induce production of other cytokines in certain cell populations. A polynucleotide of the invention can encode a polypeptide exhibiting such attributes. Many protein factors discovered to date, including all known cytokines, have exhibited activity in one or more factor-dependent cell proliferation assays, and hence the assays serve as a convenient confirmation of cytokine activity. The activity of therapeutic compositions of the present invention is evidenced by any one of a number of routine factor dependent cell proliferation assays for cell lines including, without limitation, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+(preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e, CMK, HUVEC, and Caco. Therapeutic compositions of the invention can be used in the following:

Assays for T-cell or thymocyte proliferation include without limitation those described in: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, *In Vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500 (1986); Bertagnolli et al., J. Immunol., 145:1706-1712 (1990); Bertagnolli et al., Cellular Immunology, 133:327-341 (1991); Bertagnolli et al., I. Immunol. 149:3778-3783 (1992); and Bowman et al., I. Immunol., 152:1756-1761 (1994).

Assays for cytokine production and/or proliferation of spleen cells, lymph node cells or thymocytes include, without limitation, those described in: Polyclonal T cell stimulation, Kruisbeek, A. M. and Shevach, E. M. In Current Protocols in Immunology. J. E. e.a. Coligan eds. Vol 1, pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto, 1994; and Measurement of mouse and human interleukin-g, Schreiber, R. D. In Current Protocols in Immunology. J. E. e.a. Coligan eds. Vol 1, pp. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto, 1994.

Assays for proliferation and differentiation of hematopoietic and lymphopoietic cells include, without limitation, those described in: Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4, Bottomly, K., Davis, L. S. and Lipsky, P. E. In Current Protocols in Immunology. J. E. e.a. Coligan eds. Vol 1, pp. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, Toronto, 1991; deVries et al., J. Exp. Med., 173:1205-1211 (1991); Moreau et al.,

Nature, 336:690-692 (1988); Greenberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:2931-2938 (1983); Measurement of mouse and human interleukin 6--Nordan, R. In Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol 1, pp. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto, 1991; Smith et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83:1857-1861 (1986); Measurement of human Interleukin 11--Bennett, F., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J. In Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol 1, pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, Toronto, 1991; Measurement of mouse and human Interleukin 9--Ciarletta, A., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J. In Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol 1, pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto, 1991.

Assays for T-cell clone responses to antigens (which will identify, among others, proteins that affect APC-T cell interactions as well as direct T-cell effects by measuring proliferation and cytokine production) include, without limitation, those described in: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, *In Vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function; Chapter 6, Cytokines and their cellular receptors; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Weinberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:6091-6095 (1980); Weinberger et al., Eur. J. Immun., 11:405-411 (1981); Takai et al., J. Immunol., 137:3494-3500 (1986); Takai et al., J. Immunol., 140:508-512 (1988).

4.7.3 STEM CELL GROWTH FACTOR ACTIVITY

A polypeptide of the present invention may exhibit stem cell growth factor activity and be involved in the proliferation, differentiation and survival of pluripotent and totipotent stem cells including primordial germ cells, embryonic stem cells, hematopoietic stem cells and/or germ line stem cells. Administration of the polypeptide of the invention to stem cells *in vivo* or *ex vivo* may maintain and expand cell populations in a totipotent or pluripotent state which would be useful for re-engineering damaged or diseased tissues, transplantation, manufacture of bio-pharmaceuticals and the development of bio-sensors. The ability to produce large quantities of human cells has important working applications for the production of human proteins which currently must be obtained from non-human sources or donors, implantation of cells to treat diseases such as Parkinson's, Alzheimer's and other neurodegenerative diseases; tissues for grafting such as bone marrow, skin, cartilage, tendons, bone, muscle (including cardiac muscle), blood vessels, cornea, neural cells,

gastrointestinal cells and others; and organs for transplantation such as kidney, liver, pancreas (including islet cells), heart and lung.

It is contemplated that multiple different exogenous growth factors and/or cytokines may be administered in combination with the polypeptide of the invention to achieve the desired effect, including any of the growth factors listed herein, other stem cell maintenance factors, and specifically including stem cell factor (SCF), leukemia inhibitory factor (LIF), Flt-3 ligand (Flt-3L), any of the interleukins, recombinant soluble IL-6 receptor fused to IL-6, macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1-alpha), G-CSF, GM-CSF, thrombopoietin (TPO), platelet factor 4 (PF-4), platelet-derived growth factor (PDGF), neural growth factors and basic fibroblast growth factor (bFGF).

Since totipotent stem cells can give rise to virtually any mature cell type, expansion of these cells in culture will facilitate the production of large quantities of mature cells. Techniques for culturing stem cells are known in the art and administration of polypeptides of the invention, optionally with other growth factors and/or cytokines, is expected to enhance the survival and proliferation of the stem cell populations. This can be accomplished by direct administration of the polypeptide of the invention to the culture medium. Alternatively, stroma cells transfected with a polynucleotide that encodes for the polypeptide of the invention can be used as a feeder layer for the stem cell populations in culture or in vivo. Stromal support cells for feeder layers may include embryonic bone marrow fibroblasts, bone marrow stromal cells, fetal liver cells, or cultured embryonic fibroblasts (see U.S. Patent No. 5,690,926).

Stem cells themselves can be transfected with a polynucleotide of the invention to induce autocrine expression of the polypeptide of the invention. This will allow for generation of undifferentiated totipotent/pluripotent stem cell lines that are useful as is or that can then be differentiated into the desired mature cell types. These stable cell lines can also serve as a source of undifferentiated totipotent/pluripotent mRNA to create cDNA libraries and templates for polymerase chain reaction experiments. These studies would allow for the isolation and identification of differentially expressed genes in stem cell populations that regulate stem cell proliferation and/or maintenance.

Expansion and maintenance of totipotent stem cell populations will be useful in the treatment of many pathological conditions. For example, polypeptides of the present invention may be used to manipulate stem cells in culture to give rise to neuroepithelial cells

that can be used to augment or replace cells damaged by illness, autoimmune disease, accidental damage or genetic disorders. The polypeptide of the invention may be useful for inducing the proliferation of neural cells and for the regeneration of nerve and brain tissue, i.e. for the treatment of central and peripheral nervous system diseases and neuropathies, as well as mechanical and traumatic disorders which involve degeneration, death or trauma to neural cells or nerve tissue. Furthermore, these cells can be cultured *in vitro* to form other differentiated cells, such as skin tissue that can be used for transplantation. In addition, the expanded stem cell populations can also be genetically altered for gene therapy purposes and to decrease host rejection of replacement tissues after grafting or implantation.

Expression of the polypeptide of the invention and its effect on stem cells can also be manipulated to achieve controlled differentiation of the stem cells into more differentiated cell types. A broadly applicable method of obtaining pure populations of a specific differentiated cell type from undifferentiated stem cell populations involves the use of a cell-type specific promoter driving a selectable marker. The selectable marker allows only cells of the desired type to survive. For example, stem cells can be induced to differentiate into cardiomyocytes [Wobus et al., *Differentiation*, 48:173-182, (1991); Klug et al., *J. Clin. Invest.*, 98(1):216-224, (1998)] or skeletal muscle cells [Browder, L. W. In: *Principles of Tissue Engineering eds.* Lanza et al., Academic Press (1997)]. Alternatively, directed differentiation of stem cells can be accomplished by culturing the stem cells in the presence of a differentiation factor such as retinoic acid and an antagonist of the polypeptide of the invention which would inhibit the effects of endogenous stem cell factor activity and allow differentiation to proceed.

In vitro cultures of stem cells can be used to determine if the polypeptide of the invention exhibits stem cell growth factor activity. Stem cells are isolated from any one of various cell sources (including hematopoietic stem cells and embryonic stem cells) and cultured on a feeder layer, as described by Thompson et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92:7844-7848 (1995), in the presence of the polypeptide of the invention alone or in combination with other growth factors or cytokines. The ability of the polypeptide of the invention to induce stem cells proliferation is determined by colony formation on semi-solid support e.g. as described by Bernstein et al., *Blood*, 77:2316-2321(1991).

4.7.4 HEMATOPOIESIS REGULATING ACTIVITY

A polypeptide of the present invention may be involved in regulation of hematopoiesis and, consequently, in the treatment of myeloid or lymphoid cell disorders. Even marginal biological activity in support of colony forming cells or of factor-dependent cell lines indicates involvement in regulating hematopoiesis, e.g. in supporting the growth and proliferation of erythroid progenitor cells alone or in combination with other cytokines, thereby indicating utility, for example, in treating various anemias or for use in conjunction with irradiation/chemotherapy to stimulate the production of erythroid precursors and/or erythroid cells; in supporting the growth and proliferation of myeloid cells such as granulocytes and monocytes/macrophages (i.e., traditional colony stimulating factor activity) useful, for example, in conjunction with chemotherapy to prevent or treat consequent myelo-suppression; in supporting the growth and proliferation of megakaryocytes and consequently of platelets thereby allowing prevention or treatment of various platelet disorders such as thrombocytopenia, and generally for use in place of or complementary to platelet transfusions; and/or in supporting the growth and proliferation of hematopoietic stem cells which are capable of maturing to any and all of the above-mentioned hematopoietic cells and therefore find therapeutic utility in various stem cell disorders (such as those usually treated with transplantation, including, without limitation, aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria), as well as in repopulating the stem cell compartment post irradiation/chemotherapy, either *in-vivo* or *ex-vivo* (i.e., in conjunction with bone marrow transplantation or with peripheral progenitor cell transplantation (homologous or heterologous)) as normal cells or genetically manipulated for gene therapy.

Therapeutic compositions of the invention can be used in the following:

Suitable assays for proliferation and differentiation of various hematopoietic lines are cited above.

Assays for embryonic stem cell differentiation (which will identify, among others, proteins that influence embryonic differentiation hematopoiesis) include, without limitation, those described in: Johansson et al., *Cellular Biology*, 15:141-151, 1995; Keller et al., *Molecular and Cellular Biology* 13:473-486 (1993); McClanahan et al., *Blood* 81:2903-2915 (1993).

Assays for stem cell survival and differentiation (which will identify, among others, proteins that regulate lympho-hematopoiesis) include, without limitation, those described in: Methylcellulose colony forming assays, Freshney, M. G. In *Culture of Hematopoietic Cells*. R. I. Freshney, et al. eds. Vol pp. 265-268, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y., 1994; Hirayama et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5907-5911 (1992); Primitive hematopoietic colony forming cells with high proliferative potential, McNiece, I. K. and Briddell, R. A. In *Culture of Hematopoietic Cells*. R. I. Freshney, et al. eds. Vol pp. 23-39, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y., 1994; Neben et al., *Experimental Hematology* 22:353-359 (1994); Cobblestone area forming cell assay, Ploemacher, R. E. In *Culture of Hematopoietic Cells*. R. I. Freshney, et al. eds. Vol pp. 1-21, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y., 1994; Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells, Spooncer, E., Dexter, M. and Allen, T. In *Culture of Hematopoietic Cells*. R. I. Freshney, et al. eds. Vol pp. 163-179, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y., 1994; Long term culture initiating cell assay, Sutherland, H. J. In *Culture of Hematopoietic Cells*. R. I. Freshney, et al. eds. Vol pp. 139-162, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y., 1994.

4.7.5 TISSUE GROWTH ACTIVITY

A polypeptide of the present invention also may be involved in bone, cartilage, tendon, ligament and/or nerve tissue growth or regeneration, as well as in wound healing and tissue repair and replacement, and in healing of burns, incisions and ulcers.

A polypeptide of the present invention which induces cartilage and/or bone growth in circumstances where bone is not normally formed, has application in the healing of bone fractures and cartilage damage or defects in humans and other animals. Compositions of a polypeptide, antibody, binding partner, or other modulator of the invention may have prophylactic use in closed as well as open fracture reduction and also in the improved fixation of artificial joints. De novo bone formation induced by an osteogenic agent contributes to the repair of congenital, trauma induced, or oncologic resection induced craniofacial defects, and also is useful in cosmetic plastic surgery.

A polypeptide of this invention may also be involved in attracting bone-forming cells, stimulating growth of bone-forming cells, or inducing differentiation of progenitors of bone-forming cells. Treatment of osteoporosis, osteoarthritis, bone degenerative disorders, or periodontal disease, such as through stimulation of bone and/or cartilage repair or by

blocking inflammation or processes of tissue destruction (collagenase activity, osteoclast activity, etc.) mediated by inflammatory processes may also be possible using the composition of the invention.

Another category of tissue regeneration activity that may involve the polypeptide of the present invention is tendon/ligament formation. Induction of tendon/ligament-like tissue or other tissue formation in circumstances where such tissue is not normally formed, has application in the healing of tendon or ligament tears, deformities and other tendon or ligament defects in humans and other animals. Such a preparation employing a tendon/ligament-like tissue inducing protein may have prophylactic use in preventing damage to tendon or ligament tissue, as well as use in the improved fixation of tendon or ligament to bone or other tissues, and in repairing defects to tendon or ligament tissue. De novo tendon/ligament-like tissue formation induced by a composition of the present invention contributes to the repair of congenital, trauma induced, or other tendon or ligament defects of other origin, and is also useful in cosmetic plastic surgery for attachment or repair of tendons or ligaments. The compositions of the present invention may provide environment to attract tendon- or ligament-forming cells, stimulate growth of tendon- or ligament-forming cells, induce differentiation of progenitors of tendon- or ligament-forming cells, or induce growth of tendon/ligament cells or progenitors *ex vivo* for return *in vivo* to effect tissue repair. The compositions of the invention may also be useful in the treatment of tendinitis, carpal tunnel syndrome and other tendon or ligament defects. The compositions may also include an appropriate matrix and/or sequestering agent as a carrier as is well known in the art.

The compositions of the present invention may also be useful for proliferation of neural cells and for regeneration of nerve and brain tissue, i.e. for the treatment of central and peripheral nervous system diseases and neuropathies, as well as mechanical and traumatic disorders, which involve degeneration, death or trauma to neural cells or nerve tissue. More specifically, a composition may be used in the treatment of diseases of the peripheral nervous system, such as peripheral nerve injuries, peripheral neuropathy and localized neuropathies, and central nervous system diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's disease, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and Shy-Drager syndrome. Further conditions which may be treated in accordance with the present invention include mechanical and traumatic disorders, such as spinal cord disorders, head trauma and

cerebrovascular diseases such as stroke. Peripheral neuropathies resulting from chemotherapy or other medical therapies may also be treatable using a composition of the invention.

Compositions of the invention may also be useful to promote better or faster closure of non-healing wounds, including without limitation pressure ulcers, ulcers associated with vascular insufficiency, surgical and traumatic wounds, and the like.

Compositions of the present invention may also be involved in the generation or regeneration of other tissues, such as organs (including, for example, pancreas, liver, intestine, kidney, skin, endothelium), muscle (smooth, skeletal or cardiac) and vascular (including vascular endothelium) tissue, or for promoting the growth of cells comprising such tissues. Part of the desired effects may be by inhibition or modulation of fibrotic scarring may allow normal tissue to regenerate. A polypeptide of the present invention may also exhibit angiogenic activity.

A composition of the present invention may also be useful for gut protection or regeneration and treatment of lung or liver fibrosis, reperfusion injury in various tissues, and conditions resulting from systemic cytokine damage.

A composition of the present invention may also be useful for promoting or inhibiting differentiation of tissues described above from precursor tissues or cells; or for inhibiting the growth of tissues described above.

Therapeutic compositions of the invention can be used in the following:

Assays for tissue generation activity include, without limitation, those described in: International Patent Publication No. WO95/16035 (bone, cartilage, tendon); International Patent Publication No. WO95/05846 (nerve, neuronal); International Patent Publication No. WO91/07491 (skin, endothelium).

Assays for wound healing activity include, without limitation, those described in: Winter, Epidermal Wound Healing, pp. 71-112 (Maibach, H. I. and Rovee, D. T., eds.), Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, as modified by Eaglstein and Mertz, J. Invest. Dermatol, 71:382-84 (1978).

4.7.6 IMMUNE FUNCTION STIMULATING OR SUPPRESSING ACTIVITY

A polypeptide of the present invention may also exhibit immune stimulating or immune suppressing activity, including without limitation the activities for which assays are

described herein. A polynucleotide of the invention can encode a polypeptide exhibiting such activities. A protein may be useful in the treatment of various immune deficiencies and disorders (including severe combined immunodeficiency (SCID)), e.g., in regulating (up or down) growth and proliferation of T and/or B lymphocytes, as well as effecting the cytolytic activity of NK cells and other cell populations. These immune deficiencies may be genetic or be caused by viral (e.g., HIV) as well as bacterial or fungal infections, or may result from autoimmune disorders. More specifically, infectious diseases caused by viral, bacterial, fungal or other infection may be treatable using a protein of the present invention, including infections by HIV, hepatitis viruses, herpes viruses, mycobacteria, *Leishmania* spp., malaria spp. and various fungal infections such as candidiasis. Of course, in this regard, proteins of the present invention may also be useful where a boost to the immune system generally may be desirable, i.e., in the treatment of cancer.

Autoimmune disorders which may be treated using a protein of the present invention include, for example, connective tissue disease, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, autoimmune pulmonary inflammation, Guillain-Barre syndrome, autoimmune thyroiditis, insulin dependent diabetes mellitus, myasthenia gravis, graft-versus-host disease and autoimmune inflammatory eye disease. Such a protein (or antagonists thereof, including antibodies) of the present invention may also be useful in the treatment of allergic reactions and conditions (e.g., anaphylaxis, serum sickness, drug reactions, food allergies, insect venom allergies, mastocytosis, allergic rhinitis, hypersensitivity pneumonitis, urticaria, angioedema, eczema, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis, erythema multiforme, Stevens-Johnson syndrome, allergic conjunctivitis, atopic keratoconjunctivitis, venereal keratoconjunctivitis, giant papillary conjunctivitis and contact allergies), such as asthma (particularly allergic asthma) or other respiratory problems. Other conditions, in which immune suppression is desired (including, for example, organ transplantation), may also be treatable using a protein (or antagonists thereof) of the present invention. The therapeutic effects of the polypeptides or antagonists thereof on allergic reactions can be evaluated by in vivo animals models such as the cumulative contact enhancement test (Lastbom et al., *Toxicology*, 125:59-66 (1998)), skin prick test (Hoffmann et al., *Allergy*, 54: 446-54 (1999)), guinea pig skin sensitization test (Vohr et al., *Arch. Toxicol.*, 73:501-9), and murine local lymph node assay (Kimber et al., *J. Toxicol. Environ. Health*, 53:563-79).

Using the proteins of the invention it may also be possible to modulate immune responses, in a number of ways. Down regulation may be in the form of inhibiting or blocking an immune response already in progress or may involve preventing the induction of an immune response. The functions of activated T cells may be inhibited by suppressing T cell responses or by inducing specific tolerance in T cells, or both. Immunosuppression of T cell responses is generally an active, non-antigen-specific, process which requires continuous exposure of the T cells to the suppressive agent. Tolerance, which involves inducing non-responsiveness or anergy in T cells, is distinguishable from immunosuppression in that it is generally antigen-specific and persists after exposure to the tolerizing agent has ceased. Operationally, tolerance can be demonstrated by the lack of a T cell response upon reexposure to specific antigen in the absence of the tolerizing agent.

Down regulating or preventing one or more antigen functions (including without limitation B lymphocyte antigen functions (such as, for example, B7)), e.g., preventing high level lymphokine synthesis by activated T cells, will be useful in situations of tissue, skin and organ transplantation and in graft-versus-host disease (GVHD). For example, blockage of T cell function should result in reduced tissue destruction in tissue transplantation. Typically, in tissue transplants, rejection of the transplant is initiated through its recognition as foreign by T cells, followed by an immune reaction that destroys the transplant. The administration of a therapeutic composition of the invention may prevent cytokine synthesis by immune cells, such as T cells, and thus acts as an immunosuppressant. Moreover, a lack of costimulation may also be sufficient to anergize the T cells, thereby inducing tolerance in a subject. Induction of long-term tolerance by B lymphocyte antigen-blocking reagents may avoid the necessity of repeated administration of these blocking reagents. To achieve sufficient immunosuppression or tolerance in a subject, it may also be necessary to block the function of a combination of B lymphocyte antigens.

The efficacy of particular therapeutic compositions in preventing organ transplant rejection or GVHD can be assessed using animal models that are predictive of efficacy in humans. Examples of appropriate systems which can be used include allogeneic cardiac grafts in rats and xenogeneic pancreatic islet cell grafts in mice, both of which have been used to examine the immunosuppressive effects of CTLA4Ig fusion proteins in vivo as described in Lenschow et al., *Science* 257:789-792 (1992) and Turka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89:11102-11105 (1992). In addition, murine models of GVHD [see Paul et al.,

Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 846-847] can be used to determine the effect of therapeutic compositions of the invention on the development of that disease.

Blocking antigen function may also be therapeutically useful for treating autoimmune diseases. Many autoimmune disorders are the result of inappropriate activation of T cells that are reactive against self tissue and which promote the production of cytokines and autoantibodies involved in the pathology of the diseases. Preventing the activation of autoreactive T cells may reduce or eliminate disease symptoms. Administration of reagents which block stimulation of T cells can be used to inhibit T cell activation and prevent production of autoantibodies or T cell-derived cytokines which may be involved in the disease process. Additionally, blocking reagents may induce antigen-specific tolerance of autoreactive T cells which could lead to long-term relief from the disease. The efficacy of blocking reagents in preventing or alleviating autoimmune disorders can be determined using a number of well-characterized animal models of human autoimmune diseases. Examples include murine experimental autoimmune encephalitis, systemic lupus erythematosus in MRL/lpr/lpr mice or NZB hybrid mice, murine autoimmune collagen arthritis, diabetes mellitus in NOD mice and BB rats, and murine experimental myasthenia gravis [see Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 840-856].

Upregulation of an antigen function (e.g., a B lymphocyte antigen function), as a means of up regulating immune responses, may also be useful in therapy. Upregulation of immune responses may be in the form of enhancing an existing immune response or eliciting an initial immune response. For example, enhancing an immune response may be useful in cases of viral infection, including systemic viral diseases such as influenza, the common cold, and encephalitis.

Alternatively, anti-viral immune responses may be enhanced in an infected patient by removing T cells from the patient, costimulating the T cells in vitro with viral antigen-pulsed APCs either expressing a peptide of the present invention or together with a stimulatory form of a soluble peptide of the present invention and reintroducing the in vitro activated T cells into the patient. Another method of enhancing anti-viral immune responses would be to isolate infected cells from a patient, transfect them with a nucleic acid encoding a protein of the present invention as described herein such that the cells express all or a

portion of the protein on their surface, and reintroduce the transfected cells into the patient. The infected cells would now be capable of delivering a costimulatory signal to, and thereby activate, T cells in vivo.

A polypeptide of the present invention may provide the necessary stimulation signal to T cells to induce a T cell mediated immune response against the transfected tumor cells. In addition, tumor cells which lack MHC class I or MHC class II molecules, or which fail to reexpress sufficient mounts of MHC class I or MHC class II molecules, can be transfected with nucleic acid encoding all or a portion of (e.g., a cytoplasmic-domain truncated portion) of an MHC class I alpha chain protein and b₂ microglobulin protein or an MHC class II alpha chain protein and an MHC class II beta chain protein to thereby express MHC class I or MHC class II proteins on the cell surface. Expression of the appropriate class I or class II MHC in conjunction with a peptide having the activity of a B lymphocyte antigen (e.g., B7-1, B7-2, B7-3) induces a T cell mediated immune response against the transfected tumor cell. Optionally, a gene encoding an antisense construct which blocks expression of an MHC class II associated protein, such as the invariant chain, can also be cotransfected with a DNA encoding a peptide having the activity of a B lymphocyte antigen to promote presentation of tumor associated antigens and induce tumor specific immunity. Thus, the induction of a T cell mediated immune response in a human subject may be sufficient to overcome tumor-specific tolerance in the subject.

The activity of a protein of the invention may, among other means, be measured by the following methods:

Suitable assays for thymocyte or splenocyte cytotoxicity include, without limitation, those described in: *Current Protocols in Immunology*, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Herrmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2488-2492 (1981); Herrmann et al., *J. Immunol.*, 128:1968-1974 (1982); Handa et al., *J. Immunol.*, 135:1564-1572 (1985); Takai et al., *J. Immunol.*, 137:3494-3500 (1986); Takai et al., *J. Immunol.*, 140:508-512 (1988); Bowman et al., *J. Virology*, 61:1992-1998; Bertagnolli et al., *Cellular Immunology*, 133:327-341 (1991); Brown et al., *J. Immunol.*, 153:3079-3092 (1994).

Assays for T-cell-dependent immunoglobulin responses and isotype switching (which will identify, among others, proteins that modulate T-cell dependent antibody responses and that affect Th1/Th2 profiles) include, without limitation, those described in: Maliszewski, J. *Immunol.* 144:3028-3033 (1990); and Assays for B cell function: In vitro antibody production, Mond, J. J. and Brunswick, M. In *Current Protocols in Immunology*. J. E. Coligan eds. Vol 1, pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto, 1994.

Mixed lymphocyte reaction (MLR) assays (which will identify, among others, proteins that generate predominantly Th1 and CTL responses) include, without limitation, those described in: *Current Protocols in Immunology*, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., *J. Immunol.*, 137:3494-3500 (1986); Takai et al., *J. Immunol.*, 140:508-512 (1988); Bertagnoli et al., *J. Immunol.*, 149:3778-3783 (1992).

Dendritic cell-dependent assays (which will identify, among others, proteins expressed by dendritic cells that activate naive T-cells) include, without limitation, those described in: Guery et al., *J. Immunol.* 134:536-544 (1995); Inaba et al., *Journal of Experimental Medicine*, 173:549-559 (1991); Macatonia et al., *Journal of Immunology*, 154:5071-5079 (1995); Porgador et al., *Journal of Experimental Medicine*, 182:255-260 (1995); Nair et al., *Journal of Virology*, 67:4062-4069 (1993); Huang et al., *Science*, 264:961-965 (1994); Macatonia et al., *Journal of Experimental Medicine* 169:1255-1264 (1989); Bhardwaj et al., *Journal of Clinical Investigation* 94:797-807 (1994); and Inaba et al., *Journal of Experimental Medicine*, 172:631-640 (1990).

Assays for lymphocyte survival/apoptosis (which will identify, among others, proteins that prevent apoptosis after superantigen induction and proteins that regulate lymphocyte homeostasis) include, without limitation, those described in: Darzynkiewicz et al., *Cytometry* 13:795-808 (1992); Gorczyca et al., *Leukemia*, 7:659-670 (1993); Gorczyca et al., *Cancer Research*, 53:1945-1951 (1993); Itoh et al., *Cell*, 66:233-243 (1991); Zacharchuk, *Journal of Immunology*, 145:4037-4045 (1990); Zamai et al., *Cytometry*, 14:891-897 (1993); Gorczyca et al., *International Journal of Oncology* 1:639-648 (1992).

Assays for proteins that influence early steps of T-cell commitment and development include, without limitation, those described in: Antica et al., *Blood*, 84:111-117 (1994); Fine

et al., *Cellular Immunology*, 155:111-122 (1994); Galy et al., *Blood*, 85:2770-2778 (1995); Toki et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88:7548-7551 (1991).

4.7.7 CHEMOTACTIC/CHEMOKINETIC ACTIVITY

A polypeptide of the present invention may be involved in chemotactic or chemokinetic activity for mammalian cells, including, for example, monocytes, fibroblasts, neutrophils, T-cells, mast cells, eosinophils, epithelial and/or endothelial cells. A polynucleotide of the invention can encode a polypeptide exhibiting such attributes. Chemotactic and chemokinetic receptor activation can be used to mobilize or attract a desired cell population to a desired site of action. Chemotactic or chemokinetic compositions (e.g. proteins, antibodies, binding partners, or modulators of the invention) provide particular advantages in treatment of wounds and other trauma to tissues, as well as in treatment of localized infections. For example, attraction of lymphocytes, monocytes or neutrophils to tumors or sites of infection may result in improved immune responses against the tumor or infecting agent.

A protein or peptide has chemotactic activity for a particular cell population if it can stimulate, directly or indirectly, the directed orientation or movement of such cell population. Preferably, the protein or peptide has the ability to directly stimulate directed movement of cells. Whether a particular protein has chemotactic activity for a population of cells can be readily determined by employing such protein or peptide in any known assay for cell chemotaxis.

Therapeutic compositions of the invention can be used in the following:

Assays for chemotactic activity (which will identify proteins that induce or prevent chemotaxis) consist of assays that measure the ability of a protein to induce the migration of cells across a membrane as well as the ability of a protein to induce the adhesion of one cell population to another cell population. Suitable assays for movement and adhesion include, without limitation, those described in: *Current Protocols in Immunology*, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 6.12, Measurement of alpha and beta Chemokines 6.12.1-6.12.28; Taub et al. *J. Clin. Invest.*, 95:1370-1376 (1995); Lind et al., *APMIS*, 103:140-146 (1995); Muller et al., *Eur. J. Immunol.*, 25:1744-1748; Gruber et al., *J. of Immunol.*, 152:5860-5867 (1994); Johnston et al. *J. of Immunol.*, 153:1762-1768 (1994).

4.7.8 HEMOSTATIC AND THROMBOLYTIC ACTIVITY

A polypeptide of the invention may also be involved in hemostasis or thrombolysis or thrombosis. A polynucleotide of the invention can encode a polypeptide exhibiting such attributes. Compositions may be useful in treatment of various coagulation disorders (including hereditary disorders, such as hemophilias) or to enhance coagulation and other hemostatic events in treating wounds resulting from trauma, surgery or other causes. A composition of the invention may also be useful for dissolving or inhibiting formation of thromboses and for treatment and prevention of conditions resulting therefrom (such as, for example, infarction of cardiac and central nervous system vessels (e.g., stroke).

Therapeutic compositions of the invention can be used in the following:

Assays for hemostatic and thrombolytic activity include, without limitation, those described in: Linet et al., *J. Clin. Pharmacol.*, 26:131-140 (1986); Burdick et al., *Thrombosis Res.*, 45:413-419 (1987); Humphrey et al., *Fibrinolysis*, 5:71-79 (1991); and Schaub, *Prostaglandins* 35:467-474 (1988).

4.7.9 CANCER DIAGNOSIS AND THERAPY

Polypeptides of the invention may be involved in cancer cell generation, proliferation or metastasis. Detection of the presence or amount of polynucleotides or polypeptides of the invention may be useful for the diagnosis and/or prognosis of one or more types of cancer. For example, the presence or increased expression of a polynucleotide/polypeptide of the invention may indicate a hereditary risk of cancer, a precancerous condition, or an ongoing malignancy. Conversely, a defect in the gene or absence of the polypeptide may be associated with a cancer condition. Identification of single nucleotide polymorphisms associated with cancer or a predisposition to cancer may also be useful for diagnosis or prognosis.

Cancer treatments promote tumor regression by inhibiting tumor cell proliferation, inhibiting angiogenesis (growth of new blood vessels that is necessary to support tumor growth) and/or prohibiting metastasis by reducing tumor cell motility or invasiveness. Therapeutic compositions of the invention may be effective in adult and pediatric oncology including in solid phase tumors/malignancies, locally advanced tumors, human soft tissue sarcomas, metastatic cancer, including lymphatic metastases, blood cell malignancies including multiple myeloma, acute and chronic leukemias, and lymphomas, head and neck

cancers including mouth cancer, larynx cancer and thyroid cancer, lung cancers including small cell carcinoma and non-small cell cancers, breast cancers including small cell carcinoma and ductal carcinoma, gastrointestinal cancers including esophageal cancer, stomach cancer, colon cancer, colorectal cancer and polyps associated with colorectal neoplasia, pancreatic cancers, liver cancer, urologic cancers including bladder cancer and prostate cancer, malignancies of the female genital tract including ovarian carcinoma, uterine (including endometrial) cancers, and solid tumor in the ovarian follicle, kidney cancers including renal cell carcinoma, brain cancers including intrinsic brain tumors, neuroblastoma, astrocytic brain tumors, gliomas, metastatic tumor cell invasion in the central nervous system, bone cancers including osteomas, skin cancers including malignant melanoma, tumor progression of human skin keratinocytes, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, hemangiopericytoma and Kaposi's sarcoma.

Polypeptides, polynucleotides, or modulators of polypeptides of the invention (including inhibitors and stimulators of the biological activity of the polypeptide of the invention) may be administered to treat cancer. Therapeutic compositions can be administered in therapeutically effective dosages alone or in combination with adjuvant cancer therapy such as surgery, chemotherapy, radiotherapy, thermotherapy, and laser therapy, and may provide a beneficial effect, e.g. reducing tumor size, slowing rate of tumor growth, inhibiting metastasis, or otherwise improving overall clinical condition, without necessarily eradicating the cancer.

The composition can also be administered in therapeutically effective amounts as a portion of an anti-cancer cocktail. An anti-cancer cocktail is a mixture of the polypeptide or modulator of the invention with one or more anti-cancer drugs in addition to a pharmaceutically acceptable carrier for delivery. The use of anti-cancer cocktails as a cancer treatment is routine. Anti-cancer drugs that are well known in the art and can be used as a treatment in combination with the polypeptide or modulator of the invention include: Actinomycin D, Aminoglutethimide, Asparaginase, Bleomycin, Busulfan, Carboplatin, Carmustine, Chlorambucil, Cisplatin (cis-DDP), Cyclophosphamide, Cytarabine HCl (Cytosine arabinoside), Dacarbazine, Dactinomycin, Daunorubicin HCl, Doxorubicin HCl, Estramustine phosphate sodium, Etoposide (V16-213), Floxuridine, 5-Fluorouracil (5-Fu), Flutamide, Hydroxyurea (hydroxycarbamide), Ifosfamide, Interferon Alpha-2a, Interferon Alpha-2b, Leuprolide acetate (LHRH-releasing factor analog), Lomustine, Mechlorethamine

HCl (nitrogen mustard), Melphalan, Mercaptopurine, Mesna, Methotrexate (MTX), Mitomycin, Mitoxantrone HCl, Octreotide, Plicamycin, Procarbazine HCl, Streptozocin, Tamoxifen citrate, Thioguanine, Thiotepa, Vinblastine sulfate, Vincristine sulfate, Amsacrine, Azacitidine, Hexamethylmelamine, Interleukin-2, Mitoguanzone, Pentostatin, Semustine, Teniposide, and Vindesine sulfate.

In addition, therapeutic compositions of the invention may be used for prophylactic treatment of cancer. There are hereditary conditions and/or environmental situations (e.g. exposure to carcinogens) known in the art that predispose an individual to developing cancers. Under these circumstances, it may be beneficial to treat these individuals with therapeutically effective doses of the polypeptide of the invention to reduce the risk of developing cancers.

In vitro models can be used to determine the effective doses of the polypeptide of the invention as a potential cancer treatment. These *in vitro* models include proliferation assays of cultured tumor cells, growth of cultured tumor cells in soft agar (see Freshney, (1987) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Wiley-Liss, New York, NY Ch 18 and Ch 21), tumor systems in nude mice as described in Giovanella et al., J. Natl. Can. Inst., 52:921-30 (1974), mobility and invasive potential of tumor cells in Boyden Chamber assays as described in Pilkington et al., Anticancer Res., 17:4107-9 (1997), and angiogenesis assays such as induction of vascularization of the chick chorioallantoic membrane or induction of vascular endothelial cell migration as described in Ribatta et al., Intl. J. Dev. Biol., 40:1189-97 (1999) and Li et al., Clin. Exp. Metastasis, 17:423-9 (1999), respectively. Suitable tumor cells lines are available, e.g. from American Type Tissue Culture Collection catalogs.

4.7.10 RECEPTOR/LIGAND ACTIVITY

A polypeptide of the present invention may also demonstrate activity as receptor, receptor ligand or inhibitor or agonist of receptor/ligand interactions. A polynucleotide of the invention can encode a polypeptide exhibiting such characteristics. Examples of such receptors and ligands include, without limitation, cytokine receptors and their ligands, receptor kinases and their ligands, receptor phosphatases and their ligands, receptors involved in cell-cell interactions and their ligands (including without limitation, cellular adhesion molecules (such as selectins, integrins and their ligands) and receptor/ligand pairs involved in antigen presentation, antigen recognition and development of cellular and

humoral immune responses. Receptors and ligands are also useful for screening of potential peptide or small molecule inhibitors of the relevant receptor/ligand interaction. A protein of the present invention (including, without limitation, fragments of receptors and ligands) may themselves be useful as inhibitors of receptor/ligand interactions.

The activity of a polypeptide of the invention may, among other means, be measured by the following methods:

Suitable assays for receptor-ligand activity include without limitation those described in: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 7.28, Measurement of Cellular Adhesion under static conditions 7.28.1- 7.28.22), Takai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:6864-6868 (1987); Bierer et al., J. Exp. Med., 168:1145-1156 (1988); Rosenstein et al., J. Exp. Med., 169:149-160 (1989); Stoltzenberg et al., J. Immunol. Methods, 175:59-68 (1994); Stitt et al., Cell, 80:661-670 (1995).

By way of example, the polypeptides of the invention may be used as a receptor for a ligand(s) thereby transmitting the biological activity of that ligand(s). Ligands may be identified through binding assays, affinity chromatography, dihybrid screening assays, BIAcore assays, gel overlay assays, or other methods known in the art.

Studies characterizing drugs or proteins as agonist or antagonist or partial agonists or a partial antagonist require the use of other proteins as competing ligands. The polypeptides of the present invention or ligand(s) thereof may be labeled by being coupled to radioisotopes, colorimetric molecules or a toxin molecules by conventional methods.

("Guide to Protein Purification" Murray P. Deutscher (ed) Methods in Enzymology Vol. 182 (1990) Academic Press, Inc. San Diego). Examples of radioisotopes include, but are not limited to, tritium and carbon-14. Examples of colorimetric molecules include, but are not limited to, fluorescent molecules such as fluorescamine, or rhodamine or other colorimetric molecules. Examples of toxins include, but are not limited, to ricin.

4.7.11 DRUG SCREENING

This invention is particularly useful for screening chemical compounds by using the novel polypeptides or binding fragments thereof in any of a variety of drug screening techniques. The polypeptides or fragments employed in such a test may either be free in

solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface or located intracellularly. One method of drug screening utilizes eukaryotic or prokaryotic host cells which are stably transformed with recombinant nucleic acids expressing the polypeptide or a fragment thereof. Drugs are screened against such transformed cells in competitive binding assays. Such cells, either in viable or fixed form, can be used for standard binding assays. One may measure, for example, the formation of complexes between polypeptides of the invention or fragments and the agent being tested or examine the diminution in complex formation between the novel polypeptides and an appropriate cell line, which are well known in the art.

Sources for test compounds that may be screened for ability to bind to or modulate (i.e., increase or decrease) the activity of polypeptides of the invention include (1) inorganic and organic chemical libraries, (2) natural product libraries, and (3) combinatorial libraries comprised of either random or mimetic peptides, oligonucleotides or organic molecules.

Chemical libraries may be readily synthesized or purchased from a number of commercial sources, and may include structural analogs of known compounds or compounds that are identified as "hits" or "leads" via natural product screening.

The sources of natural product libraries are microorganisms (including bacteria and fungi), animals, plants or other vegetation, or marine organisms, and libraries of mixtures for screening may be created by: (1) fermentation and extraction of broths from soil, plant or marine microorganisms or (2) extraction of the organisms themselves. Natural product libraries include polyketides, non-ribosomal peptides, and (non-naturally occurring) variants thereof. For a review, see *Science*, 282:63-68 (1998).

Combinatorial libraries are composed of large numbers of peptides, oligonucleotides or organic compounds and can be readily prepared by traditional automated synthesis methods, PCR, cloning or proprietary synthetic methods. Of particular interest are peptide and oligonucleotide combinatorial libraries. Still other libraries of interest include peptide, protein, peptidomimetic, multiparallel synthetic collection, recombinatorial, and polypeptide libraries. For a review of combinatorial chemistry and libraries created therefrom, see Myers, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8:701-707 (1997). For reviews and examples of peptidomimetic libraries, see Al-Obeidi et al., *Mol. Biotechnol.*, 9(3):205-23 (1998); Hruby et al., *Curr Opin Chem Biol*, 1(1):114-19 (1997); Dörner et al., *Bioorg Med Chem*, 4(5):709-15 (1996) (alkylated dipeptides).

Identification of modulators through use of the various libraries described herein permits modification of the candidate "hit" (or "lead") to optimize the capacity of the "hit" to bind a polypeptide of the invention. The molecules identified in the binding assay are then tested for antagonist or agonist activity in *in vivo* tissue culture or animal models that are well known in the art. In brief, the molecules are titrated into a plurality of cell cultures or animals and then tested for either cell/animal death or prolonged survival of the animal/cells.

The binding molecules thus identified may be complexed with toxins, e.g., ricin or cholera, or with other compounds that are toxic to cells such as radioisotopes. The toxin-binding molecule complex is then targeted to a tumor or other cell by the specificity of the binding molecule for a polypeptide of the invention. Alternatively, the binding molecules may be complexed with imaging agents for targeting and imaging purposes.

4.7.12 ASSAY FOR RECEPTOR ACTIVITY

The invention also provides methods to detect specific binding of a polypeptide e.g. a ligand or a receptor. The art provides numerous assays particularly useful for identifying previously unknown binding partners for receptor polypeptides of the invention. For example, expression cloning using mammalian or bacterial cells, or dihybrid screening assays can be used to identify polynucleotides encoding binding partners. As another example, affinity chromatography with the appropriate immobilized polypeptide of the invention can be used to isolate polypeptides that recognize and bind polypeptides of the invention. There are a number of different libraries used for the identification of compounds, and in particular small molecules, that modulate (*i.e.*, increase or decrease) biological activity of a polypeptide of the invention. Ligands for receptor polypeptides of the invention can also be identified by adding exogenous ligands, or cocktails of ligands to two cells populations that are genetically identical except for the expression of the receptor of the invention: one cell population expresses the receptor of the invention whereas the other does not. The response of the two cell populations to the addition of ligands(s) are then compared. Alternatively, an expression library can be co-expressed with the polypeptide of the invention in cells and assayed for an autocrine response to identify potential ligand(s). As still another example, BIAcore assays, gel overlay assays, or other methods known in the art can be used to identify binding partner polypeptides, including, (1) organic and inorganic

chemical libraries, (2) natural product libraries, and (3) combinatorial libraries comprised of random peptides, oligonucleotides or organic molecules.

The role of downstream intracellular signaling molecules in the signaling cascade of the polypeptide of the invention can be determined. For example, a chimeric protein in which the cytoplasmic domain of the polypeptide of the invention is fused to the extracellular portion of a protein, whose ligand has been identified, is produced in a host cell. The cell is then incubated with the ligand specific for the extracellular portion of the chimeric protein, thereby activating the chimeric receptor. Known downstream proteins involved in intracellular signaling can then be assayed for expected modifications i.e. phosphorylation. Other methods known to those in the art can also be used to identify signaling molecules involved in receptor activity.

4.7.13 LEUKEMIAS

Leukemias and related disorders may be treated or prevented by administration of a therapeutic that promotes or inhibits function of the polynucleotides and/or polypeptides of the invention. Such leukemias and related disorders include but are not limited to acute leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute myelocytic leukemia, myeloblastic, promyelocytic, myelomonocytic, monocytic, erythroleukemia, chronic leukemia, chronic myelocytic (granulocytic) leukemia and chronic lymphocytic leukemia (for a review of such disorders, see Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia).

4.7.14 OTHER ACTIVITIES

A polypeptide of the invention may also exhibit one or more of the following additional activities or effects: inhibiting the growth, infection or function of, or killing, infectious agents, including, without limitation, bacteria, viruses, fungi and other parasites; effecting (suppressing or enhancing) bodily characteristics, including, without limitation, height, weight, hair color, eye color, skin, fat to lean ratio or other tissue pigmentation, or organ or body part size or shape (such as, for example, breast augmentation or diminution, change in bone form or shape); effecting biorhythms or circadian cycles or rhythms; effecting the fertility of male or female subjects; effecting the metabolism, catabolism, anabolism, processing, utilization, storage or elimination of dietary fat, lipid, protein, carbohydrate, vitamins, minerals, co-factors or other nutritional factors or component(s); effecting

behavioral characteristics, including, without limitation, appetite, libido, stress, cognition (including cognitive disorders), depression (including depressive disorders) and violent behaviors; providing analgesic effects or other pain reducing effects; promoting differentiation and growth of embryonic stem cells in lineages other than hematopoietic lineages; hormonal or endocrine activity; in the case of enzymes, correcting deficiencies of the enzyme and treating deficiency-related diseases; treatment of hyperproliferative disorders (such as, for example, psoriasis); immunoglobulin-like activity (such as, for example, the ability to bind antigens or complement); and the ability to act as an antigen in a vaccine composition to raise an immune response against such protein or another material or entity which is cross-reactive with such protein.

4.7.15 IDENTIFICATION OF POLYMORPHISMS

The demonstration of polymorphisms makes possible the identification of such polymorphisms in human subjects and the pharmacogenetic use of this information for diagnosis and treatment. Such polymorphisms may be associated with, e.g., differential predisposition or susceptibility to various disease states (such as disorders involving inflammation or immune response) or a differential response to drug administration, and this genetic information can be used to tailor preventive or therapeutic treatment appropriately. For example, the existence of a polymorphism associated with a predisposition to inflammation or autoimmune disease makes possible the diagnosis of this condition in humans by identifying the presence of the polymorphism.

Polymorphisms can be identified in a variety of ways known in the art which all generally involve obtaining a sample from a patient, analyzing DNA from the sample, optionally involving isolation or amplification of the DNA, and identifying the presence of the polymorphism in the DNA. For example, PCR may be used to amplify an appropriate fragment of genomic DNA which may then be sequenced. Alternatively, the DNA may be subjected to allele-specific oligonucleotide hybridization (in which appropriate oligonucleotides are hybridized to the DNA under conditions permitting detection of a single base mismatch) or to a single nucleotide extension assay (in which an oligonucleotide that hybridizes immediately adjacent to the position of the polymorphism is extended with one or more labeled nucleotides). In addition, traditional restriction fragment length polymorphism analysis (using restriction enzymes that provide differential digestion of the genomic DNA

depending on the presence or absence of the polymorphism) may be performed. Arrays with nucleotide sequences of the present invention can be used to detect polymorphisms. The array can comprise modified nucleotide sequences of the present invention in order to detect the nucleotide sequences of the present invention. In the alternative, any one of the nucleotide sequences of the present invention can be placed on the array to detect changes from those sequences.

Alternatively a polymorphism resulting in a change in the amino acid sequence could also be detected by detecting a corresponding change in amino acid sequence of the protein, e.g., by an antibody specific to the variant sequence.

4.7.16 ARTHRITIS AND INFLAMMATION

The immunosuppressive effects of the compositions of the invention against rheumatoid arthritis is determined in an experimental animal model system. The experimental model system is adjuvant induced arthritis in rats, and the protocol is described by J. Holoshitz, et al., 1983, Science, 219:56. or by B. Waksman et al., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 23:129 (1963). Induction of the disease can be caused by a single injection, generally intradermally, of a suspension of killed *Mycobacterium tuberculosis* in complete Freund's adjuvant (CFA). The route of injection can vary, but rats may be injected at the base of the tail with an adjuvant mixture. The polypeptide is administered in phosphate buffered solution (PBS) at a dose of about 1-5 mg/kg. The control consists of administering PBS only.

The procedure for testing the effects of the test compound would consist of intradermally injecting killed *Mycobacterium tuberculosis* in CFA followed by immediately administering the test compound and subsequent treatment every other day until day 24. At 14, 15, 18, 20, 22, and 24 days after injection of *Mycobacterium* CFA, an overall arthritis score may be obtained as described by J. Holoskitz above. An analysis of the data would reveal that the test compound would have a dramatic affect on the swelling of the joints as measured by a decrease of the arthritis score.

4.8 THERAPEUTIC METHODS

The compositions (including polypeptide fragments, analogs, variants and antibodies or other binding partners or modulators including antisense polynucleotides) of the invention

have numerous applications in a variety of therapeutic methods. Examples of therapeutic applications include, but are not limited to, those exemplified herein.

4.8.1 EXAMPLE

One embodiment of the invention is the administration of an effective amount of the stem cell growth factor-like polypeptides or other composition of the invention to individuals affected by a disease or disorder that can be modulated by regulating the peptides of the invention. While the mode of administration is not particularly important, parenteral administration is preferred. An exemplary mode of administration is to deliver an intravenous bolus. The dosage of stem cell growth factor-like polypeptides or other composition of the invention will normally be determined by the prescribing physician. It is to be expected that the dosage will vary according to the age, weight, condition and response of the individual patient. Typically, the amount of polypeptide administered per dose will be in the range of about 0.01 mg/kg to 100 mg/kg of body weight, with the preferred dose being about 0.1 mg/kg to 10 mg/kg of patient body weight. For parenteral administration, stem cell growth factor-like polypeptides of the invention will be formulated in an injectable form combined with a pharmaceutically acceptable parenteral vehicle. Such vehicles are well known in the art and examples include water, saline, Ringer's solution, dextrose solution, and solutions consisting of small amounts of the human serum albumin. The vehicle may contain minor amounts of additives that maintain the isotonicity and stability of the polypeptide or other active ingredient. The preparation of such solutions is within the skill of the art.

4.9 PHARMACEUTICAL FORMULATIONS AND ROUTES OF ADMINISTRATION

A protein or other composition of the present invention (from whatever source derived, including without limitation from recombinant and non-recombinant sources and including antibodies and other binding partners of the polypeptides of the invention) may be administered to a patient in need, by itself, or in pharmaceutical compositions where it is mixed with suitable carriers or excipient(s) at doses to treat or ameliorate a variety of disorders. Such a composition may optionally contain (in addition to protein or other active ingredient and a carrier) diluents, fillers, salts, buffers, stabilizers, solubilizers, and other materials well known in the art. The term "pharmaceutically acceptable" means a non-toxic

material that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredient(s). The characteristics of the carrier will depend on the route of administration. The pharmaceutical composition of the invention may also contain cytokines, lymphokines, or other hematopoietic factors such as M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, thrombopoietin, stem cell factor, and erythropoietin. In further compositions, proteins of the invention may be combined with other agents beneficial to the treatment of the disease or disorder in question. These agents include various growth factors such as epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factors (TGF-a and TGF-b), insulin-like growth factor (IGF), as well as cytokines described herein.

The pharmaceutical composition may further contain other agents which either enhance the activity of the protein or other active ingredient or complement its activity or use in treatment. Such additional factors and/or agents may be included in the pharmaceutical composition to produce a synergistic effect with protein or other active ingredient of the invention, or to minimize side effects. Conversely, protein or other active ingredient of the present invention may be included in formulations of the particular clotting factor, cytokine, lymphokine, other hematopoietic factor, thrombolytic or anti-thrombotic factor, or anti-inflammatory agent to minimize side effects of the clotting factor, cytokine, lymphokine, other hematopoietic factor, thrombolytic or anti-thrombotic factor, or anti-inflammatory agent (such as IL-1Ra, IL-1 Hy1, IL-1 Hy2, anti-TNF, corticosteroids, immunosuppressive agents). A protein of the present invention may be active in multimers (e.g., heterodimers or homodimers) or complexes with itself or other proteins. As a result, pharmaceutical compositions of the invention may comprise a protein of the invention in such multimeric or complexed form.

As an alternative to being included in a pharmaceutical composition of the invention including a first protein, a second protein or a therapeutic agent may be concurrently administered with the first protein (e.g., at the same time, or at differing times provided that therapeutic concentrations of the combination of agents is achieved at the treatment site). Techniques for formulation and administration of the compounds of the instant application may be found in "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition. A therapeutically effective dose further refers to that amount of the compound

sufficient to result in amelioration of symptoms, e.g., treatment, healing, prevention or amelioration of the relevant medical condition, or an increase in rate of treatment, healing, prevention or amelioration of such conditions. When applied to an individual active ingredient, administered alone, a therapeutically effective dose refers to that ingredient alone. When applied to a combination, a therapeutically effective dose refers to combined amounts of the active ingredients that result in the therapeutic effect, whether administered in combination, serially or simultaneously.

In practicing the method of treatment or use of the present invention, a therapeutically effective amount of protein or other active ingredient of the present invention is administered to a mammal having a condition to be treated. Protein or other active ingredient of the present invention may be administered in accordance with the method of the invention either alone or in combination with other therapies such as treatments employing cytokines, lymphokines or other hematopoietic factors. When co-administered with one or more cytokines, lymphokines or other hematopoietic factors, protein or other active ingredient of the present invention may be administered either simultaneously with the cytokine(s), lymphokine(s), other hematopoietic factor(s), thrombolytic or anti-thrombotic factors, or sequentially. If administered sequentially, the attending physician will decide on the appropriate sequence of administering protein or other active ingredient of the present invention in combination with cytokine(s), lymphokine(s), other hematopoietic factor(s), thrombolytic or anti-thrombotic factors.

4.9.1 ROUTES OF ADMINISTRATION

Suitable routes of administration may, for example, include oral, rectal, transmucosal, or intestinal administration; parenteral delivery, including intramuscular, subcutaneous, intramedullary injections, as well as intrathecal, direct intraventricular, intravenous, intraperitoneal, intranasal, or intraocular injections. Administration of protein or other active ingredient of the present invention used in the pharmaceutical composition or to practice the method of the present invention can be carried out in a variety of conventional ways, such as oral ingestion, inhalation, topical application or cutaneous, subcutaneous, intraperitoneal, parenteral or intravenous injection. Intravenous administration to the patient is preferred.

Alternately, one may administer the compound in a local rather than systemic manner, for example, via injection of the compound directly into a arthritic joints or in fibrotic tissue,

often in a depot or sustained release formulation. In order to prevent the scarring process frequently occurring as complication of glaucoma surgery, the compounds may be administered topically, for example, as eye drops. Furthermore, one may administer the drug in a targeted drug delivery system, for example, in a liposome coated with a specific antibody, targeting, for example, arthritic or fibrotic tissue. The liposomes will be targeted to and taken up selectively by the afflicted tissue.

The polypeptides of the invention are administered by any route that delivers an effective dosage to the desired site of action. The determination of a suitable route of administration and an effective dosage for a particular indication is within the level of skill in the art. Preferably for wound treatment, one administers the therapeutic compound directly to the site. Suitable dosage ranges for the polypeptides of the invention can be extrapolated from these dosages or from similar studies in appropriate animal models. Dosages can then be adjusted as necessary by the clinician to provide maximal therapeutic benefit.

4.9.2 COMPOSITIONS/FORMULATIONS

Pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention thus may be formulated in a conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. These pharmaceutical compositions may be manufactured in a manner that is itself known, *e.g.*, by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping or lyophilizing processes. Proper formulation is dependent upon the route of administration chosen. When a therapeutically effective amount of protein or other active ingredient of the present invention is administered orally, protein or other active ingredient of the present invention will be in the form of a tablet, capsule, powder, solution or elixir. When administered in tablet form, the pharmaceutical composition of the invention may additionally contain a solid carrier such as a gelatin or an adjuvant. The tablet, capsule, and powder contain from about 5 to 95% protein or other active ingredient of the present invention, and preferably from about 25 to 90% protein or other active ingredient of the present invention. When administered in liquid form, a liquid carrier such as water, petroleum, oils of animal or plant origin such as peanut oil, mineral oil, soybean oil, or

sesame oil, or synthetic oils may be added. The liquid form of the pharmaceutical composition may further contain physiological saline solution, dextrose or other saccharide solution, or glycols such as ethylene glycol, propylene glycol or polyethylene glycol. When administered in liquid form, the pharmaceutical composition contains from about 0.5 to 90% by weight of protein or other active ingredient of the present invention, and preferably from about 1 to 50% protein or other active ingredient of the present invention.

When a therapeutically effective amount of protein or other active ingredient of the present invention is administered by intravenous, cutaneous or subcutaneous injection, protein or other active ingredient of the present invention will be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution. The preparation of such parenterally acceptable protein or other active ingredient solutions, having due regard to pH, isotonicity, stability, and the like, is within the skill in the art. A preferred pharmaceutical composition for intravenous, cutaneous, or subcutaneous injection should contain, in addition to protein or other active ingredient of the present invention, an isotonic vehicle such as Sodium Chloride Injection, Ringer's Injection, Dextrose Injection, Dextrose and Sodium Chloride Injection, Lactated Ringer's Injection, or other vehicle as known in the art. The pharmaceutical composition of the present invention may also contain stabilizers, preservatives, buffers, antioxidants, or other additives known to those of skill in the art. For injection, the agents of the invention may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks's solution, Ringer's solution, or physiological saline buffer. For transmucosal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

For oral administration, the compounds can be formulated readily by combining the active compounds with pharmaceutically acceptable carriers well known in the art. Such carriers enable the compounds of the invention to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions and the like, for oral ingestion by a patient to be treated. Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are, in particular, fillers such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; cellulose preparations such as, for example, maize starch, wheat starch, rice starch, potato starch, gelatin, gum tragacanth, methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, sodium

carboxymethylcellulose, and/or polyvinylpyrrolidone (PVP). If desired, disintegrating agents may be added, such as the cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, or alginic acid or a salt thereof such as sodium alginate. Dragee cores are provided with suitable coatings. For this purpose, concentrated sugar solutions may be used, which may optionally contain gum arabic, talc, polyvinyl pyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments may be added to the tablets or dragee coatings for identification or to characterize different combinations of active compound doses.

Pharmaceutical preparations which can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a plasticizer, such as glycerol or sorbitol. The push-fit capsules can contain the active ingredients in admixture with filler such as lactose, binders such as starches, and/or lubricants such as talc or magnesium stearate and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds may be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid paraffin, or liquid polyethylene glycols. In addition, stabilizers may be added. All formulations for oral administration should be in dosages suitable for such administration. For buccal administration, the compositions may take the form of tablets or lozenges formulated in conventional manner.

For administration by inhalation, the compounds for use according to the present invention are conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebuliser, with the use of a suitable propellant, *e.g.*, dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, *e.g.*, gelatin for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch. The compounds may be formulated for parenteral administration by injection, *e.g.*, by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, *e.g.*, in ampules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents.

Pharmaceutical formulations for parenteral administration include aqueous solutions of the active compounds in water-soluble form. Additionally, suspensions of the active

compounds may be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Aqueous injection suspensions may contain substances which increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Optionally, the suspension may also contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions. Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, *e.g.*, sterile pyrogen-free water, before use.

The compounds may also be formulated in rectal compositions such as suppositories or retention enemas, *e.g.*, containing conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides. In addition to the formulations described previously, the compounds may also be formulated as a depot preparation. Such long acting formulations may be administered by implantation (for example subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. Thus, for example, the compounds may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt.

A pharmaceutical carrier for the hydrophobic compounds of the invention is a co-solvent system comprising benzyl alcohol, a nonpolar surfactant, a water-miscible organic polymer, and an aqueous phase. The co-solvent system may be the VPD co-solvent system. VPD is a solution of 3% w/v benzyl alcohol, 8% w/v of the nonpolar surfactant polysorbate 80, and 65% w/v polyethylene glycol 300, made up to volume in absolute ethanol. The VPD co-solvent system (VPD:5W) consists of VPD diluted 1:1 with a 5% dextrose in water solution. This co-solvent system dissolves hydrophobic compounds well, and itself produces low toxicity upon systemic administration. Naturally, the proportions of a co-solvent system may be varied considerably without destroying its solubility and toxicity characteristics. Furthermore, the identity of the co-solvent components may be varied: for example, other low-toxicity nonpolar surfactants may be used instead of polysorbate 80; the fraction size of polyethylene glycol may be varied; other biocompatible polymers may replace polyethylene glycol, *e.g.* polyvinyl pyrrolidone; and other sugars or polysaccharides may substitute for dextrose. Alternatively, other delivery systems for hydrophobic pharmaceutical compounds may be employed. Liposomes and emulsions are well known examples of delivery vehicles or carriers for hydrophobic drugs. Certain organic solvents such as dimethylsulfoxide also

may be employed, although usually at the cost of greater toxicity. Additionally, the compounds may be delivered using a sustained-release system, such as semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the therapeutic agent. Various types of sustained-release materials have been established and are well known by those skilled in the art. Sustained-release capsules may, depending on their chemical nature, release the compounds for a few weeks up to over 100 days. Depending on the chemical nature and the biological stability of the therapeutic reagent, additional strategies for protein or other active ingredient stabilization may be employed.

The pharmaceutical compositions also may comprise suitable solid or gel phase carriers or excipients. Examples of such carriers or excipients include but are not limited to calcium carbonate, calcium phosphate, various sugars, starches, cellulose derivatives, gelatin, and polymers such as polyethylene glycols. Many of the active ingredients of the invention may be provided as salts with pharmaceutically compatible counter ions. Such pharmaceutically acceptable base addition salts are those salts which retain the biological effectiveness and properties of the free acids and which are obtained by reaction with inorganic or organic bases such as sodium hydroxide, magnesium hydroxide, ammonia, trialkylamine, dialkylamine, monoalkylamine, dibasic amino acids, sodium acetate, potassium benzoate, triethanol amine and the like.

The pharmaceutical composition of the invention may be in the form of a complex of the protein(s) or other active ingredient of present invention along with protein or peptide antigens. The protein and/or peptide antigen will deliver a stimulatory signal to both B and T lymphocytes. B lymphocytes will respond to antigen through their surface immunoglobulin receptor. T lymphocytes will respond to antigen through the T cell receptor (TCR) following presentation of the antigen by MHC proteins. MHC and structurally related proteins including those encoded by class I and class II MHC genes on host cells will serve to present the peptide antigen(s) to T lymphocytes. The antigen components could also be supplied as purified MHC-peptide complexes alone or with co-stimulatory molecules that can directly signal T cells. Alternatively antibodies able to bind surface immunoglobulin and other molecules on B cells as well as antibodies able to bind the TCR and other molecules on T cells can be combined with the pharmaceutical composition of the invention.

The pharmaceutical composition of the invention may be in the form of a liposome in which protein of the present invention is combined, in addition to other pharmaceutically

acceptable carriers, with amphipathic agents such as lipids which exist in aggregated form as micelles, insoluble monolayers, liquid crystals, or lamellar layers in aqueous solution. Suitable lipids for liposomal formulation include, without limitation, monoglycerides, diglycerides, sulfatides, lysolecithins, phospholipids, saponin, bile acids, and the like. Preparation of such liposomal formulations is within the level of skill in the art, as disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 4,235,871; 4,501,728; 4,837,028; and 4,737,323, all of which are incorporated herein by reference.

The amount of protein or other active ingredient of the present invention in the pharmaceutical composition of the present invention will depend upon the nature and severity of the condition being treated, and on the nature of prior treatments which the patient has undergone. Ultimately, the attending physician will decide the amount of protein or other active ingredient of the present invention with which to treat each individual patient. Initially, the attending physician will administer low doses of protein or other active ingredient of the present invention and observe the patient's response. Larger doses of protein or other active ingredient of the present invention may be administered until the optimal therapeutic effect is obtained for the patient, and at that point the dosage is not increased further. It is contemplated that the various pharmaceutical compositions used to practice the method of the present invention should contain about 0.01 μ g to about 100 mg (preferably about 0.1 μ g to about 10 mg, more preferably about 0.1 μ g to about 1 mg) of protein or other active ingredient of the present invention per kg body weight. For compositions of the present invention which are useful for bone, cartilage, tendon or ligament regeneration, the therapeutic method includes administering the composition topically, systematically, or locally as an implant or device. When administered, the therapeutic composition for use in this invention is, of course, in a pyrogen-free, physiologically acceptable form. Further, the composition may desirably be encapsulated or injected in a viscous form for delivery to the site of bone, cartilage or tissue damage. Topical administration may be suitable for wound healing and tissue repair. Therapeutically useful agents other than a protein or other active ingredient of the invention which may also optionally be included in the composition as described above, may alternatively or additionally, be administered simultaneously or sequentially with the composition in the methods of the invention. Preferably for bone and/or cartilage formation, the composition would include a matrix capable of delivering the protein-containing or other active ingredient-containing composition to the site of bone and/or

cartilage damage, providing a structure for the developing bone and cartilage and optimally capable of being resorbed into the body. Such matrices may be formed of materials presently in use for other implanted medical applications.

The choice of matrix material is based on biocompatibility, biodegradability, mechanical properties, cosmetic appearance and interface properties. The particular application of the compositions will define the appropriate formulation. Potential matrices for the compositions may be biodegradable and chemically defined calcium sulfate, tricalcium phosphate, hydroxyapatite, polylactic acid, polyglycolic acid and polyanhydrides. Other potential materials are biodegradable and biologically well-defined, such as bone or dermal collagen. Further matrices are comprised of pure proteins or extracellular matrix components. Other potential matrices are nonbiodegradable and chemically defined, such as sintered hydroxyapatite, bioglass, aluminates, or other ceramics. Matrices may be comprised of combinations of any of the above mentioned types of material, such as polylactic acid and hydroxyapatite or collagen and tricalcium phosphate. The bioceramics may be altered in composition, such as in calcium-aluminate-phosphate and processing to alter pore size, particle size, particle shape, and biodegradability. Presently preferred is a 50:50 (mole weight) copolymer of lactic acid and glycolic acid in the form of porous particles having diameters ranging from 150 to 800 microns. In some applications, it will be useful to utilize a sequestering agent, such as carboxymethyl cellulose or autologous blood clot, to prevent the protein compositions from disassociating from the matrix.

A preferred family of sequestering agents is cellulosic materials such as alkylcelluloses (including hydroxyalkylcelluloses), including methylcellulose, ethylcellulose, hydroxyethylcellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxypropyl-methylcellulose, and carboxymethylcellulose, the most preferred being cationic salts of carboxymethylcellulose (CMC). Other preferred sequestering agents include hyaluronic acid, sodium alginate, poly(ethylene glycol), polyoxyethylene oxide, carboxyvinyl polymer and poly(vinyl alcohol). The amount of sequestering agent useful herein is 0.5-20 wt %, preferably 1-10 wt % based on total formulation weight, which represents the amount necessary to prevent desorption of the protein from the polymer matrix and to provide appropriate handling of the composition, yet not so much that the progenitor cells are prevented from infiltrating the matrix, thereby providing the protein the opportunity to assist the osteogenic activity of the progenitor cells. In further compositions, proteins or other active ingredient of the invention may be combined

with other agents beneficial to the treatment of the bone and/or cartilage defect, wound, or tissue in question. These agents include various growth factors such as epidermal growth factor (EGF), platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factors (TGF- α and TGF- β), and insulin-like growth factor (IGF).

The therapeutic compositions are also presently valuable for veterinary applications. Particularly domestic animals and thoroughbred horses, in addition to humans, are desired patients for such treatment with proteins or other active ingredient of the present invention. The dosage regimen of a protein-containing pharmaceutical composition to be used in tissue regeneration will be determined by the attending physician considering various factors which modify the action of the proteins, *e.g.*, amount of tissue weight desired to be formed, the site of damage, the condition of the damaged tissue, the size of a wound, type of damaged tissue (*e.g.*, bone), the patient's age, sex, and diet, the severity of any infection, time of administration and other clinical factors. The dosage may vary with the type of matrix used in the reconstitution and with inclusion of other proteins in the pharmaceutical composition. For example, the addition of other known growth factors, such as IGF I (insulin like growth factor I), to the final composition, may also effect the dosage. Progress can be monitored by periodic assessment of tissue/bone growth and/or repair, for example, X-rays, histomorphometric determinations and tetracycline labeling.

Polynucleotides of the present invention can also be used for gene therapy. Such polynucleotides can be introduced either *in vivo* or *ex vivo* into cells for expression in a mammalian subject. Polynucleotides of the invention may also be administered by other known methods for introduction of nucleic acid into a cell or organism (including, without limitation, in the form of viral vectors or naked DNA). Cells may also be cultured *ex vivo* in the presence of proteins of the present invention in order to proliferate or to produce a desired effect on or activity in such cells. Treated cells can then be introduced *in vivo* for therapeutic purposes.

4.9.3 EFFECTIVE DOSAGE

Pharmaceutical compositions suitable for use in the present invention include compositions wherein the active ingredients are contained in an effective amount to achieve its intended purpose. More specifically, a therapeutically effective amount means an amount effective to prevent development of or to alleviate the existing symptoms of the subject being

treated. Determination of the effective amount is well within the capability of those skilled in the art, especially in light of the detailed disclosure provided herein. For any compound used in the method of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from appropriate *in vitro* assays. For example, a dose can be formulated in animal models to achieve a circulating concentration range that can be used to more accurately determine useful doses in humans. For example, a dose can be formulated in animal models to achieve a circulating concentration range that includes the IC_{50} as determined in cell culture (*i.e.*, the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of the protein's biological activity). Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans.

A therapeutically effective dose refers to that amount of the compound that results in amelioration of symptoms or a prolongation of survival in a patient. Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, *e.g.*, for determining the LD_{50} (the dose lethal to 50% of the population) and the ED_{50} (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio between LD_{50} and ED_{50} . Compounds which exhibit high therapeutic indices are preferred. The data obtained from these cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in human. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED_{50} with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. The exact formulation, route of administration and dosage can be chosen by the individual physician in view of the patient's condition. See, *e.g.*, Fingl et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1. Dosage amount and interval may be adjusted individually to provide plasma levels of the active moiety which are sufficient to maintain the desired effects, or minimal effective concentration (MEC). The MEC will vary for each compound but can be estimated from *in vitro* data. Dosages necessary to achieve the MEC will depend on individual characteristics and route of administration. However, HPLC assays or bioassays can be used to determine plasma concentrations.

Dosage intervals can also be determined using MEC value. Compounds should be administered using a regimen which maintains plasma levels above the MEC for 10-90% of

the time, preferably between 30-90% and most preferably between 50-90%. In cases of local administration or selective uptake, the effective local concentration of the drug may not be related to plasma concentration.

An exemplary dosage regimen for polypeptides or other compositions of the invention will be in the range of about 0.01 mg/kg to 100 mg/kg of body weight daily, with the preferred dose being about 0.1 mg/kg to 25 mg/kg of patient body weight daily, varying in adults and children. Dosing may be once daily, or equivalent doses may be delivered at longer or shorter intervals.

The amount of composition administered will, of course, be dependent on the subject being treated, on the subject's age and weight, the severity of the affliction, the manner of administration and the judgment of the prescribing physician.

4.9.4 PACKAGING

The compositions may, if desired, be presented in a pack or dispenser device which may contain one or more unit dosage forms containing the active ingredient. The pack may, for example, comprise metal or plastic foil, such as a blister pack. The pack or dispenser device may be accompanied by instructions for administration. Compositions comprising a compound of the invention formulated in a compatible pharmaceutical carrier may also be prepared, placed in an appropriate container, and labeled for treatment of an indicated condition.

4.10 ANTIBODIES

4.10.1 HUMAN ANTIBODIES

Fully human antibodies relate to antibody molecules in which essentially the entire sequences of both the light chain and the heavy chain, including the CDRs, arise from human genes. Such antibodies are termed "human antibodies", or "fully human antibodies" herein. Human monoclonal antibodies can be prepared by the trioma technique; the human B-cell hybridoma technique [see Kozbor, et al., Immunol Today, 4:72 (1983)] and the EBV hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies [see Cole, et al., 1985 In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96]. Human monoclonal antibodies may be utilized in the practice of the present invention and may be produced by using human hybridomas [see Cote, et al., Proc Natl Acad Sci USA

80:2026-2030 (1983)] or by transforming human B-cells with Epstein Barr Virus in vitro [see Cole, et al., 1985, In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96].

In addition, human antibodies can also be produced using additional techniques, including phage display libraries [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. Similarly, human antibodies can be made by introducing human immunoglobulin loci into transgenic animals, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, and in Marks et al. [*Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]; Lonberg et al. [*Nature*, 368:856-859 (1994)]; Morrison [*Nature*, 368:812-13 (1994)]; Fishwild et al. [*Nature Biotechnology*, 14:845-51 (1996)]; Neuberger [*Nature Biotechnology*, 14:826 (1996)]; and Lonberg and Huszar [*Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995)].

Human antibodies may additionally be produced using transgenic nonhuman animals which are modified so as to produce fully human antibodies rather than the animal's endogenous antibodies in response to challenge by an antigen. (See PCT publication WO94/02602). The endogenous genes encoding the heavy and light immunoglobulin chains in the nonhuman host have been incapacitated, and active loci encoding human heavy and light chain immunoglobulins are inserted into the host's genome. The human genes are incorporated, for example, using yeast artificial chromosomes containing the requisite human DNA segments. An animal which provides all the desired modifications is then obtained as progeny by crossbreeding intermediate transgenic animals containing fewer than the full complement of the modifications. The preferred embodiment of such a nonhuman animal is a mouse, and is termed the XenomouseTM as disclosed in PCT publications WO 96/33735 and WO 96/34096. This animal produces B cells which secrete fully human immunoglobulins. The antibodies can be obtained directly from the animal after immunization with an immunogen of interest, as, for example, a preparation of a polyclonal antibody, or alternatively from immortalized B cells derived from the animal, such as hybridomas producing monoclonal antibodies. Additionally, the genes encoding the immunoglobulins with human variable regions can be recovered and expressed to obtain the antibodies directly,

or can be further modified to obtain analogs of antibodies such as, for example, single chain Fv molecules. An example of a method of producing a nonhuman host, exemplified as a mouse, lacking expression of an endogenous immunoglobulin heavy chain is disclosed in U.S. Patent No. 5,939,598. It can be obtained by a method including deleting the J segment genes from at least one endogenous heavy chain locus in an embryonic stem cell to prevent rearrangement of the locus and to prevent formation of a transcript of a rearranged immunoglobulin heavy chain locus, the deletion being effected by a targeting vector containing a gene encoding a selectable marker; and producing from the embryonic stem cell a transgenic mouse whose somatic and germ cells contain the gene encoding the selectable marker.

A method for producing an antibody of interest, such as a human antibody, is disclosed in U.S. Patent No. 5,916,771. It includes introducing an expression vector that contains a nucleotide sequence encoding a heavy chain into one mammalian host cell in culture, introducing an expression vector containing a nucleotide sequence encoding a light chain into another mammalian host cell, and fusing the two cells to form a hybrid cell. The hybrid cell expresses an antibody containing the heavy chain and the light chain.

In a further improvement on this procedure, a method for identifying a clinically relevant epitope on an immunogen, and a correlative method for selecting an antibody that binds immunospecifically to the relevant epitope with high affinity, are disclosed in PCT publication WO 99/53049.

4.10.2 FAB FRAGMENTS AND SINGLE CHAIN ANTIBODIES

According to the invention, techniques can be adapted for the production of single-chain antibodies specific to an antigenic protein of the invention (see e.g., U.S. Patent No. 4,946,778). In addition, methods can be adapted for the construction of F_{ab} expression libraries [see e.g., Huse, et al., Science, 246:1275-1281 (1989)] to allow rapid and effective identification of monoclonal F_{ab} fragments with the desired specificity for a protein or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Antibody fragments that contain the idiotype to a protein antigen may be produced by techniques known in the art including, but not limited to: (i) an $F_{(ab)2}$ fragment produced by pepsin digestion of an antibody molecule; (ii) an F_{ab} fragment generated by reducing the disulfide bridges of an $F_{(ab)2}$ fragment; (iii) an

F_{ab} fragment generated by the treatment of the antibody molecule with papain and a reducing agent and (iv) F_v fragments.

4.10.3 BISPECIFIC ANTIBODIES

Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for an antigenic protein of the invention. The second binding target is any other antigen, and advantageously is a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities [Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)]. Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule is usually accomplished by affinity chromatography steps. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, published 13 May 1993, and in Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) can be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

According to another approach described in WO 96/27011, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the CH3 region of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g. tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or

similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies can be prepared as full-length antibodies or antibody fragments (e.g. F(ab')₂ bispecific antibodies). Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')₂ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Additionally, Fab' fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody F(ab')₂ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling in vitro to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody

fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared [Tutt et al., *J. Immunol.*, 147:60 (1991)].

Exemplary bispecific antibodies can bind to two different epitopes, at least one of which originates in the protein antigen of the invention. Alternatively, an anti-antigenic arm of an immunoglobulin molecule can be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (e.g. CD2, CD3, CD28, or B7), or Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular antigen.

Bispecific antibodies can also be used to direct cytotoxic agents to cells which express a particular antigen. These antibodies possess an antigen-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA. Another bispecific antibody of interest binds the protein antigen described herein and further binds tissue factor (TF).

4.10.4 HETEROCONJUGATE ANTIBODIES

Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). It is contemplated that the antibodies can be prepared in vitro using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins can be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980.

4.10.5 EFFECTOR FUNCTION ENGINEERING

It can be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance, e.g., the effectiveness of the antibody in treating cancer. For example, cysteine residue(s) can be introduced into the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated can have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron et al., *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity can also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff et al. *Cancer Research*, 53:2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered that has dual Fc regions and can thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities [See Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989)].

4.10.6 IMMUNOCONJUGATES

The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (e.g., an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (i.e., a radioconjugate).

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAP I, PAP II, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, saponaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , and ^{186}Re .

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as

glutareldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026.

In another embodiment, the antibody can be conjugated to a "receptor" (such streptavidin) for utilization in tumor pretargeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) that is in turn conjugated to a cytotoxic agent.

4.11 COMPUTER READABLE SEQUENCES

In one application of this embodiment, a nucleotide sequence of the present invention can be recorded on computer readable media. As used herein, "computer readable media" refers to any medium which can be read and accessed directly by a computer. Such media include, but are not limited to: magnetic storage media, such as floppy discs, hard disc storage medium, and magnetic tape; optical storage media such as CD-ROM; electrical storage media such as RAM and ROM; and hybrids of these categories such as magnetic/optical storage media. A skilled artisan can readily appreciate how any of the presently known computer readable mediums can be used to create a manufacture comprising computer readable medium having recorded thereon a nucleotide sequence of the present invention. As used herein, "recorded" refers to a process for storing information on computer readable medium. A skilled artisan can readily adopt any of the presently known methods for recording information on computer readable medium to generate manufactures comprising the nucleotide sequence information of the present invention.

A variety of data storage structures are available to a skilled artisan for creating a computer readable medium having recorded thereon a nucleotide sequence of the present invention. The choice of the data storage structure will generally be based on the means chosen to access the stored information. In addition, a variety of data processor programs and formats can be used to store the nucleotide sequence information of the present invention on

computer readable medium. The sequence information can be represented in a word processing text file, formatted in commercially-available software such as WordPerfect and Microsoft Word, or represented in the form of an ASCII file, stored in a database application, such as DB2, Sybase, Oracle, or the like. A skilled artisan can readily adapt any number of data processor structuring formats (e.g. text file or database) in order to obtain computer readable medium having recorded thereon the nucleotide sequence information of the present invention.

By providing any of the nucleotide sequences SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 or a representative fragment thereof; or a nucleotide sequence at least 95% identical to any of the nucleotide sequences of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 in computer readable form, a skilled artisan can routinely access the sequence information for a variety of purposes. Computer software is publicly available which allows a skilled artisan to access sequence information provided in a computer readable medium. The examples which follow demonstrate how software which implements the BLAST [Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)] and BLAZE [Brutlag et al., Comp. Chem., 17:203-207 (1993)] search algorithms on a Sybase system is used to identify open reading frames (ORFs) within a nucleic acid sequence. Such ORFs may be protein encoding fragments and may be useful in producing commercially important proteins such as enzymes used in fermentation reactions and in the production of commercially useful metabolites.

As used herein, "a computer-based system" refers to the hardware means, software means, and data storage means used to analyze the nucleotide sequence information of the present invention. The minimum hardware means of the computer-based systems of the present invention comprises a central processing unit (CPU), input means, output means, and data storage means. A skilled artisan can readily appreciate that any one of the currently available computer-based systems are suitable for use in the present invention. As stated above, the computer-based systems of the present invention comprise a data storage means having stored therein a nucleotide sequence of the present invention and the necessary hardware means and software means for supporting and implementing a search means. As used herein, "data storage means" refers to memory which can store nucleotide sequence information of the present invention, or a memory access means which can access manufactures having recorded thereon the nucleotide sequence information of the present invention.

As used herein, "search means" refers to one or more programs which are implemented on the computer-based system to compare a target sequence or target structural motif with the sequence information stored within the data storage means. Search means are used to identify fragments or regions of a known sequence which match a particular target sequence or target motif. A variety of known algorithms are disclosed publicly and a variety of commercially available software for conducting search means are and can be used in the computer-based systems of the present invention. Examples of such software includes, but is not limited to, Smith-Waterman, MacPattern (EMBL), BLASTN and BLASTA (NPOLYPEPTIDEIA). A skilled artisan can readily recognize that any one of the available algorithms or implementing software packages for conducting homology searches can be adapted for use in the present computer-based systems. As used herein, a "target sequence" can be any nucleic acid or amino acid sequence of six or more nucleotides or two or more amino acids. A skilled artisan can readily recognize that the longer a target sequence is, the less likely a target sequence will be present as a random occurrence in the database. The most preferred sequence length of a target sequence is from about 10 to 100 amino acids, or from about 30 to 300 nucleotide residues. However, it is well recognized that searches for commercially important fragments, such as sequence fragments involved in gene expression and protein processing, may be of shorter length.

As used herein, "a target structural motif," or "target motif," refers to any rationally selected sequence or combination of sequences in which the sequence(s) are chosen based on a three-dimensional configuration which is formed upon the folding of the target motif. There are a variety of target motifs known in the art. Protein target motifs include, but are not limited to, enzyme active sites and signal sequences. Nucleic acid target motifs include, but are not limited to, promoter sequences, hairpin structures and inducible expression elements (protein binding sequences).

4.12 TRIPLE HELIX FORMATION

In addition, the fragments of the present invention, as broadly described, can be used to control gene expression through triple helix formation or antisense DNA or RNA, both of which methods are based on the binding of a polynucleotide sequence to DNA or RNA. Polynucleotides suitable for use in these methods are usually 20 to 40 bases in length and are designed to be complementary to a region of the gene involved in transcription [triple helix -

see Lee et al., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney et al., Science, 15241:456 (1988); and Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)) or to the mRNA itself [antisense - Olmno, J. Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)]. Triple helix-formation optimally results in a shut-off of RNA transcription from DNA, while antisense RNA hybridization blocks translation of an mRNA molecule into polypeptide. Both techniques have been demonstrated to be effective in model systems. Information contained in the sequences of the present invention is necessary for the design of an antisense or triple helix oligonucleotide.

4.13 DIAGNOSTIC ASSAYS AND KITS

The present invention further provides methods to identify the presence or expression of one of the ORFs of the present invention, or homolog thereof, in a test sample, using a nucleic acid probe or antibodies of the present invention, optionally conjugated or otherwise associated with a suitable label.

In general, methods for detecting a polynucleotide of the invention can comprise contacting a sample with a compound that binds to and forms a complex with the polynucleotide for a period sufficient to form the complex, and detecting the complex, so that if a complex is detected, a polynucleotide of the invention is detected in the sample. Such methods can also comprise contacting a sample under stringent hybridization conditions with nucleic acid primers that anneal to a polynucleotide of the invention under such conditions, and amplifying annealed polynucleotides, so that if a polynucleotide is amplified, a polynucleotide of the invention is detected in the sample.

In general, methods for detecting a polypeptide of the invention can comprise contacting a sample with a compound that binds to and forms a complex with the polypeptide for a period sufficient to form the complex, and detecting the complex, so that if a complex is detected, a polypeptide of the invention is detected in the sample.

In detail, such methods comprise incubating a test sample with one or more of the antibodies or one or more of the nucleic acid probes of the present invention and assaying for binding of the nucleic acid probes or antibodies to components within the test sample.

Conditions for incubating a nucleic acid probe or antibody with a test sample vary. Incubation conditions depend on the format employed in the assay, the detection methods employed, and the type and nature of the nucleic acid probe or antibody used in the assay.

One skilled in the art will recognize that any one of the commonly available hybridization, amplification or immunological assay formats can readily be adapted to employ the nucleic acid probes or antibodies of the present invention. Examples of such assays can be found in Chard, T., *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986); Bullock, G.R. et al., *Techniques in Immunocytochemistry*, Academic Press, Orlando, FL Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983), Vol. 3 (1985); Tijssen, P., *Practice and Theory of immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985). The test samples of the present invention include cells, protein or membrane extracts of cells, or biological fluids such as sputum, blood, serum, plasma, or urine. The test sample used in the above-described method will vary based on the assay format, nature of the detection method and the tissues, cells or extracts used as the sample to be assayed. Methods for preparing protein extracts or membrane extracts of cells are well known in the art and can be readily be adapted in order to obtain a sample which is compatible with the system utilized.

In another embodiment of the present invention, kits are provided which contain the necessary reagents to carry out the assays of the present invention. Specifically, the invention provides a compartment kit to receive, in close confinement, one or more containers which comprises: (a) a first container comprising one of the probes or antibodies of the present invention; and (b) one or more other containers comprising one or more of the following: wash reagents, reagents capable of detecting presence of a bound probe or antibody.

In detail, a compartment kit includes any kit in which reagents are contained in separate containers. Such containers include small glass containers, plastic containers or strips of plastic or paper. Such containers allows one to efficiently transfer reagents from one compartment to another compartment such that the samples and reagents are not cross-contaminated, and the agents or solutions of each container can be added in a quantitative fashion from one compartment to another. Such containers will include a container which will accept the test sample, a container which contains the antibodies used in the assay, containers which contain wash reagents (such as phosphate buffered saline, Tris-buffers, etc.), and containers which contain the reagents used to detect the bound antibody or probe. Types of detection reagents include labeled nucleic acid probes, labeled secondary antibodies, or in

the alternative, if the primary antibody is labeled, the enzymatic, or antibody binding reagents which are capable of reacting with the labeled antibody. One skilled in the art will readily recognize that the disclosed probes and antibodies of the present invention can be readily incorporated into one of the established kit formats which are well known in the art.

4.14 MEDICAL IMAGING

The novel polypeptides and binding partners of the invention are useful in medical imaging of sites expressing the molecules of the invention (e.g., where the polypeptide of the invention is involved in the immune response, for imaging sites of inflammation or infection). See, e.g., Kunkel et al., U.S. Pat. No. 5,413,778. Such methods involve chemical attachment of a labeling or imaging agent, administration of the labeled polypeptide to a subject in a pharmaceutically acceptable carrier, and imaging the labeled polypeptide *in vivo* at the target site.

4.15 SCREENING ASSAYS

Using the isolated proteins and polynucleotides of the invention, the present invention further provides methods of obtaining and identifying agents which bind to a polypeptide encoded by an ORF corresponding to any of the nucleotide sequences set forth in SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39 or bind to a specific domain of the polypeptide encoded by the nucleic acid. In detail, said method comprises the steps of:

- (a) contacting an agent with an isolated protein encoded by an ORF of the present invention, or nucleic acid of the invention; and
- (b) determining whether the agent binds to said protein or said nucleic acid.

In general, therefore, such methods for identifying compounds that bind to a polynucleotide of the invention can comprise contacting a compound with a polynucleotide of the invention for a time sufficient to form a polynucleotide/compound complex, and detecting the complex, so that if a polynucleotide/compound complex is detected, a compound that binds to a polynucleotide of the invention is identified.

Likewise, in general, therefore, such methods for identifying compounds that bind to a polypeptide of the invention can comprise contacting a compound with a polypeptide of the invention for a time sufficient to form a polypeptide/compound complex, and detecting the

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

100

complex, so that if a polypeptide/compound complex is detected, a compound that binds to a polynucleotide of the invention is identified.

Methods for identifying compounds that bind to a polypeptide of the invention can also comprise contacting a compound with a polypeptide of the invention in a cell for a time sufficient to form a polypeptide/compound complex, wherein the complex drives expression of a receptor gene sequence in the cell, and detecting the complex by detecting reporter gene sequence expression, so that if a polypeptide/compound complex is detected, a compound that binds a polypeptide of the invention is identified.

Compounds identified via such methods can include compounds which modulate the activity of a polypeptide of the invention (that is, increase or decrease its activity, relative to activity observed in the absence of the compound). Alternatively, compounds identified via such methods can include compounds which modulate the expression of a polynucleotide of the invention (that is, increase or decrease expression relative to expression levels observed in the absence of the compound). Compounds, such as compounds identified via the methods of the invention, can be tested using standard assays well known to those of skill in the art for their ability to modulate activity/expression.

The agents screened in the above assay can be, but are not limited to, peptides, carbohydrates, vitamin derivatives, or other pharmaceutical agents. The agents can be selected and screened at random or rationally selected or designed using protein modeling techniques.

For random screening, agents such as peptides, carbohydrates, pharmaceutical agents and the like are selected at random and are assayed for their ability to bind to the protein encoded by the ORF of the present invention. Alternatively, agents may be rationally selected or designed. As used herein, an agent is said to be "rationally selected or designed" when the agent is chosen based on the configuration of the particular protein. For example, one skilled in the art can readily adapt currently available procedures to generate peptides, pharmaceutical agents and the like, capable of binding to a specific peptide sequence, in order to generate rationally designed anti-peptide peptides, for example see Hurby et al., Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides," In Synthetic Peptides, A User's Guide. W.H. Freeman, NY (1992), pp. 289-307, and Kaspczak et al., Biochemistry 28:9230-8 (1989), or pharmaceutical agents, or the like.

In addition to the foregoing, one class of agents of the present invention, as broadly described, can be used to control gene expression through binding to one of the ORFs or EMFs of the present invention. As described above, such agents can be randomly screened or rationally designed/selected. Targeting the ORF or EMF allows a skilled artisan to design sequence specific or element specific agents, modulating the expression of either a single ORF or multiple ORFs which rely on the same EMF for expression control. One class of DNA binding agents are agents which contain base residues which hybridize or form a triple helix formation by binding to DNA or RNA. Such agents can be based on the classic phosphodiester, ribonucleic acid backbone, or can be a variety of sulfhydryl or polymeric derivatives which have base attachment capacity.

Agents suitable for use in these methods usually contain 20 to 40 bases and are designed to be complementary to a region of the gene involved in transcription [triple helix - see Lee et al., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney et al., Science, 241:456 (1988); and Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)] or to the mRNA itself [antisense - Okano, J. Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)]. Triple helix-formation optimally results in a shut-off of RNA transcription from DNA, while antisense RNA hybridization blocks translation of an mRNA molecule into polypeptide. Both techniques have been demonstrated to be effective in model systems. Information contained in the sequences of the present invention is necessary for the design of an antisense or triple helix oligonucleotide and other DNA binding agents.

Agents which bind to a protein encoded by one of the ORFs of the present invention can be used as a diagnostic agent. Agents which bind to a protein encoded by one of the ORFs of the present invention can be formulated using known techniques to generate a pharmaceutical composition.

4.16 USE OF NUCLEIC ACIDS AS PROBES

Another aspect of the subject invention is to provide for polypeptide-specific nucleic acid hybridization probes capable of hybridizing with naturally occurring nucleotide sequences. The hybridization probes of the subject invention may be derived from any of the nucleotide sequences SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39. Because the corresponding gene is only expressed in a limited number of tissues, a hybridization probe derived from any of

the nucleotide sequences SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37 or 39, can be used as an indicator of the presence of RNA of cell type of such a tissue in a sample.

Any suitable hybridization technique can be employed, such as, for example, in situ hybridization. PCR as described in US Patents Nos. 4,683,195 and 4,965,188 provides additional uses for oligonucleotides based upon the nucleotide sequences. Such probes used in PCR may be of recombinant origin, may be chemically synthesized, or a mixture of both. The probe will comprise a discrete nucleotide sequence for the detection of identical sequences or a degenerate pool of possible sequences for identification of closely related genomic sequences.

Other means for producing specific hybridization probes for nucleic acids include the cloning of nucleic acid sequences into vectors for the production of mRNA probes. Such vectors are known in the art and are commercially available and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by means of the addition of the appropriate RNA polymerase as T7 or SP6 RNA polymerase and the appropriate radioactively labeled nucleotides. The nucleotide sequences may be used to construct hybridization probes for mapping their respective genomic sequences. The nucleotide sequence provided herein may be mapped to a chromosome or specific regions of a chromosome using well known genetic and/or chromosomal mapping techniques. These techniques include in situ hybridization, linkage analysis against known chromosomal markers, hybridization screening with libraries or flow-sorted chromosomal preparations specific to known chromosomes, and the like. The technique of fluorescent in situ hybridization of chromosome spreads has been described, among other places, in Verma et al (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York NY.

Fluorescent *in situ* hybridization of chromosomal preparations and other physical chromosome mapping techniques may be correlated with additional genetic map data. Examples of genetic map data can be found in the 1994 Genome Issue of Science (265:1981f). Correlation between the location of a nucleic acid on a physical chromosomal map and a specific disease (or predisposition to a specific disease) may help delimit the region of DNA associated with that genetic disease. The nucleotide sequences of the subject invention may be used to detect differences in gene sequences between normal, carrier or affected individuals.

4.17 PREPARATION OF SUPPORT BOUND OLIGONUCLEOTIDES

Oligonucleotides, i.e., small nucleic acid segments, may be readily prepared by, for example, directly synthesizing the oligonucleotide by chemical means, as is commonly practiced using an automated oligonucleotide synthesizer.

Support bound oligonucleotides may be prepared by any of the methods known to those of skill in the art using any suitable support such as glass, polystyrene or Teflon. One strategy is to precisely spot oligonucleotides synthesized by standard synthesizers. Immobilization can be achieved using passive adsorption [Inouye & Hondo, *J. Clin. Microbiol.*, 28(6):1462-72 (1990)]; using UV light [Nagata *et al.* (1985); Dahlen *et al.* (1987); Morrissey & Collins, *Mol. Cell Probes*, 3(2): 189-207 (1989)] or by covalent binding of base-modified DNA [Keller *et al.*, 1988; 1989]; all references being specifically incorporated herein.

Another strategy that may be employed is the use of the strong biotin-streptavidin interaction as a linker. For example, Broude *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(8):3072-6 (1984) describe the use of biotinylated probes, although these are duplex probes, that are immobilized on streptavidin-coated magnetic beads. Streptavidin-coated beads may be purchased from Dynal, Oslo. Of course, this same linking chemistry is applicable to coating any surface with streptavidin. Biotinylated probes may be purchased from various sources, such as, e.g., Operon Technologies (Alameda, CA).

Nunc Laboratories (Naperville, IL) is also selling suitable material that could be used. Nunc Laboratories have developed a method by which DNA can be covalently bound to the microwell surface termed CovaLink NH. CovaLink NH is a polystyrene surface grafted with secondary amino groups (>NH) that serve as bridge-heads for further covalent coupling. CovaLink Modules may be purchased from Nunc Laboratories. DNA molecules may be bound to CovaLink exclusively at the 5'-end by a phosphoramidate bond, allowing immobilization of more than 1 pmol of DNA [Rasmussen *et al.*, *Anal. Biochem.*, 198(1):138-42 (1991).]

The use of CovaLink NH strips for covalent binding of DNA molecules at the 5'-end has been described [Rasmussen *et al.*, 1991]. In this technology, a phosphoramidate bond is employed [Chu *et al.*, *Nucleic Acids*, 11(18):6513-29 (1983)]. This is beneficial as immobilization using only a single covalent bond is preferred. The phosphoramidate bond joins the DNA to the CovaLink NH secondary amino groups that are positioned at the end of

spacer arms covalently grafted onto the polystyrene surface through a 2 nm long spacer arm. To link an oligonucleotide to CovaLink NH via an phosphoramidate bond, the oligonucleotide terminus must have a 5'-end phosphate group. It is, perhaps, even possible for biotin to be covalently bound to CovaLink and then streptavidin used to bind the probes.

More specifically, the linkage method includes dissolving DNA in water (7.5 ng/ul) and denaturing for 10 min. at 95°C and cooling on ice for 10 min. Ice-cold 0.1 M 1-methylimidazole, pH 7.0 (1-Melm₇), is then added to a final concentration of 10 mM 1-Melm₇. A ssDNA solution is then dispensed into CovaLink NH strips (75 ul/well) standing on ice.

Carbodiimide 0.2 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), dissolved in 10 mM 1-Melm₇, is made fresh and 25 ul added per well. The strips are incubated for 5 hours at 50°C. After incubation the strips are washed using, e.g., Nunc-Immuno Wash; first the wells are washed 3 times, then they are soaked with washing solution for 5 min., and finally they are washed 3 times (where in the washing solution is 0.4 N NaOH, 0.25% SDS heated to 50°C).

It is contemplated that a further suitable method for use with the present invention is that described in PCT Patent Application WO 90/03382 (Southern & Maskos), incorporated herein by reference. This method of preparing an oligonucleotide bound to a support involves attaching a nucleoside 3'-reagent through the phosphate group by a covalent phosphodiester link to aliphatic hydroxyl groups carried by the support. The oligonucleotide is then synthesized on the supported nucleoside and protecting groups removed from the synthetic oligonucleotide chain under standard conditions that do not cleave the oligonucleotide from the support. Suitable reagents include nucleoside phosphoramidite and nucleoside hydrogen phosphorate.

An on-chip strategy for the preparation of DNA probe for the preparation of DNA probe arrays may be employed. For example, addressable laser-activated photodeprotection may be employed in the chemical synthesis of oligonucleotides directly on a glass surface, as described by Fodor *et al.*, Science, 251(4995):767-73, incorporated herein by reference. Probes may also be immobilized on nylon supports as described by Van Ness *et al.*, Nucleic Acids Res., 19(12): 3345-50 (1991); or linked to Teflon using the method of Duncan & Cavalier, Anal. Biochem., 169(1):104-8 (1988); all references being specifically incorporated herein.

To link an oligonucleotide to a nylon support, as described by Van Ness *et al.*, (1991), requires activation of the nylon surface via alkylation and selective activation of the 5'-amine of oligonucleotides with cyanuric chloride.

One particular way to prepare support bound oligonucleotides is to utilize the light-generated synthesis described by Pease *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 91(11):5022-6 (1994). These authors used current photolithographic techniques to generate arrays of immobilized oligonucleotide probes (DNA chips). These methods, in which light is used to direct the synthesis of oligonucleotide probes in high-density, miniaturized arrays, utilize photolabile 5'-protected *N*-acyl-deoxynucleoside phosphoramidites, surface linker chemistry and versatile combinatorial synthesis strategies. A matrix of 256 spatially defined oligonucleotide probes may be generated in this manner.

4.18 PREPARATION OF NUCLEIC ACID FRAGMENTS

The nucleic acids may be obtained from any appropriate source, such as cDNAs, genomic DNA, chromosomal DNA, microdissected chromosome bands, cosmid or YAC inserts, and RNA, including mRNA without any amplification steps. For example, Sambrook *et al.*, (1989) describes three protocols for the isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells (p. 9.14-9.23).

DNA fragments may be prepared as clones in M13, plasmid or lambda vectors and/or prepared directly from genomic DNA or cDNA by PCR or other amplification methods. Samples may be prepared or dispensed in multiwell plates. About 100-1000 ng of DNA samples may be prepared in 2-500 µl of final volume.

The nucleic acids would then be fragmented by any of the methods known to those of skill in the art including, for example, using restriction enzymes as described at 9.24-9.28 of Sambrook *et al.*, (1989), shearing by ultrasound and NaOH treatment.

Low pressure shearing is also appropriate, as described by Schriefer *et al.*, Nucleic Acids Res., 18(24):7455-6 (1990). In this method, DNA samples are passed through a small French pressure cell at a variety of low to intermediate pressures. A lever device allows controlled application of low to intermediate pressures to the cell. The results of these studies indicate that low-pressure shearing is a useful alternative to sonic and enzymatic DNA fragmentation methods.

One particularly suitable way for fragmenting DNA is contemplated to be that using the two base recognition endonuclease, *CviJI*, described by Fitzgerald *et al.*, Nucleic Acids

Res., 20(14): 3753-62 (1992). These authors described an approach for the rapid fragmentation and fractionation of DNA into particular sizes that they contemplated to be suitable for shotgun cloning and sequencing.

The restriction endonuclease *Cvi*II normally cleaves the recognition sequence PuGCPy between the G and C to leave blunt ends. Atypical reaction conditions, which alter the specificity of this enzyme (*Cvi*II**), yield a quasi-random distribution of DNA fragments from the small molecule pUC19 (2688 base pairs). Fitzgerald *et al.* (1992) quantitatively evaluated the randomness of this fragmentation strategy, using a *Cvi*II** digest of pUC19 that was size fractionated by a rapid gel filtration method and directly ligated, without end repair, to a lac Z minus M13 cloning vector. Sequence analysis of 76 clones showed that *Cvi*II** restricts pyGCPy and PuGCPu, in addition to PuGCPy sites, and that new sequence data is accumulated at a rate consistent with random fragmentation.

As reported in the literature, advantages of this approach compared to sonication and agarose gel fractionation include: smaller amounts of DNA are required (0.2-0.5 ug instead of 2-5 ug); and fewer steps are involved (no religation, end repair, chemical extraction, or agarose gel electrophoresis and elution are needed).

Irrespective of the manner in which the nucleic acid fragments are obtained or prepared, it is important to denature the DNA to give single stranded pieces available for hybridization. This is achieved by incubating the DNA solution for 2-5 minutes at 80-90°C. The solution is then cooled quickly to 2°C to prevent renaturation of the DNA fragments before they are contacted with the chip. Phosphate groups must also be removed from genomic DNA by methods known in the art.

4.19 PREPARATION OF DNA ARRAYS

Arrays may be prepared by spotting DNA samples on a support such as a nylon membrane. Spotting may be performed by using arrays of metal pins (the positions of which correspond to an array of wells in a microtiter plate) to repeated by transfer of about 20 nl of a DNA solution to a nylon membrane. By offset printing, a density of dots higher than the density of the wells is achieved. One to 25 dots may be accommodated in 1 mm², depending on the type of label used. By avoiding spotting in some preselected number of rows and columns, separate subsets (subarrays) may be formed. Samples in one subarray may be the same genomic segment of DNA (or the same gene) from different individuals, or may be

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

107

different, overlapped genomic clones. Each of the subarrays may represent replica spotting of the same samples. In one example, a selected gene segment may be amplified from 64 patients. For each patient, the amplified gene segment may be in one 96-well plate (all 96 wells containing the same sample). A plate for each of the 64 patients is prepared. By using a 96-pin device, all samples may be spotted on one 8 x 12 cm membrane. Subarrays may contain 64 samples, one from each patient. Where the 96 subarrays are identical, the dot span may be 1 mm² and there may be a 1 mm space between subarrays.

Another approach is to use membranes or plates (available from NUNC, Naperville, Illinois) which may be partitioned by physical spacers e.g. a plastic grid molded over the membrane, the grid being similar to the sort of membrane applied to the bottom of multiwell plates, or hydrophobic strips. A fixed physical spacer is not preferred for imaging by exposure to flat phosphor-storage screens or x-ray films.

The present invention is illustrated in the following examples. Upon consideration of the present disclosure, one of skill in the art will appreciate that many other embodiments and variations may be made in the scope of the present invention. Accordingly, it is intended that the broader aspects of the present invention not be limited to the disclosure of the following examples. The present invention is not to be limited in scope by the exemplified embodiments which are intended as illustrations of single aspects of the invention, and compositions and methods which are functionally equivalent are within the scope of the invention. Indeed, numerous modifications and variations in the practice of the invention are expected to occur to those skilled in the art upon consideration of the present preferred embodiments. Consequently, the only limitations which should be placed upon the scope of the invention are those which appear in the appended claims.

All references cited within the body of the instant specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

5. EXAMPLES

EXAMPLE 1

ISOLATION OF SEQ ID NO:1 - 21 FROM A cDNA LIBRARIES OF HUMAN CELLS

A plurality of novel nucleic acids were obtained from a cDNA library prepared from human fetal liver spleen, ovary, adult brain, lung tumor, spinal cord, cervix, ovary, endothelial cells, umbilical cord, lymphocyte, lung fibroblast, fetal brain, and testis, using

standard PCR, sequencing by hybridization sequence signature analysis, and Sanger sequencing techniques. The inserts of the library were amplified with PCR using primers specific for vector sequences flanking the inserts. These samples were spotted onto nylon membranes and interrogated with oligonucleotide probes to give sequence signatures. The clones were clustered into groups of similar or identical sequences, and single representative clones were selected from each group for gel sequencing. The 5' sequence of the amplified inserts was then deduced using the reverse M13 sequencing primer in a typical Sanger sequencing protocol. PCR products were purified and subjected to fluorescent dye terminator cycle sequencing. Single-pass gel sequencing was done using a 377 Applied Biosystems (ABI) sequencer. These inserts were identified as a novel sequence not previously obtained from this library and not previously reported in public databases. These sequences are designated as SEQ ID NO: 1-21 in the attached sequence listing.

EXAMPLE 2

ASSEMBLAGE OF SEQ ID NO: 22 and 24

The novel nucleic acids (SEQ ID NO: 22 and 24) of the invention were assembled from sequences that were obtained from a cDNA library by methods described in Example 1 above. The final sequences were assembled using the EST sequences as seed. Then a recursive algorithm was used to extend the seed into an extended assemblage, by pulling additional sequences from Hyseq's database containing EST sequences that belong to this assemblage. The algorithm terminated when a complete contig was assembled. Inclusion of component sequences into the assemblage was based on a BLASTN hit to the extending assemblage with BLAST score greater than 300 and percent identity greater than 95%.

The nearest neighbor result for the assembled sequence (SEQ ID NO: 22 or 24) was obtained by a FASTA version 3 search against Genpept release 114, using Fastxy algorithm. Fastxy is an improved version of FASTA alignment which allows in-codon frame shifts. The nearest neighbor result showed the closest homologue for each assemblage from Genpept (and contains the translated amino acid sequences for which the assemblage encodes). The nearest neighbor result is set forth below:

Accession No.	Description	Smith-Waterman Score	% Identity
Z35597	Unknown weak similarity with	760	36.188

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

109

	sea squirt nidogen precursor protein (blastp score 71); cDNA EST EMBL:		
--	--	--	--

Polypeptides were predicted to be encoded by SEQ ID NO: 22 (or 24) as set forth below. The polypeptides were predicted using a software program called FASTY (available from <http://fasta.bioch.virginia.edu>) which selects a polypeptide based on a comparison of translated novel polynucleotide to known polypeptides (W.R. Pearson, Methods in Enzymology, 183: 63-98 (1990), herein incorporated by reference).

Predicted beginning nucleotide location correspond-ing to first amino acid residue of amino acid segment	Predicted end nucleotide location correspond-ing to last amino acid residue of amino acid segment	Amino acid composition of the polypeptide encoded, wherein, (A=Alanine, C=Cysteine, D=Aspartic Acid, E= Glutamic Acid, F=Phenylalanine, G=Glycine, H=Histidine, I=Isoleucine, K=Lysine, L=Leucine, M=Methionine, N=Asparagine, P=Proline, Q=Glutamine, R=Arginine, S=Serine, T=Threonine, V=Valine, W=Tryptophan, Y=Tyrosine, X=Unknown, *=Stop Codon, /=possible nucleotide deletion, \=possible nucleotide insertion)
2669	1388	PRVRPRVRTDHNYYISRIYGPSDSASRDLWV NIDQMEKDKVKIHGLSNTHRQAARVNLSFD FPFYGHFLREITVATGGFIYTGEVVHRMLTA TQYIAPLMANFDPSVSRNSTVRYFDNGTALV VQWDHVHLQDNYNLGSFTFQATLLMDGRII FGYKEIPVLVTQISSTNHPVKVGLSDAFVVV HRIQQIPNVRRTIYIYHRVELQMSKITNISA VEMTPLPTCLQFNRCGPCVSSQIGFNCWC KLQRCSSGFDRHRQDWVDSGCPESKEKMC ENTEPVETVLEPPQP*ERQPPSSGS*LPPE/DA VTSQFPTSLPTEDDTKIALHLKDNGASTDDS

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

110

		AAEKKGGTLHAGLVGILVLIVATAILVTV YMYHHPTSAAASIFFIERRPSRWPAMKFRRGS GHPAYAEVEPVGEGEFIVSEQC (SEQ ID NO: 35)
--	--	--

EXAMPLE 3**ASSEMBLAGE OF SEQ ID NO: 27**

The novel nucleic acid (SEQ ID NO: 27) of the invention was initially assembled from sequences that were obtained from a cDNA library by methods described in Example 1 above. The final sequence was assembled using the EST sequences as seed. Then a recursive algorithm was used to extend the seed into an extended assemblage, by pulling additional sequences from Hyseq's database containing EST sequences that belong to this assemblage. The algorithm terminated when a complete contig was assembled. Inclusion of component sequences into the assemblage was based on a BLASTN hit to the extending assemblage with BLAST score greater than 300 and percent identity greater than 95%.

Using this initial sequence, suitable primers were designed for amplification of ESTs that comprise the initial sequence. The products were cloned. The DNA was isolated, cut with appropriate restriction enzymes, ligated, and recloned to generate the full-length contig. The full-length product was then cloned and sequenced using 377 Applied Biosystems (ABI) sequencer. This nucleotide sequence is identical to SEQ ID NO: 27.

Alternatively, the full-length stem cell factor-like DNA was PCR amplified using appropriate primers from Marathon-ready spleen cDNA library (Clontech). The primary PCR product was further amplified using nested PCR primers. The product of the second PCR was sequenced using 377 Applied Biosystems (ABI) sequencer. This product is identical to SEQ ID NO: 27.

EXAMPLE 4**ASSEMBLAGE OF SEQ ID NO: 23 and 25**

Using PHRAP (Univ. of Washington), full-length gene cDNA sequences and the corresponding protein sequences were generated from the assemblage. Any frame shifts and incorrect stop codons were corrected by hand editing. During editing, the sequence was checked using FASTY and/or BLAST against Genbank (i.e. Genept release 115). Other

computer programs, which may have been used in the editing process, were phredPhrap and Consed (University of Washington) and ed-ready, ed-ext and cg-zip-2 (Hyseq, Inc.).

A polypeptide (SEQ ID NO: 28) was predicted to be encoded by SEQ ID NO: 27 as set forth below. The polypeptide was predicted using a software program called BLASTX which selects a polypeptide based on a comparison of translated novel polynucleotide to known polynucleotides. The initial methionine starts at position 123 of SEQ ID NO: 3 and the putative stop codon, TAA, begins at position 1710 of the nucleotide sequence.

The stem cell growth factor-like polypeptide of SEQ ID NO: 28 is an approximately 529-amino acid protein with a predicted molecular mass of approximately 59.2-kDa, unglycosylated. Protein database searches with the BLASTP algorithm [Altschul S.F. et al., *J. Mol. Evol.*, 36:290-300 (1993) and Altschul S.F. et al., *J. Mol. Biol.*, 21:403-10 (1990), herein incorporated by reference] indicate that SEQ ID NO: 28 is homologous to tumor endothelial marker 7 precursor protein.

Figure 2 shows the BLASTX amino acid sequence alignment between the protein encoded by stem cell growth factor-like polypeptide SEQ ID NO: 28 and tumor endothelial marker 7 precursor protein SEQ ID NO: 36 [St. Croix et al, *Science*, 289:1197-1201] indicating that the two sequences share 72% similarity over 441 amino acid residues and 57% identity over the same 441 amino acid residues.

A predicted approximately thirty-residue signal peptide is encoded from approximately residue 1 through residue 30 of SEQ ID NO: 28 (SEQ ID NO: 30). The extracellular portion is useful on its own. This can be confirmed by expression in mammalian cells and sequencing of the cleaved product. The signal peptide region was predicted using Neural Network SignalP V1.1 program [Nielsen et al, *Int. J. Neur. Syst.*, 8:581 (1997)] (from Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmark), and hydrophobicity analysis using the Kyte/Doolittle algorithm [Kyte and Doolittle (1982) *J. Mol. Biol.*, 157:105]. One of skill in the art will recognize that the cleavage site may be different than that predicted by the computer program. SEQ ID NO: 31 is the peptide resulting when the signal peptide is removed from SEQ ID NO: 28.

A predicted approximately twenty eight-residue transmembrane region is encoded from approximately residue 452 through residue 479 of SEQ ID NO: 28 (SEQ ID NO: 32). It may be confirmed by expression in mammalian cells. The transmembrane region was predicted using Neural Network SignalP V1.1 program [Nielsen et al., *Int. J. Neur. Syst.*,

8:581 (1997)] (from Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmark), and hydrophobicity analysis using the Kyte/Doolittle algorithm [Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157:105 (1982)]. One of skill in the art will recognize that the transmembrane region may be different than that predicted by the computer program.

A polypeptide (SEQ ID NO: 25) was predicted to be encoded by SEQ ID NO: 24 as set forth below. The polypeptide was predicted using a software program called BLASTX which selects a polypeptide based on a comparison of translated novel polynucleotide to known polynucleotides. The initial methionine starts at position 107 of SEQ ID NO:24 and the putative stop codon, TAA, begins at position 1280 of the nucleotide sequence.

The stem cell growth factor-like polypeptide of SEQ ID NO: 25 (identical to SEQ ID NO: 23) is an approximately 392-amino acid protein with a predicted molecular mass of approximately 50-kDa unglycosylated. Protein database searches with the BLASTP algorithm [Altschul S.F. et al., J. Mol. Evol., 36:290-300 (1993) and Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 21:403-10 (1990), herein incorporated by reference] indicate that SEQ ID NO: 25 is homologous to tumor endothelial marker 7 precursor protein.

A predicted approximately twenty eight-residue transmembrane region is encoded from approximately residue 315 through residue 342 of SEQ ID NO: 25 (SEQ ID NO: 32). It may be confirmed by expression in mammalian cells. The transmembrane region was predicted using Neural Network SignalP V1.1 program [Nielsen et al., Int. J. Neur. Syst., 8:581 (1997)] (from Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmark), and hydrophobicity analysis using the Kyte/Doolittle algorithm [Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157:105 (1982)]. One of skill in the art will recognize that the transmembrane region may be different than that predicted by the computer program.

EXAMPLE 5

A. CLONING AND EXPRESSION OF SOLUBLE STEM CELL FACTOR-LIKE POLYNUCLEOTIDE (SEQ ID NO: 33) AND POLYPEPTIDE (SEQ ID NO: 34)

In order to express soluble stem cell factor-like polypeptide, the full-length stem cell factor-like DNA was PCR amplified from Marathon-ready spleen cDNA library (Clontech). The primary PCR product was further amplified using nested PCR primers that would generate soluble stem cell factor-like polypeptide when expressed in suitable cell lines. The product of the secondary PCR (SEQ ID NO: 33) was cloned in pCDNA3.1/Myc-His (+) A

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

113

between EcoRI and XhoI sites. The plasmid encoding soluble stem cell factor-like polypeptide and control vectors were transfected into CHO cells using FuGENE-6 transfection reagent (Roche). Culture medium, cell lysate and the insoluble cell debris fractions were analyzed by SDS-PAGE followed by western blotting with anti myc antibodies. As expected, more than 95% of the soluble stem cell factor-like polypeptide (SEQ ID NO: 34) was found to be secreted and present in the culture medium.

Using similar approach, stable lines of 293 cells expressing SEQ ID NO: 34 are also generated. These were further cloned to select high, moderate and low expressors.

**B. EXPRESSION AND PURIFICATION OF SEQ ID NO: 34
FROM INSECT AND BACTERIAL CELLS**

Stem cell factor-like protein was expressed in insect cells as follows.

The C-terminal transmembrane domain truncated version of stem cell factor-like gene (SEQ ID NO: 33) was cloned by PCR into a pIB/V5-His TOPO TA cloning vector (Invitrogen Corporation). The stem cell factor-like DNA in the vector was generated either with a Myc/His tag or without any tags. Insect cells (High Five TM, Invitrogen) were transfected with the stem cell growth factor-like plasmid DNA containing the tag by using the InsectSelectTM System (Invitrogen). The expression of the stem cell growth factor-like protein was determined by transient expression. The medium containing expressed stem cell growth factor-like protein was separated on SDS-PAGE and stem cell growth factor-like protein was identified by Western blot analysis. For large-scale production of stem cell growth factor-like protein, resistant cells were expanded into flasks containing Ultimate InsectTMSerum-Free medium (Invitrogen). The cells were shaken at ~100 mph at 27 °C for 4 days. The conditioned media containing the protein for purification were collected by centrifugation.

Stem cell factor-like protein was expressed in bacterial cells as follows:

The mature stem cell growth factor-like gene without the transmembrane domain (SEQ ID NO: 33) was cloned into an expression vector (PCR T7/NT-TOPO) from Invitrogen. The resulting plasmid was expressed in *E.coli* BL-21 (DE 3) pLys strain. Cells were grown in LB broth containing ampicillin (100 mg/mL) at 37 °C. Expression of stem cell growth factor-like protein was then induced with IPTG (1 mM final concentration), and cells

were grown for an additional 4 hours and harvested. Analysis of stem cell growth factor-like production by SDS-PAGE and Western blotting was done as detailed above.

Purification of stem cell growth factor-like protein from insect cell cultures was carried out as follows. Insect Ultimate medium containing the His-tagged stem cell growth factor-like was to pH 7.5 by adding appropriate quantity of 1M NaOH. The solution was then supplemented with 1 mM PMSF (final concentration) to prevent the proteolytic cleavage during the purification process. The medium was passed through a 0.2 micron filter (Nalgene Surfactant Free Cellulose Acetate 1000 mL sterile filter unit) to remove particulate material. The resulting solution was concentrated 10-fold and simultaneously equilibrated with 20 mM sodium phosphate, pH 7.5 using a diafiltration cartridge with a membrane cut off size of 10 kDa. The 10-fold concentrated and diafiltered media was loaded onto a Ni-NTA column equilibrated with 20 mM sodium phosphate, pH 7.5. Unretained components were removed by washing the column with 20 mM sodium phosphate pH 7.5 containing 300 mM NaCl and 20 mM Imidazole. The His-tagged stem cell growth factor-like protein was eluted with the same buffer and a linear gradient of imidazole (20-300 mM). The eluted protein was identified as described above. The pooled fractions containing stem cell growth factor-like were equilibrated with PBS buffer using Amicon stircell with a membrane cut off size of 10 kDa. This process also resulted in the removal of imidazole. The protein was then concentrated to approximately 10 mg/mL in PBS buffer for functional studies.

Purification of stem cell growth factor-like protein from bacterial cultures was carried out as follows. *E. coli* cells expressing stem cell growth factor-like as inclusion bodies were extracted with 10 volumes (wt/vol) of extraction buffer (50 mM NaPO₄, pH 7.0) and further with buffer containing 6M guanidine hydrochloride in the extraction buffer. The solubilized stem cell growth factor-like protein was fractionated on a Ni-NTA column as described above. The unfolded version of stem cell growth factor-like protein obtained from this affinity purification was allowed to attain a native conformation by incubation with a refolding buffer consisting of DTT and glutathione. Refolded sample was equilibrated with 20mM Tris, 0.1% Tween and concentrated to 100mL (10x conc.) prior to fast-flow liquid chromatography on ion-exchangers Q-sepharose and SP-sepharose. Additional protocols were also developed for appropriate refolding conditions using 8M urea instead of 6M guanidine hydrochloride.

EXAMPLE 6

EXPRESSION OF SEQ ID NO: 33 IN PRIMARY HUMAN CELLS

The product of the secondary nested PCR from Marathon spleen library amplification encoding a stem cell growth factor-like polypeptide was cloned into (described in Example 3) MSCV retroviral vector (Clontech) at suitable cloning sites using appropriate forward and reverse PCR primers. The retroviral vector was then transfected (using FUGENE-6 transfection reagent) into packaging cell lines to produce large quantities of retrovirus comprising the stem cell growth factor-like DNA. Retrovirus-containing supernatants were prepared from the packaged cell lines and mixed with stromal cells and upon retrovirus transduction, the transduced stromal cells expressed the stem cell growth factor-like protein were analyzed as follows.

A. Liquid Culture Assay: Hematopoietic stem cells are either commercially purchased or purified using the manufacturer's suggested protocol. Approximately 1×10^4 stem cells were plated in a 96-well plate together with supernatants from the stromal cells expressing stem cell factor-like protein (SEQ ID NO: 33), or stromal cells expressing control vector. Cultures were microscopically examined and counted every day. As can be seen in Figures 3A and 3B, supernatants from stromal cells expressing stem cell factor-like polypeptide caused a significant increase in total cell count and colony number of hematopoietic stem cells. The experiment was repeated twice. The average increase in cell number was 2.5 fold (Figure 3A) while the increase in colony count was 1.54 fold (Figure 3B). The following table summarizes the results of each independent experiment.

Source of protein	Growth and morphological change in hematopoietic stem cells
Experiment 1	
Supernatant from Stem cell factor-like (SEQ ID NO: 33)-transduced stromal cells	(+)
Control vector-transduced stromal cells	(-)
Experiment 2	
Supernatant from Stem cell factor-	(+)

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

116

like (SEQ ID NO: 33)-transduced stromal cells	
Control vector-transduced stromal cells	(-)

B. Stromal cell-associated Culture Assay: Stromal cells from suitable tissues were obtained from commercial vendors. Approximately 1×10^6 murine hematopoietic stem cells were co-cultured with 1×10^4 transduced or control stromal cells. For certain experiments, supernatants from transduced stromal cells were added to the co-culture of stem cells and wild type stromal cells. Cultures were microscopically examined and counted every day. As can be seen in the Figures 4A and 4B, stromal cells expressing the stem cell factor-like polypeptide caused an increase in total cell count and colony number of hematopoietic stem cells. The experiment was repeated four times. The average increase in cell number was 3.2 fold (Figure 4A) while the increase in colony count was 3 fold (Figure 4B). The following table summarizes the results of each independent experiment.

Source of stromal cells	Growth and morphological change in hematopoietic stem cells
Experiment 1	
Stem cell factor-like (SEQ ID NO: 33)-transduced stromal cells	(+)
Control vector-transduced stromal cells	(-)
Experiment 2	
Stem cell factor-like (SEQ ID NO: 33)-transduced stromal cells	(+)
Control vector-transduced stromal cells	(-)
Experiment 3	
Stem cell factor-like (SEQ ID NO: 33)-transduced stromal cells	(+)
Control vector-transduced	(-)

stromal cells	
Experiment 4	
Supernatant from stem cell factor-like (SEQ ID NO: 33)-transduced stromal cells + wild type stromal cells	(+)
Supernatant from control vector-transduced stromal cells + wild type stromal cells	(-)

C. Stroma-associated Culture Assay: Stromal cells from suitable tissues are obtained from commercial vendors. Approximately 1×10^4 stem cells are co-cultured with 1×10^4 transduced stromal cells. Cultures are microscopically observed and counted every day, and flow cytometry staining is performed to determine cell lineage differentiation.

EXAMPLE 7

EXPRESSION STUDY USING SEQ ID NO: 1-22, 24, 26-27, 29, OR 33

The expression of SEQ ID NO: 1-22, 24, 26-27, 29, 33 in various tissues is analyzed using a semi-quantitative polymerase chain reaction-based technique. Human cDNA libraries are used as sources of expressed genes from tissues of interest (including, for example adult bladder, adult brain, adult heart, adult kidney, adult lymph node, adult liver, adult lung, adult ovary, adult placenta, adult rectum, adult spleen, adult testis, bone marrow, thymus, thyroid gland, fetal kidney, fetal liver, fetal liver-spleen, fetal skin, fetal brain, fetal leukocyte and macrophage). Gene-specific primers are used to amplify portions of SEQ ID NO: 1-22, 24, 26-27, 29, or 33 sequences from the samples. Amplified products are separated on an agarose gel, transferred and chemically linked to a nylon filter. The filter is then hybridized with a radioactively labeled (^{32}P -dCTP) double-stranded probe generated from SEQ ID NO: 1-22, 24, 26-27, 29, or 33 using a Klenow polymerase, random-prime method. The filters are washed (high stringency) and used to expose a phosphorimaging screen for several hours. Bands indicate the presence of cDNA including SEQ ID NO: 1-22, 24, 26-27, 29, or 33 sequences in a specific library, and thus mRNA expression in the corresponding cell type or tissue.

EXAMPLE 8**ISOLATION OF SEQ ID NO: 37 MOUSE GENE (#2728) FRAGMENT**

Total RNA was prepared from mouse AGM-S3-A9 cells (1.4×10^8 cells) in 20 mL of ISOGEN (Nippon Gene Co., Ltd., Japan) according to the package insert leaflet. Messenger RNA was purified from total RNA (1 mg) according to the protocol for a mRNA purification kit (Amersham Pharmacia, Inc., U.S.A.). The cDNA was synthesized from the messenger RNA by SuperScript Plasmid System (GIBO Lifetech, Inc., U.S.A.) primed with oligo dT, and inserted into pSPORT1 (GIBO Lifetech, Inc., U.S.A.). An AGM-S3-A9 cell-specific cDNA was obtained from the library by the SBH method (Hyseq, Inc., U.S.A.). The nucleotide sequence of the clone obtained was determined by ABI377 DNA sequencer (Perkin Elmer, Inc., U.S.A.). The sequence was analyzed by a homology search method, so that the mouse gene (#2728) was identified as a novel one. The nucleotide sequence obtained corresponded to the nucleotides number 1499 to 2857 of SEQ ID No. 37.

EXAMPLE 9**CLONING OF SEQ ID NO: 37 FULL LENGTH MOUSE GENE (#2728)**

Total RNA was prepared from AGM-S3-A9 cells (1.4×10^8 cells) in 20 mL ISOGEN (Nippon Gene Co., Ltd., Japan) according to the package insert leaflet. Messenger RNA was purified from total RNA (1 mg) according to the protocol for mRNA purification kit (Amersham Pharmacia, Inc., U.S.A.). The cDNA library was constructed from 2 mg of messenger RNA prepared by SMART cDNA library construction kit (CLONTECH, Inc., U.S.A.) according to the package insert leaflet. The library contained about 400,000 independent clones and was divided into 15 fractions. PCR was performed using each fraction under the following conditions to identify the fractions containing #2728 cDNA.

The following primers were synthesized on the basis of the sequence of mouse #2728 partial gene fragment obtained in Example 8. Using each fraction of AGM-S3-A9 cDNA library as the template, PCR was performed in 35 cycles, each cycle consisting of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C and 1 min at 72°C.

Primer #2728F: AGCAAATACCCAATGTTTCGAA (1744-1764) (SEQ ID NO: 41)

Primer #2728R: AGATGTCACAGCTCTCCTGGT (2100-2120) (SEQ ID NO: 42)

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

119

PCR products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis, and the fractions in which PCR products had an expected size exists were identified. Two positive fractions were seeded on two dishes each (15 cm in diameter with 50,000 plaques) and incubated for 10 hr at 37°C. Plaques in one dish each were transferred into a nylon filter, Biotryne (Pall, Inc, U.S.A.), and DNA on the nylon filters was immobilized by UV crosslinking. Screening was performed using a ³²P-labeled DNA probe.

The probe was prepared as follows using #2728R and T7 as the primers with a plasmid containing the mouse #2728 partial gene fragment as the template. PCR was performed at 35 cycles, each cycle consisting of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C and 1 min at 72°C. PCR products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis, and the amplified fragment was purified by JETSORB (Genomed, GER). A ³²P-labeled DNA probe was prepared by Megaprime labeling kit (Amersham Pharmacia, Inc., U.S.A) with 25 ng of the PCR amplified fragment as the template.

Primer T7: TAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID NO: 43)

Hybridization with ExpressHYbSolution (CLONTECH, Inc., U.S.A) and washing were performed according to the package insert leaflet. The hybridized nylon filter was exposed to an X-ray film (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan) for 1 day. The X-ray film was developed by Fuji film auto-developer. A single plaque having the highest signal intensity was taken out from the dish and seeded again on a dish (10 cm in diameter) to produce about 200 plaques. Screening was performed again by the method described above, and a single positive plaque was isolated. The phage clone obtained was used to infect *Escherichia coli* BM 25.8 according to the package insert leaflet for SMART cDNA library construction kit. The single colony infected was inoculated into 3 mL of LB medium containing 100 µg/mL of ampicillin and incubated at 30°C overnight. About 10 mg of plasmid was purified from the cultured cells using RPM Kit (BIO 101, Inc., U.S.A.).

The sequence at 5' end of the inserted DNA fragment was determined using 1 Triplex5'LD-Insert Screening Amplimer primer (CLONTECH, Inc., U.S.A.) by ABI377DNA sequencer. The nucleotide sequence of the inserted DNA fragment was found to begin with the nucleotide at position 890 of SEQ ID NO: 37. Furthermore, the full length sequence of the inserted DNA fragment was determined by ABI377DNA sequencer and

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

120

found to include nucleotides 890 to 2857 in SEQ ID NO: 37.

Amplimer Primer: CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT (SEQ ID NO: 44)

Furthermore, a primer, #2728 RACE1 (sequence 923-952) was synthesized on the basis of the sequence obtained. PCR was performed with LA Taq (Takara Shuzo Co., Ltd., Japan) by using #2728RACE1 and M13 Reverse as the primers and pSPORT1AGM-S3A9 cDNA library as the temple under the following conditions: 5 cycles with each consisting of 20 sec at 94°C, 30 sec at 68°C and 4 min at 72°C; 5 cycles with each consisting of 20 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 4 min at 72°C; and 20 cycles with each consisting of 20 sec at 94°C, 30 sec at 55°C and 4 min at 72°C. The amplified fragment was ligated with pGEM-T Easy Vector (Promega, Inc., U.S.A.) and transformed into *Escherichia coli* DH5a. The transformed cells were plated on LB agar medium containing 100 µg/mL of ampicillin. An isolated colony was added to a reaction mixture for PCR (10 µL each) and incubated for 5 min at 94°C. PCR was performed at 35 cycles, with each consisting of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C and 1 min at 72°C, with primers, T7 (SEQ ID NO: 43) and SP6 (SEQ ID NO: 47) at the final concentration of 0.2 mM. PCR products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis to confirm the amplified fragment. *Escherichia coli* from which the PCR amplified fragment was obtained was inoculated into 3 mL of LB medium containing 100 µg/mL of ampicillin and cultured at 37°C overnight. Plasmid was purified from the cultured cells with RPM Kit (BIO 101, Inc., U.S.A.) and about 10 mg of plasmid was obtained. The nucleotide sequence of the clone was determined by ABI377DNA sequencer. The nucleotide sequence obtained was found to be nucleotides 1 to 952 of SEQ ID NO: 37.

RACE1 Primer: AACTGGAACCGGTCTGTAAAAAGTGACAA (SEQ ID NO: 45)

M13 Primer: CAGGAAACAGCTATGAC (SEQ ID NO: 46)

SP6 Primer: GATTTAGGTGACACTATAG (SEQ ID NO: 47)

EXAMPLE 10

CLONING OF HUMAN GENE #2728 (SEQ ID NO: 39)

Based on the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 37, the Genbank gene database was

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

121

searched using the BLAST programs and human EST sequences AI935880, AI052185, AI937502 and AI858126 were found to show homology with mouse #2728 sequence. The following primers were then synthesized based on the sequences of these human ESTs.

H2728F Primer: CATTCCTCCGGCTGCGAGAAAGGA (SEQ ID NO: 48)

H2728R Primer: ATTTCTTTGCAACCCTGCACCTAA (SEQ ID NO: 49)

In an attempt to isolate the human gene cDNA was synthesized from 3 mg of placenta mRNA (CLONTECH, Inc., U.S.A.) using SuperScriptII system (GIBCO-BRL, Inc., U.S.A.) primed with oligo dT primer. PCR was performed using this cDNA as the template, H2728F and H2728R as primers, and Platinum Pfx DNA Polymerase (GIBCO Lifetech, Inc., U.S.A.). The amplified fragment was isolated and ligated into pCR-Biunt vector (Invitrogen, Inc., U.S.A.), and transformed into *Eschericia coli* strain DH5a. The transformed cells were plated onto LB agar medium containing 100 µg/mL of ampicillin and a single colony was isolated. The isolated colony was added to a reaction mixture (10 µL each) and incubated for 5 min at 94°C. PCR was performed in 35 cycles, with each consisting of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C and 2 min at 72°C, with T7 and SP6 primers at the final concentration of 0.2 mM. PCR products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis to confirm the amplified fragment. *Eschericia coli* from which the PCR amplified fragment was obtained was inoculated into 3 mL of LB medium containing 100 µg/mL of ampicillin and incubated at 37°C overnight. Plasmid was purified from the cultured cells with RPM Kit (BIO 101, Inc., U.S.A.), and about 10 mg of plasmid was obtained. The nucleotide sequence of the plasmid insert was determined by ABI377 DNA sequencer, and was confirmed to be a human ortholog of the mouse #2728 sequence. The nucleotide sequence obtained is set out in SEQ ID NO: 39.

EXAMPLE 11

EXPRESSION OF HUMAN AND MOUSE #2728 GENE IN STROMAL

CELLS

A. Preparation of retrovirus vector for expression of mouse #2728 gene

The open reading frame sequence (the nucleotides base number 873 – 2465 in SEQ ID NO: 37) from the mouse #2728 sequence was cloned into a retrovirus vector for expression in stromal cells by the following procedures.

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

122

Messenger RNA was purified from 1 mg of total RNA from AGM-S3-A9 cells using a mRNA purification kit (Amersham Pharmacia, Inc., U.S.A.). The cDNA was synthesized from the messenger RNA using standard methods. Using m2780orfR and m2728orfR primers the cDNA as the template and Platinum Pfx DNA Polymerase (GIBCO Lifetech, Inc., U.S.A.), PCR was performed in 30 cycles with each consisting of 20 sec at 94°C, 30 sec at 55°C and 2 min at 68°C.

m2780orfF: CCGCTCGAGCCACCATGGCAAGGTTCCGGAGGGCCGAC

(SEQ ID NO: 50)

m2728orfR: CGGAATCTTATTGGTTCACCTCTGTCTG (SEQ ID NO: 51)

The amplified fragment was digested with restriction enzymes MfeI (NEW ENGLAND Bio Labs INC., U.S.A.) and XhoI and subjected to an electrophoresis. The DNA fragment was then purified by jETSORB (Genomed, Inc., Germany) and ligated into pMX-IRES-GFP vector (provided from Prof. T. Kitamura, Institute of Medical Science, University of Tokyo) previously digested with EcoRI and XhoI the pMX-IRES-GFP vector was prepared by inserting IRES GFP (Internal Ribosome Entry Site Green Fluorescent Protein) into pMX retrovirus vector. The recombinant vector was transformed into *Escherichia coli* strain DH5a, and the cells were plated on LB agar medium containing 100 µg/mL of ampicillin. An isolated colony was picked and inoculated into 100 mL of LB medium containing 100 µg/mL of ampicillin, and plasmid was purified from the cultured cells using QIAGENtip100 (QIAGEN, Inc., U.S.A.). The sequence of the inserted gene was determined by a usual method, and it was confirmed that the inserted sequence included a portion of SEQ ID NO: 37.

B. Preparation of retrovirus vector for expression of human #2728 gene

The open reading frame sequence (nucleotide 596-2185 in SEQ ID NO: 39) from human ortholog to the mouse #2728 gene was inserted into a retrovirus vector for expression in stromal cells.

First, cDNA was synthesized from 3 µg of placenta mRNA (CLONTECH, Inc., U.S.A.) by using a SuperScriptII system (GIBCO-BRL, Inc., U.S.A.) primed with oligo dT primer. Using primers h2728orfF and h2728orfR, cDNA prepared above as the template and

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

123

Platinum Pfx DNA Polymerase (GIBCO Lifetech, Inc., U.S.A.), PCR was performed in 30 cycles, with each consisting of 20 sec at 94°C, 30 sec at 55°C and 2 min at 68°C.

h2728orfF: ccgctcgagccaccATGGCGAGGTTCCCGAAGGCCGAC (SEQ ID NO:53)

h2728orfR: ccggaattcTTAGCACTGCTCTGATACAATAAA (SEQ ID NO:54)

The amplified fragment was digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI and subjected to an electrophoresis. The amplified DNA fragment was purified by JETSORB (Genomed, Inc., Germany) and ligated into pMX-IRES-GFP vector previously digested with EcoRI and XhoI. The recombinant vector was transformed into *Escherichia coli* strain DH5a, and the cells were plated on LB agar medium containing 100 µg/mL of ampicillin. An isolated colony was picked and inoculated into 100 mL of LB medium containing 100 µg/mL of ampicillin, and the plasmid was purified using QIAGENtip100 (QIAGEN, Inc., U.S.A.). The sequence of the inserted gene was determined by standard methods, and it was confirmed that the inserted sequence included a portion of SEQ ID NO:39.

C. Transfer of mouse #2728 gene into stromal cells

BOSC23 cells (2×10^6 cells) were seeded on a collagen type I coat 60 mm dish (Asahi Techno Glass Co., Ltd.) and incubated in DMEM medium containing 10% FCS at 37°C under 5% CO₂ and 100% humidity, and 12 to 18 hr after incubation, DMEM medium was replaced by 2 mL of OPTI MEM medium (GIBCO BRL, Inc.).

About 3 µg of plasmid encoding the mouse #2728 sequence (prepared as described above) was added to 18 µL of LIPOFECTAMINE Reagent (GIBCO BRL, Inc.) diluted in 100 µL of OPTI MEM medium, and incubated for 30 min at room temperature. This DNA solution was added to the BOSC23 cell culture medium and about 5 hr later, 2 mL of DMEM medium (GIBCO BRL, Inc.) containing 20% FCS was added to the culture medium. Because ribosomes can attach to the middle of mRNA in the (Internal Ribosome Entry Site) IRES, it is possible that two genes can be expressed from one mRNA by connecting a gene to the 5' and 3' ends of the IRES in one transcription unit. In the plasmid prepared above, the cDNA for #2728 gene was inserted 5' to the IRES and the gene encoding for Green Fluorescence Protein (GFP) was inserted 3'. In this system, expression of #2728 gene can be

monitored by detecting the expression of GFP using a fluorescence-activated cell sorter (FACS).

About 24 hrs later, the medium was replaced by 4 mL of DMEM containing 10% FACS, and incubation was continued for about 48 hrs, after which the cultured medium was isolated. The medium was centrifuged at 1200 x g for 16 hrs after filtration through a 0.45 µm filter, and the supernatant was discarded to obtain a virus pellet.

AGM-s3-A9 cells or AGM-S3-A7 cells (1×10^4 cells each) were inoculated and incubated in 1 mL of MEMα medium (GIBCO BRL, Inc.) containing 10% FCS on a 24-well plate (FALCON, Inc.). Twelve to 18 hrs after inoculation, the virus pellet was suspended in 1 mL of MEMα medium containing 10% FCS, and the culture medium for stromal cells was replaced by the virus suspension medium. POLYBRENE (Sigma, Inc., SEQUA-BRENE) was added to the virus suspension medium to a final concentration of 10 µg/mL, and the mixture was incubated at 37°C under 5% CO₂ and 100% humidity after centrifuging the culture plate at 700 x g for 45 min. Forty-eight hrs later, the medium was replaced by 1 mL of MEMα containing 10% FCS, and incubation was continued for 24 hrs. The cultured cells were then subseeded on a 6-well plate (FALCON, Inc.), and incubated in 3 mL of MEMα medium containing 10% FCS. Forty-eight hrs after subseeding, GFP expression in stromal cells was confirmed using FACS (Vantage, Becton Dickinson, Inc.) which showed that 80% or more cells expressed the #2728 gene.

EXAMPLE 12

ISOLATION OF CD34 POSITIVE STEM CELLS FROM HUMAN CORD BLOOD

Human cord blood was obtained according to Standards of Official Conduct Committee at Pharmaceutical Research Laboratories, Kirin Brewery Co., Ltd., using a heparin-added syringe to prevent coagulation. The heparin-treated cord blood was placed on Lymphoprep (NYCOMED PHARMA, Inc.) and centrifuged at 400 x g for 30 min at room temperature to obtain mononuclear cells. Red blood cells in the mononuclear cell fraction were hemolyzed by treating with ammonium chloride buffered solution (0.83% NH₄Cl-Tris-HCl 20 mM, pH 6.8) for 2 min at room temperature. Human IgG (10 mg) was added to the mononuclear cells suspension after washing the cells in PBS-FCS, and the mixture was kept for 10 min under ice-cold condition. The cells were washed in PBS-FCS, biotinylated

antibodies to specific antigens for human differentiated blood cells such as CD2, CD11c (purified from ATCC hybridoma obtained), CD19 (Pharmingen, Inc.), CD15, CD41 (Leinco Technologies, Inc.) and Glycophorin A (Cosmo Bio, Co., Ltd.) were added to the mononuclear cell suspension, and the mixture was kept for 20 min on ice. After washing in PBS-FCS, the cells were resuspended in 1 mL of PBS (PBS-FCS-EDTA- NaN_3) containing 5% FCS, 10 mM EDTA and 0.05% NaN_3 . Streptavidine-conjugated magnetic beads (BioMag, PerSeptive Diagnostics, Inc.) were added to the cell suspension, and the mixture was kept for 40 min on ice. Differentiated blood cells expressing differentiation associated antigens were removed using a magnetic separator (DynaL MPC-1, Dynal, Inc.), and FITC-labeled anti-CD34 antibody (Immunotech S.A., Marseilles, France) was added to the residual differentiated blood cell antigen negative cell fraction. The mixture was incubated for 20 min on ice, and the CD34 positive fraction was isolated by a cell sorter providing a hematopoietic stem cells population.

EXAMPLE 13

COCULTURE OF HUMAN HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND STROMAL CELLS EXPRESSING #2728 HUMAN GENE

AGM-S3-A9 cells, AGM-s3-A7 cells, or AGM-S3-A9 cells or AGM-s3-A7 cells expressing the #2728 gene (1×10^5 cells each) were inoculated on 24-well culture dishes, incubated in MEM α medium containing 10% FCS for 1 day, and grown to confluency the CD34 positive hematopoietic stem cells described above were incubated with the stromal cells described above (500 cells/well), in 1 mL of MEM α medium containing 10% FCS. One week later, an addition 1 mL of the same medium was added to the coculture. After 2 weeks the stromal cells and human blood cells were harvested to evaluate the ability of the stromal cells to support viability of the hematopoietic stem cells as described below.

EXAMPLE 14

EVALUATION OF GROWTH OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND/OR HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS BY COLONY ASSAY

The cocultured cells were assayed in a methylcellulose culture system and evaluated in triplicate. The methyl cellulose culture system was prepared by adding 10 ng/mL of human SCF, human IL-3, human IL-6, human G-CSF and human TPO, and 2 IU/mL EPO to

MethoCult H4230 (Stem Cell Technologies Inc.) and the cultivation was performed on a 6-well culture dish (Falcon, Inc.). The various hematopoietic factors used here were prepared using recombinant techniques to ensure purity. After a 2 week incubation, colonies formed were viewed under a microscopy, and the numbers of CFU-GM (granulocyte-macrophage colony-forming unit), BFU-E (erythroid burst forming unit), and CFU-E mix (erythrocyte mixed colony-forming unit) were counted. The colony forming ability of CD34 positive hematopoietic stem cells cocultured with AGM-s3-A9 expressing mouse #2728 gene is shown in Figure 5. The colony forming ability of CD34 positive hematopoietic stem cells cocultured with AGM-s3-A7 expressing human #2728 gene for is shown in Figure 6 (#2728-2 (007-2)). Increases in the number of human hematopoietic stem cells, BFU-E and CFU-C, in the coculture with AGM-s3-A9 cells expressing the mouse #2728 gene or AGM-s3-A7 cells expressing the human #2728 gene, indicated that the #2728 gene has the ability to support growth and survival of hematopoietic stem cells, directly or indirectly.

EXAMPLE 15

MOUSE HEMATOPOIETIC STEM CELLS ASSAYS

Femoral bone marrow was obtained and suspended in PBS. Mouse bone marrow monocytes were concentrated using a specific gravity centrifugation method and resuspended in buffer for staining (PBS containing 5% FCS and 0.05% NaN₃). The stem cells fraction was obtained from the monocyte suspension according to the method of Osawa, M. et al., Science 273: 242-245, 1996.

FTTC-conjugated CD34 antibody, phycoerythrin-conjugated Sca-1 antibody and allophycocyanin c-Kit (all manufactured at Pharmingen, Inc.), and 6 biotinylated antibodies specific for differentiation associated antigens CD45R, CD4, CD8, Gr-1, Ter119 and CD11c (all manufactured at Pharmingen, Inc.) were added to the bone marrow monocytes suspension, and the mixture was kept in ice for 20 min. The cells were then washed twice in buffer for staining, and CD34 negative, Sca-1 positive, c-Kit positive and Lin negative cells were isolated using FACS (Vantage, Becton Dickinson, Inc.).

Thirty hematopoietic stem cells (CD34 negative, Sca-1 positive, c-Kit positive and Lin negative cells) were cocultured for 7 days with AGM-s3-A9 expressing mouse the #2728 gene. All cells harvested 7 days after cultivation were transplanted into five C57BL/6-Ly5.2 mice (Charles River, Inc., 8 weeks old, male) irradiated with X-ray (8.5 Gy) by injection into

the tail vein together with 2×10^5 total bone marrow cells (derived from a C57 BL/6-Ly5.2 mouse, Charles River, Inc.).

After transplantation, peripheral blood was harvested and analyzed. Distilled water (350 μ L) was added to 50 μ L peripheral blood, and the mixture was incubated for 30 sec to hemolyze. After adding PBS (2-fold concentration), the hemolyzed solution was centrifuged to obtain white blood cells. Anti-CD16 antibody, FITC-conjugated anti-CD45.1 antibody, phycoerythrin-conjugated Gr-1 and CD11c antibodies, and allophycocyanin-conjugated CD90 (Thy 1) and CD45R (B220) antibodies (all antibodies purchased from Pharmingen, Inc.) were incubated with the white blood cells, which had previously been washed once in buffer for staining (PBS containing 5% FCS and 0.05% NaN_3), and the mixture was incubated for 30 min on ice. The incubated cells were again washed in buffer for staining and analyzed by using FACS.

The results are shown in Figure 7A and Figure 7B. The animals transplanted with hematopoietic stem cells cocultured with AGM-s3-A9 cells expressing the #2728 mouse gene showed chimerism at higher rate compared to animals transplanted hematopoietic stem cells cocultured with untransfected AGM-S3-A9 cells or with the cells expressing control vector alone. The higher rate of chimerism was still confirmed in both myeloid cell lineage and lymphoid cell lineage two months after transplantation. The results indicate that hematopoietic stem cells and/or hematopoietic progenitor cells cultured with the #2728 gene-expressing stromal cells, multiplied more vigorously compared to cells which were not contacted with the #2728 gene product. These results, indicated that the #2728 gene product has the ability to enhance survival and growth of hematopoietic stem cells and/or hematopoietic progenitor cells either directly or indirectly.

EXAMPLE 16

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES

Various procedures known in the art may be used for the production of monoclonal antibodies to the polypeptide of the invention and or fragment, derivatives, analog, or homolog thereof. Any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture may be used. These include but are not limited to the trioma technique; the human B-cell hybridoma technique [see Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72] and the EBV hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies [see Cole,

et al., 1985 In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96].
Immortal, antibody-producing cell lines can be created by techniques other than fusion, such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus, e.g., M. Schreier *et al.*, "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling *et al.*, "Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas" (1981); Kennett *et al.*, "Monoclonal Antibodies" (1980); also U.S. Patent Nos. 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,451,570; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632; and 4,493,890.

In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by techniques known in the art, e.g., radioimmunoassay, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, *in situ* immunoassays (using colloidal gold, enzyme or radioisotope labels, for example), Western blots, precipitation reactions, agglutination assays (e.g., gel agglutination assays, hemagglutination assays), complement fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays, etc. Many means are known in the art for detecting binding in an immunoassay and are within the scope of the present invention. For example, to select antibodies which recognize a specific epitope of the polypeptide of the invention, assays generated using hybridomas can be carried out to identify a product which binds to the polypeptide fragment containing such epitope. For selection of an antibody specific to the polypeptide from a particular species of animal, selection is based on detection of positive binding with the polypeptide expressed by or isolated from cells of that species of animal. Specificity of binding by the antibodies is determined using polypeptide of the invention in combination with closely related stem cell factors beyond the scope of the invention.

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

129

CLAIMS

WE CLAIM:

1. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide having stem cell growth factor activity, said polynucleotide comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 27, 29, 33, 37, or 39, the translated protein coding portion thereof, the mature protein coding portion thereof, the extracellular portion thereof, or the active domain thereof.
2. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide with biological activity, which polynucleotide hybridizes to the complement of a polynucleotide of claim 1 under stringent hybridization conditions.
3. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide with biological activity, said polynucleotide having greater than about 90% sequence identity with the polynucleotide of claim 1.
4. The polynucleotide of claim 1 which is a DNA sequence.
5. An isolated polynucleotide which comprises the complement of the polynucleotide of claim 1.
6. A vector comprising the polynucleotide of claim 1.
7. An expression vector comprising the polynucleotide of claim 1.
8. A host cell genetically engineered to express the polynucleotide of claim 1.
9. The host cell of claim 8 wherein the polynucleotide is in operative association with a regulatory sequence that controls expression of the polynucleotide in the host cell.
10. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence which is

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

130

at least 80% identical to the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 28, 30, 31, 32, 34, 38 or 40, the translated protein coding portion thereof, the mature protein coding portion thereof, the extracellular portion thereof, or the active domain thereof.

11. A composition comprising the polypeptide of claim 10 and a carrier.
12. A polypeptide, having stem cell growth factor-like activity, comprising at least ten consecutive amino acids from the polypeptide sequences selected from the group consisting of SEQ ID NO: 28, 30, 31, 32, 34, 38 or 40.
13. The polypeptide of claim 12, comprising at least five consecutive amino acids from the polypeptide sequences selected from the group consisting of SEQ ID NO: 28, 30, 31, 32, 34, 38 or 40.
14. A polynucleotide encoding a polypeptide according to claim 12.
15. A polynucleotide encoding a polypeptide according to claim 13.
16. A polynucleotide encoding a polypeptide according to claim 10.
17. An antibody specific for the polypeptide of claim 10.
18. A method for detecting the polynucleotide of claim 1 in a sample, comprising:
 - a) contacting the sample with a compound that binds to and forms a complex with the polynucleotide of claim 1 for a period sufficient to form the complex; and
 - b) detecting the complex, so that if a complex is detected, the polynucleotide of claim 1 is detected.
19. A method for detecting the polynucleotide of claim 1 in a sample, comprising:
 - a) contacting the sample under stringent hybridization conditions with

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

131

nucleic acid primers that anneal to the polynucleotide of claim 1 under such conditions;

- b) amplifying a product comprising at least a portion of the polynucleotide of claim 1; and
- c) detecting said product and thereby the polynucleotide of claim 1 in the sample.

20. The method of claim 19, wherein the polynucleotide comprises an RNA molecule and the method further comprises reverse transcribing an annealed RNA molecule into a cDNA polynucleotide.

21. A method for detecting the polypeptide of claim 10 in a sample, comprising:

- a) contacting the sample with a compound that binds to and forms a complex with the polypeptide under conditions and for a period sufficient to form the complex; and
- b) detecting formation of the complex, so that if a complex formation is detected, the polypeptide of claim 11 is detected.

22. A method for identifying a compound that binds to the polypeptide of claim 11, comprising:

- a) contacting the compound with the polypeptide of claim 10 under conditions and for a time sufficient to form a polypeptide/compound complex; and
- b) detecting the complex, so that if the polypeptide/compound complex is detected, a compound that binds to the polypeptide of claim 10 is identified.

23. A method for identifying a compound that binds to the polypeptide of claim 10, comprising:

- a) contacting the compound with the polypeptide of claim 10, in a cell, for a time sufficient to form a polypeptide/compound complex, wherein the complex drives expression of a reporter gene sequence in the cell; and
- b) detecting the complex by detecting reporter gene sequence expression, so that if the polypeptide/compound complex is detected, a compound that binds to the

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

132

polypeptide of claim 10 is identified.

24. A method of producing a stem cell growth factor-like polypeptide, comprising,
 - a) culturing the host cell of claim 8 under conditions sufficient to express the polypeptide in said cell; and
 - b) isolating the polypeptide from the cell culture or cells of step (a).
25. A kit comprising the polypeptide of claim 10.
26. A nucleic acid array comprising the polynucleotide of claim 1 or a unique segment of the polynucleotide of claim 1 attached to a surface.
27. The array of claim 26, wherein the array detects full-matches to the polynucleotide or a unique segment of the polynucleotide of claim 1.
28. The array of claim 26, wherein the array detects mismatches to the polynucleotide or a unique segment of the polynucleotide of claim 1.
29. A method of treatment of a subject in need of enhanced activity or expression of stem cell growth factor-like polypeptide of claim 10 comprising administering to the subject a composition selected from the group consisting of:
 - (a) a therapeutic amount of an agonist of said polypeptide;
 - (b) a therapeutic amount of the polypeptide; and
 - (c) a therapeutic amount of a polynucleotide encoding the polypeptide in a form and under conditions such that the polypeptide is produced, and a pharmaceutically acceptable carrier.
30. A method of treatment of a subject having need to inhibit activity or expression of stem cell growth factor-like polypeptide of claim 10 comprising administering to the subject a composition selected from the group consisting of:
 - (d) a therapeutic amount of an antagonist to said polypeptide;

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

133

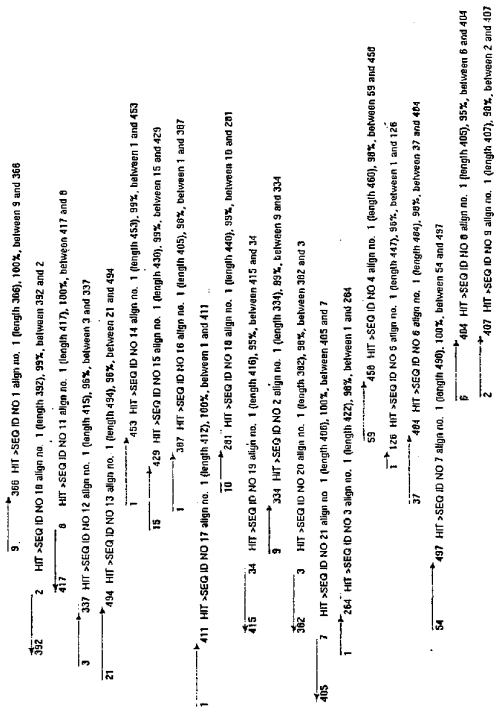
- (e) a therapeutic amount of a polynucleotide that inhibits the expression of the nucleotide sequence encoding said polypeptide;
and
- (f) a therapeutic amount of a polypeptide that competes with the stem cell growth factor-like polypeptide for its ligand and a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/051868

1/13

PCT/IB01/02839

SEQ ID NO 22 2568 bp



length = 502

SOJCC: 482 TTAEVPSGIZAEGFMLEQC 302

FIG. 2

WO 02/051868

3/13

PCT/IB01/02839

BLASTN 2.0a19MP-WashU [05-Feb-1998] [Build sol2.5-ultra 01:47:25 05-Feb-1998]

Reference: Gish, Warren (1994-1997). unpublished.
Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J.
Lipman (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-10.

Notice: this program and its default parameter settings are optimized to find
nearly identical sequences rapidly. To identify weak similarities encoded in
nucleic acid, use BLASTX, TBLASTN or TBLASTX.

Query= temporary sequence
(2668 letters)

Database: temp/seqfile.64767.4560546875
1 sequences; 3095 total letters.

Searching done

	High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:			
temporary sequence	13220	0.0	1

*temporary sequence
Length = 3095

Minus Strand HSPs:

Score = 13220 (1993.5 bits), Expect = 0.0, P = 0.0

Identities = 2644/2644 (100%), Positives = 2644/2644 (100%), Strand = Minus / Plus

Query: 2644 TACAGACCAATTACTATATATCTCGAATATATGGTCCATCTGATTCTGCCAGCCGGGA 2585
|||||
Sbjct: 452 TACAGACCAATTACTATATATCTCGAATATATGGTCCATCTGATTCTGCCAGCCGGGA 511

Query: 2584 TTTATGGGTGAACATAGACCAAAATGGAAAAAGATAAAGTGAAGATTCATGGAAATATGTC 2525
|||||
Sbjct: 512 TTTATGGGTGAACATAGACCAAAATGGAAAAAGATAAAGTGAAGATTCATGGAAATATGTC 571

Query: 2524 CAATACTCATCGGCAAGCTGCAAGAGTGAATCTGTCTTGGATTTTCCATTTTATGGCCA 2465
|||||
Sbjct: 572 CAATACTCATCGGCAAGCTGCAAGAGTGAATCTGTCTTGGATTTTCCATTTTATGGCCA 631

Query: 2464 CTTCCTACGTGAATCACTGTGGCAACCGGGGTTTCATATACACTGGAGAAATCCTACA 2405
|||||
Sbjct: 632 CTTCCTACGTGAATCACTGTGGCAACCGGGGTTTCATATACACTGGAGAAATCCTACA 691

Query: 2404 TCGAATGCTAACAGCCACACAGTACATAGCACCTTTAATGGCAAATTCGATCCAGTGT 2345
|||||
Sbjct: 692 TCGAATGCTAACAGCCACACAGTACATAGCACCTTTAATGGCAAATTCGATCCAGTGT 751

Query: 2344 ATCCAGAAATTCACCTGTCAGATATTTTGATATGGCACAGCACTTGTGTCCAGTGGGA 2285
|||||
Sbjct: 752 ATCCAGAAATTCACCTGTCAGATATTTTGATATGGCACAGCACTTGTGTCCAGTGGGA 811

Query: 2284 CCATGTACATCTCCAGGATAATTATAACCTGGGAAGCTTCACATTCAGGCAACCTGCT 2225
|||||
Sbjct: 812 CCATGTACATCTCCAGGATAATTATAACCTGGGAAGCTTCACATTCAGGCAACCTGCT 871

Query: 2224 CATGGATGGACGAATCATCTTTGGATACAAAGAAATTCCTGTCTTGGTCCACAGATAAG 2165
|||||
Sbjct: 872 CATGGATGGACGAATCATCTTTGGATACAAAGAAATTCCTGTCTTGGTCCACAGATAAG 931

FIG. 2 A

WO 02/051868

4/13

PCT/IB01/02839

Sbjct: 932 ||||| 991
Query: 2104 CCAACAAATTCCTGGAAGAGAAATTTATGAATACCAAGAGTAGAGCTACA 2045
Sbjct: 992 CCAACAAATTCCTGGAAGAGAAATTTATGAATACCAAGAGTAGAGCTACA 1051
Query: 2044 AATGTCAAAATTTACCAACATTTGGGCTGTGGAGATGACCCATTACCCACATGCTTCCA 1985
Sbjct: 1052 AATGTCAAAATTTACCAACATTTGGGCTGTGGAGATGACCCATTACCCACATGCTTCCA 1111
Query: 1984 GTTTAACAGATGTGGCCCTGTGTATCTTCTCAGATTGGCTTCAACTGCAGTTGGTGTAG 1925
Sbjct: 1112 GTTTAACAGATGTGGCCCTGTGTATCTTCTCAGATTGGCTTCAACTGCAGTTGGTGTAG 1171
Query: 1924 TAACTTCAAAGATGTTCCAGTGGATTGATGCTCATCGGACAGACTGGGTGGACAGTGG 1865
Sbjct: 1172 TAACTTCAAAGATGTTCCAGTGGATTGATGCTCATCGGACAGACTGGGTGGACAGTGG 1231
Query: 1864 ATGCCCTGAAGAGTCAAAGAGAGAGATGTGTGAGAATACAGAACCAAGTGGAACTTCTTC 1805
Sbjct: 1232 ATGCCCTGAAGAGTCAAAGAGAGAGATGTGTGAGAATACAGAACCAAGTGGAACTTCTTC 1291
Query: 1804 TCGAACCCACCAACCATAGGAGCGCAACCAACCAAGTTCAAGGTCTTAATACCAACAG 1745
Sbjct: 1292 TCGAACCCACCAACCATAGGAGCGCGCAACCAACCAAGTTCAAGGTCTTAATACCAACAG 1351
Query: 1744 AAGAGCAGTGAATCTCAGTTTCCACCAAGCTTCTCAGAGATGATACCAAGATAGC 1685
Sbjct: 1352 AAGAGCAGTGAATCTCAGTTTCCACCAAGCTTCTCAGAGATGATACCAAGATAGC 1411
Query: 1684 ACTACATCTAAAGATAATGGAGCTTCTACAGATGACAGTGCAGCTGAGAGAAAGGGGG 1625
Sbjct: 1412 ACTACATCTAAAGATAATGGAGCTTCTACAGATGACAGTGCAGCTGAGAGAAAGGGGG 1471
Query: 1624 AACCTTCCAGCTGGCCCTCATCGTTGGAATCCTCATCTGGTCTCTATTGTAGCCACAGC 1565
Sbjct: 1472 AACCTTCCAGCTGGCCCTCATCGTTGGAATCCTCATCTGGTCTCTATTGTAGCCACAGC 1511
Query: 1564 CATTTCTGTGACAGTCTATATGTATCACCACCAACATCAGCAGCCAGCATCTTCTTTAT 1505
Sbjct: 1512 CATTTCTGTGACAGTCTATATGTATCACCACCAACATCAGCAGCCAGCATCTTCTTTAT 1591
Query: 1504 TGAGAGACGCCCAAGCAGATGGCCTGCGATGAAGTTTGAAGAGGCTCTGGACATCCTGC 1445
Sbjct: 1592 TGAGAGACGCCCAAGCAGATGGCCTGCGATGAAGTTTGAAGAGGCTCTGGACATCCTGC 1651
Query: 1444 CTATGCTGAAGTTGAACCAAGTTGGAGAGAAAGAGGCTTTATGTATCAGAGCAGTGCTA 1385
Sbjct: 1652 CTATGCTGAAGTTGAACCAAGTTGGAGAGAAAGAGGCTTTATGTATCAGAGCAGTGCTA 1711
Query: 1384 AAATTTCTAGGACAGAACCAACAGTACTGGTTTACAGGTGTTAAGACTAAATTTTGC 1325
Sbjct: 1712 AAATTTCTAGGACAGAACCAACAGTACTGGTTTACAGGTGTTAAGACTAAATTTTGC 1771
Query: 1324 CTATACCTTTAAGACAAACAAACAAACACACACAAACAAAGCTCTAAGCTGCTGTAGCC 1265
Sbjct: 1772 CTATACCTTTAAGACAAACAAACAAACACACACAAACAAAGCTCTAAGCTGCTGTAGCC 1831
Query: 1264 TGAAGAGACAGATTTCTGGACAGCTCAGCCCAAGGTAACCAAAACT 1205
Sbjct: 1832 TGAAGAGACAGATTTCTGGACAGCTCAGCCCAAGGTAACCAAAACT 1891
Query: 1204 AAACCTTATACAGATACCATTTACACTGAACATAGAATTCCTAGTGAATGTCTATCTA 1145

FIG. 2 B

WO 02/051868

5/13

PCT/IB01/02839

Query: 1144 TAGTTCACTCGGAACATCTCCCGTGGACTTATCTGAAGTATGACAGATTATAATGCTTT 1085
|||||
Sbjct: 1952 TAGTTCACTCGGAACATCTCCCGTGGACTTATCTGAAGTATGACAGATTATAATGCTTT 2011

Query: 1084 TGGCTTAGGTGCAGGGTTGCAAGGATCAGAAAAAATCATATAAGCTTTAGTT 1025
|||||
Sbjct: 2012 TGGCTTAGGTGCAGGGTTGCAAGGATCAGAAAAAATCATATAAGCTTTAGTT 2071

Query: 1024 CATGAGGGATCGACACCTTTGGTTCAAAATGTTCTCTGATGTCCTCAAGATACTGTTTC 965
|||||
Sbjct: 2072 CATGAGGGATCGACACCTTTGGTTCAAAATGTTCTCTGATGTCCTCAAGATACTGTTTC 2121

Query: 964 CAAAGCCTGAACCTTTCACTCAAAAGAGCAATGATGAATGCTCAAGATTGCTAAGAA 905
|||||
Sbjct: 2132 CAAAGCCTGAACCTTTCACTCAAAAGAGCAATGATGAATGCTCAAGATTGCTAAGAA 2191

Query: 904 AACAGCCCATGCAAGAGTGAGAACAAACAAATAAGAGATTTCTACATTTTCAAAAC 845
|||||
Sbjct: 2192 AACAGCCCATGCAAGAGTGAGAACAAACAAATAAGAGATTTCTACATTTTCAAAAC 2251

Query: 844 AGATGTGTGCAAAAGAGTGTGTTTTCTGGTCTAGATCCATCTGTACCAACAAGTTCA 785
|||||
Sbjct: 2252 AGATGTGTGCAAAAGAGTGTGTTTTCTGGTCTAGATCCATCTGTACCAACAAGTTCA 2311

Query: 784 TCACCTTACAGAACGAATCTTTTATCCGTACAGGAGGTTCAACCATGTCTGCCCTCTTC 725
|||||
Sbjct: 2312 TCACCTTACAGAACGAATCTTTTATCCGTACAGGAGGTTCAACCATGTCTGCCCTCTTC 2371

Query: 724 CTTTGTATGAATGACCTTTCTATGAGCTGTGCAAAATTTCCGAACAATTAGCTAAGGA 665
|||||
Sbjct: 2372 CTTTGTATGAATGACCTTTCTATGAGCTGTGCAAAATTTCCGAACAATTAGCTAAGGA 2431

Query: 664 TTTGGGAAGAGGGGGTGGCAACCGGGCTTCTGTTTTCTGGCTCAGCATGAAACATC 605
|||||
Sbjct: 2432 TTTGGGAAGAGGGGGTGGCAACCGGGCTTCTGTTTTCTGGCTCAGCATGAAACATC 2491

Query: 604 TGATTATGCTTTATGGAAGCCTTACCTCCAAATCCCAACTGTAAAGTCCCATGAACCA 545
|||||
Sbjct: 2492 TGATTATGCTTTATGGAAGCCTTACCTCCAAATCCCAACTGTAAAGTCCCATGAACCA 2551

Query: 544 CAGTTGCTCTGGGCTGATGGAACAAAGGAACAGTATGAAGAGTTCCTTAATCATTTT 485
|||||
Sbjct: 2552 CAGTTGCTCTGGGCTGATGGAACAAAGGAACAGTATGAAGAGTTCCTTAATCATTTT 2611

Query: 484 TGAACAAAAATGTTAAGGGATTTAAACATATGATTATTTTAAATTTATGGCTTTTCA 425
|||||
Sbjct: 2612 TGAACAAAAATGTTAAGGGATTTAAACATATGATTATTTTAAATTTATGGCTTTTCA 2671

Query: 424 GTACTAAACACCCATTTCATTGCTGATTCCTGTCTAAGAGCCATTCACTCAGCATGTC 365
|||||
Sbjct: 2672 GTACTAAACACCCATTTCATTGCTGATTCCTGTCTAAGAGCCATTCACTCAGCATGTC 2731

Query: 364 GATAGAAAGATGAAAAACCTGCTGAATCATACAGTAATTTCTTTAAGGCACATAGT 305
|||||
Sbjct: 2732 GATAGAAAGATGAAAAACCTGCTGAATCATACAGTAATTTCTTTAAGGCACATAGT 2791

Query: 304 AGTTACATAAATATATATATAAATATATTTTGTTTATAACTAACACAGGCAGGATC 245
|||||
Sbjct: 2792 AGTTACATAAATATATATATAAATATATTTTGTTTATAACTAACACAGGCAGGATC 2851

Query: 244 TTGTGACTCTAAGAGTGGTTTGTGATCAAGACAAAACAGATGCAAGATGCATCTGC 185
|||||
Sbjct: 2852 TTGTGACTCTAAGAGTGGTTTGTGATCAAGACAAAACAGATGCAAGATGCATCTGC 2911

Query: 184 ATTACTTCCATAGAGTTGTAATAATATCCTTAATATTAGAATATTTTCTGTCACTTAGC 125
|||||

FIG. 2 C

WO 02/051868

6/13

PCT/IB01/02839

Query: 124 AAAAGTGGTTCAGTTCATGGCCGCGCCCATCATGTTCTTGACTATTGATCCACTTTTC 65
 Sbjct: 2972 AAAAGTGGTTCAGTTCATGGCCGCGCCCATCATGTTCTTGACTATTGATCCACTTTTC 3031

Query: 64 GTTTATGTCAACCCCTTCCCTCTCTGGCTAAATAAAGTGGATGCAGAAAGTCCTTAAAT 5
 Sbjct: 3032 GTTTATGTCAACCCCTTCCCTCTCTGGCTAAATAAAGTGGATGCAGAAAGTCCTTAAAT 3091

Query: 4 GGAA 1
 Sbjct: 3092 GGAA 3095

Parameters:

V=10

B=5

ctxfactor=2.00

E=10

Query	Strand	MatID	Matrix name	-----	As Used	-----	-----	Computed	----
				Lambda	K	H	Lambda	K	H
+1	0	+5,-4		0.192	0.173	0.357	same	same	same
		Q=10,R=10		0.104	0.0151	0.0500	n/a	n/a	n/a
-1	0	+5,-4		0.192	0.173	0.357	same	same	same
		Q=10,R=10		0.104	0.0151	0.0500	n/a	n/a	n/a

Query	Strand	MatID	Length	Eff.Length	E	S	W	T	X	E2	S2
+1	0		2668	2668	10.	97	11	n/a	73	0.024	82
									102	0.43	97
-1	0		2668	2668	10.	97	11	n/a	73	0.024	82
									102	0.43	97

Statistics:

Database: ./temp/seqfile.64767.4560546875
 Title: temp/seqfile.64767.4560546875
 Release date: unknown
 Posted date: 4:36 PM PST Dec 21, 2000
 Format: ELAST
 # of letters in database: 3095
 # of sequences in database: 1
 # of database sequences satisfying E: 1
 No. of states in DFA: 257 (257 KB)
 Total size of DFA: 318 KB (384 KB)
 Time to generate neighborhood: 0.02u 0.01s 0.03t Elapsed: 00:00:00
 No. of threads or processors used: 1
 Search cpu time: 0.02u 0.01s 0.03t Elapsed: 00:00:00
 Total cpu time: 0.05u 0.05s 0.10t Elapsed: 00:00:00
 Start: Thu Dec 21 16:36:28 2000 End: Thu Dec 21 16:36:28 2000

FIG. 2 D

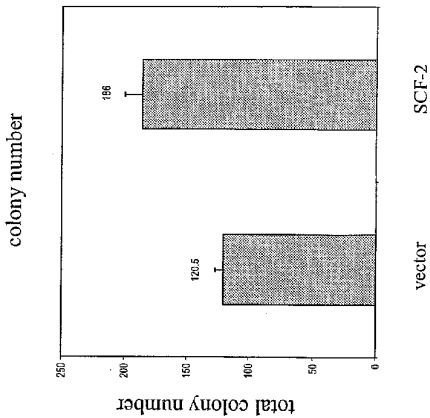
Total Cell and Colony Number in Stromal Cell-free Culture

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

7/13

3B



3A

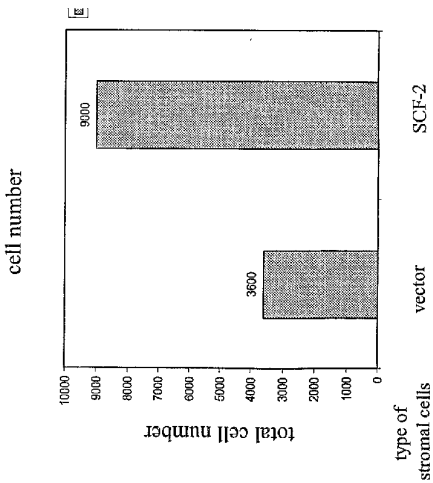


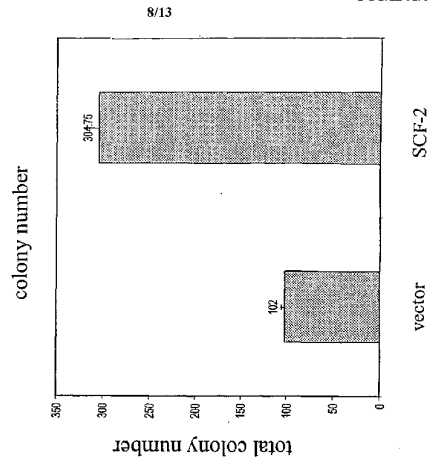
FIG. 3

Total Cell and Colony Number in Stromal Cell-associated Culture

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

4B



4A

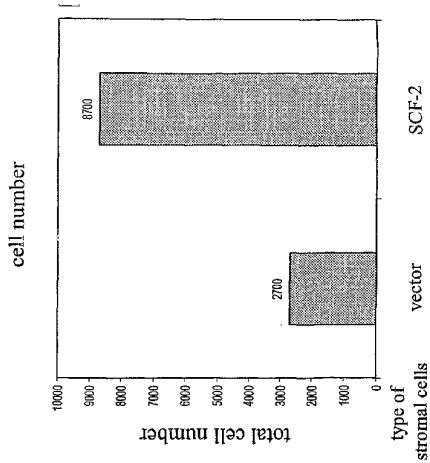


FIG. 4

WO 02/051868

9/13

PCT/IB01/02839

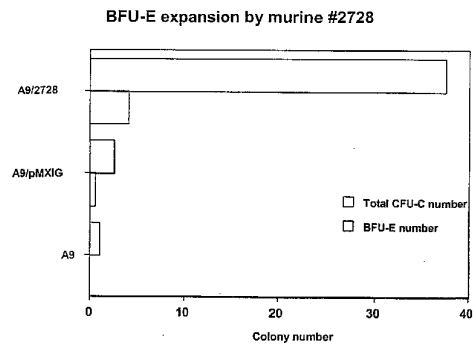


FIG. 5

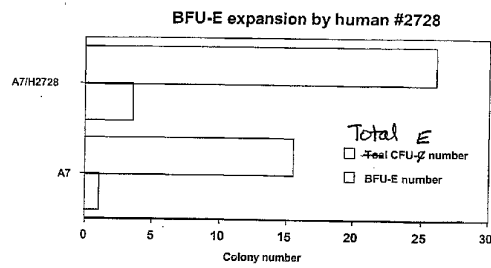


FIG. 6

WO 02/051868

11/13

PCT/IB01/02839

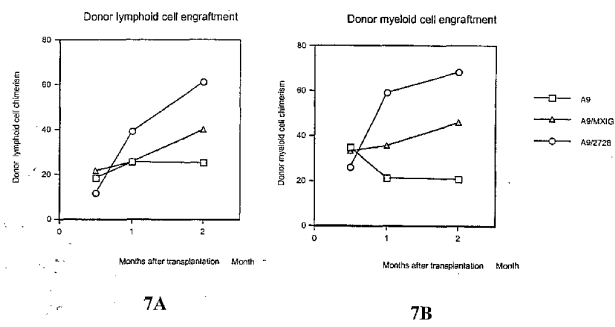


FIG. 7

Co-culture of HSC with Vector- and SCF-2-transduced Stromal Cells-(2)

- Exp 041201 -

WO 02/051868

12/13

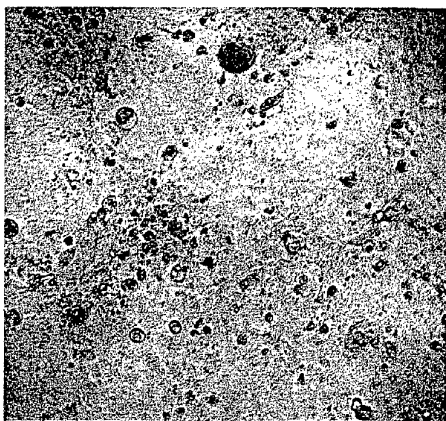
PCT/IB01/02839

SCF-2

vector



8B



8A

FIG. 8

HSC Supplied with Culture Sup from Vector- or SCF-2-transduced Stromal Cells
- Exp 041201_b

WO 02/051868

13/13

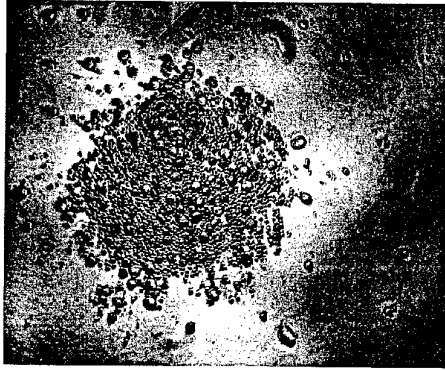
PCT/IB01/02839

SCF-2



9B

vector



9A

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

SEQUENCE LISTING

<110> Kirin Beer Kabushiki Kaisha

<120> METHODS AND MATERIALS RELATING TO STEM CELL GROWTH FACTOR-LIKE POLYPEPTIDES AND POLYNUCLEOTIDES

<130> 32066/37483

<140> NOT YET ASSIGNED

<141> NOT YET ASSIGNED

<150> PCT/US00/35260

<151> 2000-12-23

<160> 53

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggcaccgagct acatctaaaa gataatggag cttctacaga tgacagtga gctgagaaga 60

aagggggaac cctccacgct ggccctcatcg ttggaatcct catcctgggc ctcattgtag 120

ccacagccat tcttgtgaca gtctatatgt atcaccacc aacatcagca gccagcatct 180

tctttattga gagacgcca agcagatggc ctgcgatgaa gtttagaaga ggctctggac 240

atcctgccta tgcagaagtt gaaccagttg gagagaaga aggctttatt gtatcagagc 300

agtgctaaaa tttctaggac agaacaacac cagtactggt ttacaggtgt taagactaaa 360

atcttg 366

<210> 2

<211> 334

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggcaccgagct acatctaaaa gataatggag cttctacaga tgacaggga gctgagaaga 60

aagggggaac cctccacgct ggccctcatcg ttggaatcct catcctgggc ctcattgtag 120

ccacagccat tcttgtgaca gtctatatgt atcaccacc aacatcagca gccagcatct 180

tctttattga gagacgcca agcagatggc ctgcgatgaa gtttagaaga ggctctggac 240

atcctgccta tgcagaagtt gaaccagttg gagagaaga aggctttatt gtatcagagc 300

agtgctaaaa tttctaggac agaacaacac cagt 334

<210> 3

<211> 422

<212> DNA

<213> Homo sapiens

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

<400> 3
cagaaattca actgtcagat attttgataa tggcacagca cttgtgggtcc agtgggacca 60
tgtacatctc caggataatt ataacctggg aagcttcaca ttccaggcaa ccctgctcat 120
ggatggagca atcatctttg gatcaaaaga aattcctgtc ttggtcacac agataagtcc 180
aaccatcat ccagtgaaag tcggactgtc cgatgcattt gtcgttgctc acaggatcca 240
acaaattccc agtacgtaga agaagggcag tcgcaatgag tgagcctctg tgggggtaaa 300
tttaaggagc attggtctat ggcagctgta cctgaattaa aaaaaaata gctaactgat 360
tagctgatta atgcttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaag 420
gg 422

<210> 4
<211> 460
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(460)
<223> n = A, T, G, or C

<400> 4
ggcgggaaac tcgatgacca ntagnaagtt cganngccat tagacagtgc ggaggaatcc 60
aaccctttca ctcaaaagag caatgatgaa tgtctcatga tagctaagaa caactagccc 120
atgcaagagt gagaacaaac acaaaaataag agattttcta cattttcaa acagatggtg 180
ggcaaaagga tgttgttttt ctggtotaga tccatctgta ccaacaagtt catcacttta 240
cagaacgaat ctttttatcc gtacaggagg ttcaaaccat gctgcctct tcccttgtaa 300
tgaatgacct ttctatgagc tgtgacaaaa ttccgaaca attagctaag gatttgggaa 360
gagggggtgg caaacggggc ttctgttttt cctgcctcag catgaaaaca tctgatttat 420
gctttatgga agccttaoct ccaatcccca actgttaaan 460

<210> 5
<211> 447
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
cggaacatct ccgtgggact tatctgaagt atgacaagat tataatgott ttggcttaag 60
cgcagggttg caaagggtac acaaaaaaaaa aatcataata aagctttagt tcatgaggga 120
tcgaasaaaa caacaaaaaa aacaaaactg aataaactct ataaaaaaa aaaaaagaa 180
aggtaatgac ttacttttga aaggaaatac acactgcctg aaaaaagacc acaaagacct 240
ggcccaaat cagaactgtg ttagtgcgga tctcccccga gtctcaacat taggaggctc 300

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

ctcattctttt ggggatatg aaaacataaa tggagctgtt aacaagggaa cggccagaa 360

aatgtgggtt caactgcaag accaccccca ccattttgtc tctacgtgcc ctgttgata 420

gtgaatcgct tcattccaac tcccact 447

<210> 6
 <211> 484
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(484)
 <223> n = A, T, G, or C

<400> 6
 gagggcattg aatgatnacc ctaggccagn gcggnggaat tggtttacag gtgtaagac 60

taaaattttg cctatacctt taagacaaac aaactaacac tcacacaaac aagctctaag 120

ctgctgtagc ctgaagaaga caagatttct ggacaagctc agcccaggaa acaagggtta 180

aacaaaaaac taaaacttat acaagatacc atttacactg aacatagaat tccctagtgg 240

aatgtcatct atagtttact cggaacatct cccgtggact tatctgaagt atgacaagat 300

tataatgctt ttggcttagg tgcagggttg caaagggtac agaaaaaaa atcataataa 360

agctttagtt catgagggat cgacaccttt ggttcaaatg ttctctgatg tctcaagat 420

aactgttttc caaagcctga accctttcac tcaaaagagc aatgatgaat gtctcaagat 480

tgct 484

<210> 7
 <211> 498
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(498)
 <223> n = A, T, G, or C

<400> 7
 gcggggnnat tgaacacctg gagatcgaga cctagtcag ngtgcnsgaa ttccacagat 60

aagttcaacc aatcatccag tgaagtcgg actgtccgat gcattttgtg ttgtcaacag 120

gatccaacaa attccaatg ttogaagaag aacaatttat gaataccacc gagtagagct 180

acaaatgtca aaaattacca acatttcggc tgtggagatg accccattac ccacatgcct 240

ccagtttaac agatgtgggc cctgtgtatc ttctcagatt ggcttcaact gcagttgggtg 300

tagtaaaact caaagatggt ccagtggtt tgatcgtcat cggcaggact ggggtggacag 360

tggatgcctt gaagagtcac aagagaagat gtgtgagaat acagaaccag tggaaacttc 420

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

ttctcgaaacc accacaaacca taggagagac aaccacccag ttcagggtcc taactaccac 480
cagaagagca gtgacttt 498

<210> 8
<211> 405
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
ggcgaccgac gcgtccggcg acgcgtgggg aagaggttgt ggcaaacggt tctttctgtt 60
ttcttgccctc agcatgaaaa catctgattt atgctttatg gaagccttac ctccaatccc 120
caactgttaa gtcccatgaa accacagttg ctctgggctg atggaaacaa aaggaaacag 180
tatgaagagt tctttaatca tttttgaac aaaaatgtta agggatttta aacatatgat 240
tatttttaat tttatgcctt ttcagtacta aacacccatt tcattgtga ttcctggcta 300
agaagccatt cagctcagca tggcgataga aagaatgaaa aaacctgct gaatcataca 360
gtaattttct ttaaagcaca tagtagctac ataaatatat atatt 405

<210> 9
<211> 407
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
ggggaaaagg ggggggcaaa cggggccttc tgttttctg gctcagcatg aaaacatctg 60
atttatgctt tatggaagcc ttacctccaa tccccaactg ttaagtccca tgaaacaca 120
gttgctctgg gctgatggaa acaaaaggaa acagbatgaa gagttcctta atcatttttg 180
aaacaaaaat gtttaagggt ttttaacata tgattattt taattttatg ccttttcagt 240
actaaacacc catttcattg ctgattcctg tctaaaaago cattcacgta agcatggcga 300
tagaaagaaa gaaaaaaccc tgcgtaatca tacagtaatt ttctttaag cacatagtag 360
ctacataaat atatatatat aaatatattt ttgtttataa ctaacac 407

<210> 10
<211> 392
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
aatcacactgg ggccacatct gttaaaactgg atgcattgtg gtaatgggt catctccaca 60
gccgaaatgt tggtaatttt tgacatttgt agctctacco ggtggtattc ataaatttgt 120
cttcttcgaa cattgggaat ttgttggtac ctgtggacaa cgacaaatgc atcggacagt 180
cagactttca ctggatgatt gggtgaactt atctgtgtga ccaagacagg aattcttttg 240
tatccaaaga tgattcgtcc atccatgagc agggttgcct ggaatgtgaa gcttccacag 300

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

ttataattat cctggagatg tacatggtcc cactggacca caagtgcctgt gccattatca 360

aaatatctga cagttgaatt tctggataca ct 392

<210> 11
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 aatacatggt ggtgatacat atagactgtc acaagaatgg ctgtggctac aatgaggacc 60
 aggatgagga ttccaaagat gaggccagcg tggagggttc cccctttctt ctcagctgca 120
 ctgtcatctg tagaagctcc attatctttt agatgtagtg ctatcttggt atcatcttct 180
 gtagggaggg tggtagggaaa ctgagaagtc actgctcttc tggtagtagt taggaacctg 240
 aactgggtgg ttgtcgctcc tatggtgtg gtggttagag aagaagtttc cactggttct 300
 gtattctcac acatcttctc ttttgactct tcagggcac cactgtccac ccagtctgc 360
 cgatgacgat caaatccact ggaacatctt tgaagtttac tacaccaact gcagttg 417

<210> 12
 <211> 415
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 cggacgcgtg ggtcgaatgc taacagccac agtacatagc acccttaatg gcaaatttcg 60
 atcccagtggt atccagaaat tcaactgtca gatattttga taatggcaca gcacttgtag 120
 tccagtggga ccatgtacat ctccaggata attataacct gggaagcttc acattccagg 180
 caacctgct catgatgga cgaatcatct ttggatacaa agaaattctt gtcttggtca 240
 cacagataag ttcaaccaat catccagtga aagtcggact gtccgatgca ttgtcgttg 300
 tccacaggat ccaacaaatt cccagtacgt aaaagaaggg cagtcgcaat gctgagcct 360
 ctgtgggggt aaatttaaag gagattggtc tatggcagct gtacctgaat taaaa 415

<210> 13
 <211> 494
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 ccgtcagtggt ggaggaaatc gcaagagtga atctgtcctt cgattttcca tattatgggc 60
 acttcctacg tgaatcact gtggcaaccg gcggtttcat atacactgga gaagtgcac 120
 atcgaaggct aacaaccaca cagtacatag cacctttaat aggcataat cgatccaggt 180
 gtatccagaa attcatctga cagatatttt gataatggca cagcacttgt ggtccagtgg 240
 gacctgtac atcttcagga taattataac ctggggangct tgacattcca ggcgacctg 300

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

ctcatgggatg gacgaatcat ctttggatag aaagaaatc ctgtcttggt cacacagatc 360

agttcaacca atcatccagt gaaagtcgga ctgtccgatg catttgctgt tgtccacagg 420

atccaacaaa ttccaatgt tccaagaaga acaatttatg aataccaccg agtagagcta 480

caaatgtcga acat 494

<210> 14
 <211> 453
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 aagattttcta ggacagaaca acaccagtac tggtttacag gtgtaagac taaaattttg 60

cctatacctt taagacaac aaacaacac acacacaaac aagctctaag ctgctgtagc 120

ctgaagaaga caagattttct ggacaagctc agcccaggaa acaaaaggta acaaaaaaac 180

taaaacttat acaagatacc atttacctg aacatagaat tccctagtgg aatgtcatct 240

atagttcact cggaacatct cccgtggact tatctgaagt atgacaagat tataatgott 300

ttggcttagg tgcaggggtg caaagggatc agaaaaaaa aatcataata aagcttagt 360

tcatgagga tgcacacctt tggttcaaat gttctctgat gtctcaaaga taactgtttt 420

ccaaagcctg aaccttttca ctcaaaagag caa 453

<210> 15
 <211> 430
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(430)
 <223> n = A, T, G, or C

<400> 15
 ctgcaggaaat tcggcacgag cccaacatca gcagocagca tcttctttat tgagagacgc 60

ccaagcagat ggcctgcgat gaagtttaga agaggctctg gacatcctgc ctatgctgaa 120

gttgaaccag ttggagagaa agaaggcttt attgtatcag agcagtgcta aaatttctag 180

gacagaacaa caccagtact ggtttacagg tgtaagact aaaattttgc ctataccttt 240

aagacaaca aacaacaca cacacaaca agctctaagc tgctgtagcc tgaagaagac 300

aagatttctg gacaagctca gcccaggaaa caaagggtaa acaaaaaact aaaacttata 360

caagatacca tttaactga acatagaatt ccctagtgga atgtcatcta tagttcactc 420

ggaacatctn 430

<210> 16
 <211> 405

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(405)
<223> n = A, T, G, or C

<400> 16
agagaaagaa ggctttattg tatcagagca gtgctaaaat ttctaggaca gaacaacacc 60
agtactgggtt tacagggtgt aagactaaaa ttttgccat acctttaaga caaacaacaa 120
aacacacaca caaacaagct ctaagctgct gtagcctgaa gaagacaaga tttctggaca 180
agctcagccc aggaacaaaa gggtaaaaa aaaactaaaa cttatacaag ataccattta 240
cactgaacat agaattccct agtgggaatgt catctatagt tcactggaa catctccgt 300
ggaattatct gaagtatgac aagattataa tgcttttggc ttatgtgcag ggttgcaaa 360
ggatcagaan aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaggggggg gcgtt 405

<210> 17
<211> 412
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(412)
<223> n = A, T, G, or C

<400> 17
cccacggctc cgcccacggc tcgtacaga ccacaattac tatatatctc gaatatatgg 60
tccatctgat tctgccagcc gggatttatg ggtgaacata gaccaaattg aaaaagataa 120
agtgaagatt catggaatat tgtccaatac tcatggcaa gotgcaagag tgaatctgtc 180
cttcgatttt ccatittatg gccacttct acgtgaaac actgtggcaa cggggggttt 240
catatacact ggagaagtgc tacatgaat gctaacagcc acacagtaca tagcaccttt 300
aatggcaaatt ttgatccca gtgtatccag aaattcaact gtcagatatt ttgataatgg 360
cacagcactt gtgtccagt gggaccatgt acatctccag gataattata an 412

<210> 18
<211> 440
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(440)
<223> n = A, T, G, or C

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

<400> 18
gaattcggca cgagctctaa gctgctgtag cctgaagaag acaagatttc tggacaagct 60
cagcccagga aacaaagggg aaacaaaaaa ctaaaactta tacaagatc catttacct 120
gaacatagaa ttocctagtg gaatgtcctc tatagttcac tcggaacatc toccgtggac 180
ttatctgaag tatgacaaga ttataatgct ttgggttag gtgcagggtt gcaaaaggat 240
cagaaaaaaa aaatcataat aaagcttttag ttcatgaggg aaaaaaaaaa aaaaaaaacc 300
tcgggggggg cccgggccc catttccctc tatagggggc ggtataacaa toccgtggcc 360
gcggtttaac accgcggga cgggaaaaac cctggggtag ccacttaaa tocttttggg 420
caaaaaaann annaggcgcg 440

<210> 19
<211> 416
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19
gttcgcgatg ggaagaatc acagcggccg caatacatgg gtctgtatc tcacacatc 60
ttcttttga ctcttcaggg catccactgt ccacggggtc cttgtgatg acgatcaat 120
ccactggaac atctttgaag ttactacac caactgcagt tgaagccaat ctgagaagat 180
acacaggggc cacatctgtt aaactggagg catgtggta atggggcat ctccacagcc 240
gaaatgttg taatttttga cattttagc totactcgtt ggtattcata aattgttctt 300
ctttcaacat tgggaatttg ctggatctg gggacaacg caaatgcatt ggcaggccg 360
actttcactg gatgaatgga tgaacttacc tgggggagca agacaggaat ttcttg 416

<210> 20
<211> 382
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 20
aatacatggt tetgattctc acacatcttc tcttttgact ctccaggcca tccactgtcc 60
acccagtcac gccgatgacg atcaaatcaa ctggaacatc tttagagttt actacacca 120
ctgcagttga agccaatctg agaagatada cagggggcac atctgttaaa ctggaggcat 180
gtgggtaatg gggatcatct cacagccgaa atgttggtta tttttgacat ttgtagctct 240
actcgttggt attcataaat tgttcttctt cgaacattgg gaatttggtg gatcctgttg 300
acaacgacaa atgcacatcga cagtcagact ttactggat gattgggtga acttatctgt 360
gggaccaaga caggaatttc tt 382

<210> 21
<211> 406
<212> DNA

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

<213> Homo sapiens

<400> 21
aatacatgcc tggaaatgta agcttcccag gttataatta tctggagat gtacatggte 60
ccactggacc acaagtgtgtg tgcattatctg aaatatctg acagttgaat ttctggatac 120
actgggatog aaatttgcca ttaaagggtc tatgtactgt gtggtgtta gcattogatg 180
tacgaattct ccagtgata tgaaccccc ggttgccaca gtgatttca gtaggaagtg 240
gccataaat ggaaatoga aggcacagatt cactcttga gcttgccat gagtattgga 300
caatattcca tgaattctca ctttatcttt ttccatttgg tctatgttca cccataaatc 360
ccggctggca gaatcagatg gaccatatat tcgagatata tagtag 406

<210> 22
<211> 2668
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 22
cccaagcgct cgcccacgcg tccgtacaga ccacaattac tatatatctc gaatatatgg 60
tccatctgat tctgacagcc gggatttatg ggtgaacata gaccaaatgg aaaaagataa 120
agtgaagatt catggaatat tgtccaatac tcatcggaac gctgcaagag tgaatctgtc 180
cttogatctt ccattttatg gccacttctt acgtgaaatc actgtggcaa cgggggggtt 240
catatacact ggagaagtgc tacatcgaat gctaacagcc acacagtaca tagcaccttt 300
aatggcaaat ttogatccca gtgtatccag aaattcaact gtcagatatt ttgataatgg 360
cacagcactt gtggtccagt gggacatgt acatctccag gataattata acctgggaag 420
cttcacattc caggcaaccc tgcctcatga tggacgaatc atctttggat acaaagaat 480
tctgtcttg gtccacaga taagttcaac caatcatcca gtgaaagtgc gactgtccga 540
tgcatttgc gttgtccaca ggatccaca aattcccaat gttogaagaa gaacaattta 600
tgaataccac cgaagttagc tacaatgtc aaaaattacc aacatttcgg ctgtggagat 660
gacccattta ccccatgcc tccagtttaa cagatgtggc cctgtgtat cttctcagat 720
tggcttcaac tgcagttggt gtagtaact tcaaatgtt tccagtggat ttgatcgtca 780
tcggcaggac tgggtggaca gtggatgccc tgaagagtca aaagagaaga tgtgtgagaa 840
tacagaacca gtggaaactt cttctogaac caccacaacc ataggagcga caaccacca 900
gttcagggtc ctactacca ccagaagagc agtgacttct cagtttccca ccagcctccc 960
tacagaagat gataccaaga tagcactaca tctaaaagat aatggagctt ctacagatga 1020
cagtgcagct gagaagaaag ggggaacccct ccacgtggc ctcacgttg gaatcctcat 1080
cctggctctc attgtagoca cagccattct tgtgacagtc tatatgtatc accaccaac 1140
atcagcagcc agcatcttct ttattgagag acgcccaagc agatggcctg cgatgaagtt 1200

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

tagaagaggc tctggacatc ctgcctatgc tgaagttgaa ccagttggag agaaagaagg 1250

ctttatttga tcagagcagc gctaaaaatt ctaggacaga acaacaccag tactggttta 1320

cagggtgtta gactaaaatt ttgcctatac cttaaagaca aacaaacaaa caccacacac 1380

aacaagctct aagctgctgt agcctgaaga agacaagatt tctggacaag ctacagccag 1440

gaaacaaagg gtaaacaaaa aactaaaact tatacaagat accattttaca ctgaacatag 1500

aattccctag tggaaatgtc tctatagttc actcggaaca tctccctgg acttatctga 1560

agtatgacaa gattataatg cttttggctt aggtgcaggg ttgcaagggt atcagaaaaa 1620

aaaaatcata ataaagcttt agttcatgag ggatcgacac ctttggttca aatgttctct 1680

gatgtctcaa agataactgt tttccaaagc ctgaaccctt tcaatcaaaa gagcaatgat 1740

gaatgtctca agattgctaa gaaaaacagc ccattgcaaga gtgagaacaa acacaaaata 1800

agagattttc tacattttca aaacagatgt gtggcaaaag gatgttgttt ttctgggtca 1860

gattccatctg taccaacaag ttcatcactt tacagaacga atctttttat ccgtacagga 1920

ggttcaaac accgtctgct cttcctttgt aatgaatgac ctttctatga gctgtgacaa 1980

aatttccgaa caattagcta aggatttggg aagagggggg ggcaaacggg gctttctgtt 2040

ttcctgctc agcatgaaaa catctgattt atgctttatg gaagccttac ctccaatccc 2100

caactgttaa gtcccatgaa accacagttg ctctgggctg atggaacaaa aaggaaaacag 2160

tatgaagagt tccctaatca tttttgaaac aaaaatgtta agggattttt aacatatgat 2220

tatttttaat tttatgcctt ttcagtacta aacaccattt tcatgttga ttctgtctca 2280

agaagccatt cactgacaga tggcgataga aagaatgaaa aaacctgct gaatcatata 2340

gtaattttct ttaaagcaca tagtagttac ataatatat atataaaat atatttttgt 2400

ttataactaa cacaaggcag gatccttgtga ctctaagagt gcgttttgtc atcaagacaa 2460

aacagatgca agatgcatca ctgcattact tccatagagt tgtaaaataa tccctaatat 2520

tagaatattt ttctgtcact tagcaaaagt ggttcagttc attgccgcgc coatcatggt 2580

cttgactatt tgatccactt ttctgtttat gtaaacccct tccctctctg gtaaaataaa 2640

gtggatgcag aaagctcctt aaatggaa 2668

<210> 23
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Met Glu Lys Asp Lys Val Lys Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His
 1 5 10 15

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

Arg Gln Ala Ala Arg Val Asn Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly
 20 25 30

His Phe Leu Arg Glu Ile Thr Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr
 35 40 45

Gly Glu Val Val His Arg Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro
 50 55 60

Leu Met Ala Asn Phe Asp Pro Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg
 65 70 75 80

Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Ala Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His
 85 90 95

Leu Gln Asp Asn Tyr Asn Leu Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu
 100 105 110

Leu Met Asp Gly Arg Ile Ile Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu
 115 120 125

Val Thr Gln Ile Ser Ser Thr Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser
 130 135 140

Asp Ala Phe Val Val Val His Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg
 145 150 155 160

Arg Arg Thr Ile Tyr Glu Tyr His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys
 165 170 175

Ile Thr Asn Ile Ser Ala Val Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu
 180 185 190

Gln Phe Asn Arg Cys Gly Pro Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn
 195 200 205

Cys Ser Trp Cys Ser Lys Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg
 210 215 220

His Arg Gln Asp Trp Val Asp Ser Gly Cys Pro Glu Glu Ser Lys Glu
 225 230 235 240

Lys Met Cys Glu Asn Thr Glu Pro Val Glu Thr Ser Ser Arg Thr Thr
 245 250 255

Thr Thr Ile Gly Ala Thr Thr Thr Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr
 260 265 270

Arg Arg Ala Val Thr Ser Gln Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp
 275 280 285

Asp Thr Lys Ile Ala Leu His Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp
 290 295 300

Asp Ser Ala Ala Glu Lys Lys Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile
 305 310 315 320

Val Gly Ile Leu Ile Leu Val Leu Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu Val
 325 330 335

Thr Val Tyr Met Tyr His His Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe
 340 345 350

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

Ile Glu Arg Arg Pro Ser Arg Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly
 355 360 365

Ser Gly His Pro Ala Tyr Ala Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu
 370 375 380

Gly Phe Ile Val Ser Glu Gln Cys
 385 390

<210> 24
 <211> 2668
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (107)..(1282)

<400> 24
 cccacgcgtc cgcccacgcg tcogtacaga ccacaattac tatatatctc gaatatatgg 60
 tccatctgat tctgccagcc gggatttatg ggtgaacata gaccaa atg gaa aaa 115
 Met Glu Lys
 1

gat aaa gtg aag att cat gga ata ttg tcc aat act cat cgg caa gct 163
 Asp Lys Val Lys Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala
 5 10 15

gca aga gtg aat ctg tcc ttc gat ttt cca ttt tat ggc cac ttc cta 211
 Ala Arg Val Asn Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu
 20 25 30 35

cgt gaa atc act gtg gca acc ggg ggt ttc ata tac act gga gaa gtc 259
 Arg Glu Ile Thr Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val
 40 45 50

gta cat cga atg cta aca gcc aca cag tac ata gca cct tta atg gca 307
 Val His Arg Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala
 55 60 65

aat ttc gat ccc agt gta tcc aga aat tca act gtc aga tat ttt gat 355
 Asn Phe Asp Pro Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp
 70 75 80

aat ggc aca gca ctt gtg gtc cag tgg gac cat gta cat ctc cag gat 403
 Asn Gly Thr Ala Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp
 85 90 95

aat tat aac ctg gga agc ttc aca ttc cag gca acc ctg ctc atg gat 451
 Asn Tyr Asn Leu Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Leu Met Asp
 100 105 110 115

gga cga atc atc ttt gga tac aaa gaa att cct gtc ttg gtc aca cag 499
 Gly Arg Ile Ile Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln
 120 125 130

ata agt tca acc aat cat cca gtg aaa gtc gga ctg tcc gat gca ttt 547
 Ile Ser Ser Thr Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe
 135 140 145

WO 02/051868	PCT/IB01/02839
gtc gtt gtc cac agg atc caa caa att ccc aat gtt cga aga aga aca Val Val Val His Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr 150 155 160	595
att tat gaa tac cac cga gta gag cta caa atg tca aaa att acc aac Ile Tyr Glu Tyr His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn 165 170 175	643
att tgg gct gtg gag atg acc cca tta ccc aca tgc ctc cag ttt aac Ile Ser Ala Val Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn 180 185 190 195	691
aga tgt ggc ccc tgt gta tct tct cag att ggc ttc aac tgc agt tgg Arg Cys Gly Pro Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp 200 205 210	739
tgt agt aaa ctt caa aga tgt tcc agt gga ttt gat cgt cat cgg cag Cys Ser Lys Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln 215 220 225	787
gac tgg gtg gac agt gga tgc cct gaa gag tca aaa gag aag atg tgt Asp Trp Val Asp Ser Gly Cys Pro Glu Glu Ser Lys Glu Lys Met Cys 230 235 240	835
gag aat aca gaa cca gtg gaa act tct tct cga acc acc aca acc ata Glu Asn Thr Glu Pro Val Glu Thr Ser Ser Arg Thr Thr Thr Thr Ile 245 250 255	883
gga gcg aca acc acc cag ttc agg gtc cta act acc acc aga aga gca Gly Ala Thr Thr Thr Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg Ala 260 265 270 275	931
gtg act tct cag ttt ccc acc agc ctc cct aca gaa gat gat acc aag Val Thr Ser Gln Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr Lys 280 285 290	979
ata gca cta cat cta aaa gat aat gga gct tct aca gat gac agt gca Ile Ala Leu His Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala 295 300 305	1027
gct gag aag aaa ggg gga acc ctc cac gct ggc ctc atc gtt gga atc Ala Glu Lys Lys Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly Ile 310 315 320	1075
ctc atc ctg gtc ctc att gta gcc aca gcc att ctt gtg aca gtc tat Leu Ile Leu Val Leu Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu Val Thr Val Tyr 325 330 335	1123
atg tat cac cac cca aca tca gca gcc agc atc ttc ttt att gag aga Met Tyr His His Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu Arg 340 345 350 355	1171
cgc cca agc aga tgg cct gcg atg aag ttt aga aga ggc tct gga cat Arg Pro Ser Arg Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly His 360 365 370	1219
cct gcc tat gct gaa gtt gaa cca gtt gga gag aaa gaa ggc ttt att Pro Ala Tyr Ala Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe Ile 375 380 385	1267
gta tca gag cag tgc taaaatttct aggacagaac aacaccagta ctggtttaca Val Ser Glu Gln Cys 390	1322

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

gggtgttaaga ctaaaatttt gcttatacct ttaagacaaa caaacaacaa cacacacaaa 1382
 caagctctaa gctgctgtag cctgaagaag acaagatttc tggacaagct cagcccagga 1442
 aacaaagggg aaacaaaaaa ctaaaactta tacaagatac catttacct gaacatagaa 1502
 ttccctagtg gaatgtcatc tatagttcac tgggaacatc tcccgtaggc ttatctgaag 1562
 tatgacaaga ttataatgct ttgggttag gtgcagggtt gcaagggat cagaaaaaaa 1622
 aaatcataat aaagcttttag ttcatgaggg atgcacacct ttggttcaaa tgttctctga 1682
 tgtctcaaaag ataactgttt tccaaagcct gaaccctttc actcaaaaga gcaatgatga 1742
 atgtctcaag attgctaaga aaaacagccc atgcaagagt gagaacaaac acaaaataag 1802
 agattttcta cattttcaaa acagatgtgt ggcaaaagga tgttgttttt ctggtctaga 1862
 tccatctgta ccaacaagtt catcacttta cagaacgaat ctttttatcc gtacaggagg 1922
 ttcaaacacc gtctgcctct tctttttaa tgaatgacct ttctatgagc tgtgacaaaa 1982
 ttccgaaca attagctaag gatttgggaa gagggggtgg caaacgggga tttctgtttt 2042
 cctgcctcag catgaaaaa tctgatttat gctttatgga agccttacct ccaatcccca 2102
 actgttaagt cccatgaac cacagttgct ctgggctgat ggaaacaaaa ggaacagta 2162
 tgaagagttc cttaatcatt ttgaaacaa aaatgttaag ggatttttaa catatgatta 2222
 tttttaattt tatgcctttt cagtactaaa caccatttc attgtgatt cctgtctaag 2282
 aagccattca cgtcagcatg gcgataaaaa gaatgaaaa accctgctga atcatacagt 2342
 aattttcttt aaagcacata gtagtacat aaatatatat atataaatat atttttggtt 2402
 ataactaaca caaggcagga tcttgtgact ctaagagtgc gttttgtcat caagacaaaa 2462
 cagatgcaag atgcatactt gcattacttc catagagttg taaaataatc cttaatatta 2522
 gaataatttt ctgtcactta gcaaaagtggt ttcagttcat tgcgcgcgcc atcatgtct 2582
 tgactatttg atccactttt tcgtttatgt caacccttc cctctctggc taaataaagt 2642
 ggatgcagaa agctccttaa atggaa 2668

<210> 25
 <211> 392
 <212> FRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Met Glu Lys Asp Lys Val Lys Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His
 1 5 10 15

Arg Gln Ala Ala Arg Val Asn Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly
 20 25 30

His Phe Leu Arg Glu Ile Thr Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr
 35 40 45

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

Gly Glu Val Val His Arg Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro
 50 55 60

Leu Met Ala Asn Phe Asp Pro Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg
 65 70 75 80

Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Ala Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His
 85 90 95

Leu Gln Asp Asn Tyr Asn Leu Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu
 100 105 110

Leu Met Asp Gly Arg Ile Ile Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu
 115 120 125

Val Thr Gln Ile Ser Ser Thr Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser
 130 135 140

Asp Ala Phe Val Val Val His Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg
 145 150 155 160

Arg Arg Thr Ile Tyr Glu Tyr His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys
 165 170 175

Ile Thr Asn Ile Ser Ala Val Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu
 180 185 190

Gln Phe Asn Arg Cys Gly Pro Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn
 195 200 205

Cys Ser Trp Cys Ser Lys Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg
 210 215 220

His Arg Gln Asp Trp Val Asp Ser Gly Cys Pro Glu Glu Ser Lys Glu
 225 230 235 240

Lys Met Cys Glu Asn Thr Glu Pro Val Glu Thr Ser Ser Arg Thr Thr
 245 250 255

Thr Thr Ile Gly Ala Thr Thr Thr Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr
 260 265 270

Arg Arg Ala Val Thr Ser Gln Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp
 275 280 285

Asp Thr Lys Ile Ala Leu His Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp
 290 295 300

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

Asp Ser Ala Ala Glu Lys Lys Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile
 305 310 315 320

Val Gly Ile Leu Ile Leu Val Leu Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu Val
 325 330 335

Thr Val Tyr Met Tyr His His Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe
 340 345 350

Ile Glu Arg Arg Pro Ser Arg Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly
 355 360 365

Ser Gly His Pro Ala Tyr Ala Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu
 370 375 380

Gly Phe Ile Val Ser Glu Gln Cys
 385 390

<210> 26
 <211> 1179
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 atggaaaaag ataaagtga gattcatgga atattgtcca atactcatcg gcaagctgca 60
 agagtgaatc tgtccttcga ttttcattt tatggccact tctactgtga aatcaactgtg 120
 gcaaccgggg gtttcataata cactggagaa gtctgacac gaatgctaac agccacacag 180
 tacatagcac ctttaattggc aaatttcgat cccagtgtat ccagaaattc aactgtcaga 240
 tattttgata atggcacaga acttgtggtc cagtgggacc atgtacatct ccaggataat 300
 tataacctgg gaagcttcac attccaggca accctgtcga tggatggagc aatcatcttt 360
 ggatacaaaag aaattcctgt cttggtcaca cagataagtt caaccaatca tccagtgaag 420
 gtccgactgt ccgatgcatt tgcgttgte cccaggatcc aacaaattcc caatgttoga 480
 agaagaacaa tttatgaata ccaccagta gagctacaaa tgtcaaaaat taccacatt 540
 tggctgtgtg agatgacccc attaccaca tgctccagt ttaacagatg tggccctgt 600
 gtatctcttc agattggctt caactgcagt tgggttagta aacttcaaag atgttcagt 660
 ggatttgatc gtcacggca ggactgggtg gacagtggat gccctgaaga gtcaaaagag 720
 aagatgtgtg agaatacaga accagtggaa acttctcttc gaaccaccac aaccatagga 780
 gcgacaacca cccagttcag ggtcctaact accaccagaa gagcagtgac ttctcagttt 840
 cccaccagcc tccctacaga agatgatacc aagatagcac tacatctaaa agataatgga 900
 gcttctacag atgacagtgc agctgagaag aaagggggaa cctccacgc tggcctcatc 960

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

gttggaatcc tcattctggt cctcattgta gccacagcca ttcttgtagc agtctatatg 1020
 tatcaccacc caacatcagc agccagcacc ttctttattg agagacgccc aagcagatgg 1080
 cctgcgatga agtttagaag aggcctctgga catcctgcct atgctgaagt tgaaccagtt 1140
 ggagagaaaag aaggctttat tctatcagag cagtgcctaa 1179

<210> 27
 <211> 3095
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (123)..(1712)

<400> 27
 ttctggtccg ggtcctaccg agaccgatcc gcagcggttg gcccggtcgt gcctattgca 60
 tcgggagccc ccgagcaccg gcgaaggact ggcggctggg gtagggaggt ggcggcgggc 120
 gc atg gcg agg ttc ccg aag gcc gac ctg gcc gct gca gga gtt atg 167
 Met Ala Arg Phe Pro Lys Ala Asp Leu Ala Ala Ala Gly Val Met
 1 5 10 15
 tta ctt tgc cac ttc ttc acg gac cag ttt cag ttc gcc gat ggg aaa 215
 Leu Leu Cys His Phe Phe Thr Asp Gln Phe Gln Phe Ala Asp Gly Lys
 20 25 30
 ccc gga gac caa atc ctt gat tgg cag tat gga gtt act cag gcc ttc 263
 Pro Gly Asp Gln Ile Leu Asp Trp Gln Tyr Gly Val Thr Gln Ala Phe
 35 40 45
 cct cac aca gag gag gag gtg gaa gtt gat tca cac gcg tac agc cac 311
 Pro His Thr Glu Glu Glu Val Glu Val Asp Ser His Ala Tyr Ser His
 50 55 60
 agg tgg aaa aga aac ttg gac ttt ctc aag gcg gta gac acg aac cga 359
 Arg Trp Lys Arg Asn Leu Asp Phe Leu Lys Ala Val Asp Thr Asn Arg
 65 70 75
 gca agc gtc gcc caa gac tot cct gag ccc aga agc ttc aca gac ctg 407
 Ala Ser Val Gly Gln Asp Ser Pro Glu Pro Arg Ser Phe Thr Asp Leu
 80 85 90 95
 ctg ctg gat gat ggg cag gac aat aac act cag atc gag gag gat aca 455
 Leu Leu Asp Asp Gly Gln Asp Asn Asn Thr Gln Ile Glu Glu Asp Thr
 100 105 110
 gac cac aat tac tat ata tct cga ata tat ggt cca tct gat tct gcc 503
 Asp His Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Pro Ser Asp Ser Ala
 115 120 125
 agc cgg gat tta tgg gtg aac ata gac caa atg gaa aaa gat aaa gtg 551
 Ser Arg Asp Leu Trp Val Asn Ile Asp Gln Met Glu Lys Asp Lys Val
 130 135 140
 aag att cat gga ata ttg tcc aat act cat cgg caa gct gca aga gtg 599
 Lys Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala Ala Arg Val
 145 150 155

WO 02/051868	PCT/IB01/02839
aat ctg tcc ttc gat ttt cca ttt tat ggc cac ttc cta cgt gaa atc Asn Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu Arg Glu Ile 160 165 170 175	647
act gtg gca acc ggg ggt ttc ata tac act gga gaa gtc gta cat cga Thr Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val Val His Arg 180 185 190	695
atg cta aca gcc aca cag tac ata gca cct tta atg gca aat ttc gat Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asp 195 200 205	743
ccc agt gta tcc aga aat tca act gtc aga tat ttt gat aat ggc aca Pro Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp Asn Gly Thr 210 215 220	791
gca ctt gtg gtc cag tgg gac cat gta cat ctc cag gat aat tat aac Ala Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp Asn Tyr Asn 225 230 235	839
ctg gga agc ttc aca ttc cag gca acc ctg ctc atg gat gga cga atc Leu Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Leu Met Asp Gly Arg Ile 240 245 250 255	887
atc ttt gga tac aaa gaa att cct gtc ttg gtc aca cag ata agt tca Ile Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln Ile Ser Ser 260 265 270	935
acc aat cat cca gtg aaa gtc gga ctg tcc gat gca ttt gtc gtt gtc Thr Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe Val Val Val 275 280 285	983
cac agg atc caa caa att ccc aat gtt cga aga aga aca att tat gaa His Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu 290 295 300	1031
tac cac cga gta gag cta caa atg tca aaa att acc aac att tcy got Tyr His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala 305 310 315	1079
gtg gag atg acc cca tta ccc aca tgc ctc cag ttt aac aga tgt ggc Val Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn Arg Cys Gly 320 325 330 335	1127
ccc tgt gta tct tct cag att ggc ttc aac tgc agt tgg tgt agt aaa Pro Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys 340 345 350	1175
ctt caa aga tgt tcc agt gga ttt gat cgt cat cgg cag gac tgg gtg Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val 355 360 365	1223
gac agt gga tgc cct gaa gag tca aaa gag aag atg tgt gag aat aca Asp Ser Gly Cys Pro Glu Glu Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Asn Thr 370 375 380	1271
gaa cca gtg gaa act tct tct cga acc acc aca acc ata gga gcg aca Glu Pro Val Glu Thr Ser Ser Arg Thr Thr Thr Thr Ile Gly Ala Thr 385 390 395	1319
acc acc cag ttc agg gtc cta act acc acc aga aga gca gtg act tct Thr Thr Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg Ala Val Thr Ser 400 405 410 415	1367

WO 02/051868	PCT/IB01/02839
cag ttt ccc acc agc ctc cct aca gaa gat gat acc aag ata gca cta Gln Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Ala Leu 420 425 430	1415
cat cta aaa gat aat gga gct tct aca gat gac agt gca gct gag aag His Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys 435 440 445	1463
aaa ggg gga acc ctc cac gct ggc ctc atc gtt gga atc ctc atc ctg Lys Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu 450 455 460	1511
gtc ctc att gta gcc aca gcc att ctt gtg aca gtc tat atg tat cac Val Leu Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu Val Thr Val Tyr Met Tyr His 465 470 475	1559
cac cca aca tca gca gcc agc atc ttc ttt att gag aga cgc cca agc His Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro Ser 480 485 490 495	1607
aga tgg cct gcg atg aag ttt aga aga ggc tot gga cat cct gcc tat Arg Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly His Pro Ala Tyr 500 505 510	1655
gct gaa gtt gaa cca gtt gga gag aaa gaa ggc ttt att gta tca gag Ala Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe Ile Val Ser Glu 515 520 525	1703
cag tgc taa aattttctagg acagaacaac accagtactg gtttacaggt Gln Cys	1752
gttaagacta aaattttggc tataccttta agacaaacaa acaaacacac acacaaacaa	1812
gctctaagct gctgtagcct gaagaagaca agattttctgg acaagctcag cccaggaac	1872
aaagggtaaa caaaaaacta aaacttatac aagataccat ttacactgaa catagaattc	1932
cctagtggaa tgtcatctat agttcactcg gaacatctcc cgtggactta tctgaagtat	1992
gacaagatta taatgctttt ggcttaggtg cagggttgca aagggatcag aaaaaaaaa	2052
tcataataaa gotttagttc atgagggatc gacacctttg gttcaaatgt tctctgatgt	2112
ctcaaagata actgtttttc aaagcctgaa cccctttoact caaaagagca atgatgaatg	2172
tctcaagatt gctaagaaaa acagcccatg caagagtgg acaaacaca aaataagaga	2232
ttttctacat tttaaaaaca gatgtgtggc aaaaggatgt tgtttttctg gtctagatcc	2292
atctgtacca acaagttcat cactttacag aacgaatctt tttatcogta caggaggttc	2352
aaaccatgtc tgccctcttc tttgtaatga atgaccttcc tatgagctgt gacaaaattt	2412
cgaacaatt agctaaggat ttgggaagag ggggtggcaa acggggcttt ctgttttcc	2472
gcctcagcat gaaaacatct gatttatgct ttatggaagc cttacctoca atccccaact	2532
gttaagtccc atgaaccac agttgctctg ggctgatgga aacaaaagga aacagtatga	2592
agagttcctt aatcattttt gaaacaaaa tgtaaggga ttttaaacat atgattattt	2652
ttaattttat gcccttttoag tactaaacac ccattttcatt gctgattcct gtctaagaag	2712

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

ccatttcacgt cagcatggcg atagaaagaa tgaaaaaac ccgtctgaatc atacagtaat 2772

tttcttttaa gcacatagta gttacataaa tatatatata taaatatatt ttgttttata 2832

actaacacaa ggcaggatct tgtgactcta agagtgcgtt ttgtcatcaa gacaaaacag 2892

atgcaagatg catcactgca ttacttccat agagttgtaa aataatcctt aatattagaa 2952

tattttttctg tcaacttagca aaagtgggtc agttcattgc cgcgccatc atgtttottga 3012

ctatttgatc cactttttcg ttatgtcaa ccccttccct ctctggctaa ataaagtgga 3072

tgcagaagc tccttaaatg gaa 3095

<210> 28

<211> 529

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Ala Arg Phe Pro Lys Ala Asp Leu Ala Ala Gly Val Met Leu
1 5 10 15

Leu Cys His Phe Phe Thr Asp Gln Phe Gln Phe Ala Asp Gly Lys Pro
20 25 30

Gly Asp Gln Ile Leu Asp Trp Gln Tyr Gly Val Thr Gln Ala Phe Pro
35 40 45

His Thr Glu Glu Glu Val Glu Val Asp Ser His Ala Tyr Ser His Arg
50 55 60

Trp Lys Arg Asn Leu Asp Phe Leu Lys Ala Val Asp Thr Asn Arg Ala
65 70 75 80

Ser Val Gly Gln Asp Ser Pro Glu Pro Arg Ser Phe Thr Asp Leu Leu
85 90 95

Leu Asp Asp Gly Gln Asp Asn Asn Thr Gln Ile Glu Glu Asp Thr Asp
100 105 110

His Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Pro Ser Asp Ser Ala Ser
115 120 125

Arg Asp Leu Trp Val Asn Ile Asp Gln Met Glu Lys Asp Lys Val Lys
130 135 140

Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala Ala Arg Val Asn
145 150 155 160

Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu Arg Glu Ile Thr
165 170 175

20

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val Val His Arg Met
 180 185 190
 Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asp Pro
 195 200 205
 Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Ala
 210 215 220
 Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp Asn Tyr Asn Leu
 225 230 235 240
 Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Leu Met Asp Gly Arg Ile Ile
 245 250 255
 Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln Ile Ser Ser Thr
 260 265 270
 Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe Val Val Val His
 275 280 285
 Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu Tyr
 290 295 300
 His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala Val
 305 310 315 320
 Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn Arg Cys Gly Pro
 325 330 335
 Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys Leu
 340 345 350
 Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val Asp
 355 360 365
 Ser Gly Cys Pro Glu Glu Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Asn Thr Glu
 370 375 380
 Pro Val Glu Thr Ser Ser Arg Thr Thr Thr Thr Ile Gly Ala Thr Thr
 385 390 395 400
 Thr Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg Ala Val Thr Ser Gln
 405 410 415
 Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Ala Leu His
 420 425 430

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys Lys
 435 440 445

Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu Val
 450 455 460

Leu Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu Val Thr Val Tyr Met Tyr His His
 465 470 475 480

Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro Ser Arg
 485 490 495

Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly His Pro Ala Tyr Ala
 500 505 510

Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe Ile Val Ser Glu Gln
 515 520 525

Cys

<210> 29
 <211> 1590
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 atggcgagggt tcccgaaaggc cgacctggcc gctgcaggag ttatgttact ttgccacttc .60
 ttacacggacc agtttcagtt cgccgatggg aaaccggag accaaatcct tgattggcag 120
 tatggagtta ctacaggcctt ccttcacaca gaggaggagg tggaaagtga ttcacacgcg 180
 tacagccaca ggtggaagaag aaacttggac ttctcaagg cggtagacac gaaccgagca 240
 agcgtcggcc aagactctcc tgagcccaga agcttcacag aactgctgct ggatgatggg 300
 caggacaata acactcagat cgaggaggat acagaccaca attactatat atctcgaata 360
 tatggtccat ctgattctgc cagccgggat ttatgggtga acatagacca aatggaaaaa 420
 gataaagtga agattcatgg aatattgtcc aatactcacc ggcaagctgc aagagtgaat 480
 ctgtccttcg attttccatt ttatggccac ttctacgtg aaatcactgt ggcaaccggg 540
 ggtttcatat acactggaga agtcgtacat cgaatgctaa cagccacaca gtacatagca 600
 cctttaatgg caaatttcga tcccagtga tccagaatt caactgtcag atattttgat 660
 aatggccacg cacttgttgt ccagtgggac catgtacac tccaggataa ttataacctg 720
 ggaagcttca cattccaggc aacctgctc atggatggac gaatcatctt tggatacaaa 780
 gaaattcctg tcttggtcac acagataagt tcaaccaatc atccagtga agtcggactg 840

WO 02/051868 PCT/IB01/02839
 tccgatgcat ttgtcgttgt ccacaggatc caacaaattc ccaatgttcg aagaagaaca 900
 atttatgaat accacccgagt agagctacaa atgtcaaaaa ttaccaacat ttccgctgtg 960
 gagatgaccc cattacccac atgcctccag tttaacagat gtggccctcg tgtatcttct 1020
 cagattggct tcaactgcag ttgggtgtagt aaacttcaaa gatgttcag tggatttgat 1080
 cgtcatcgcc aggactgggt ggacagtga tgccctgaag agtcaaaaga gaagatgtgt 1140
 gagaatcag aaccagtga aactctctct cgaaccacca caaccatagg agcgacaacc 1200
 acccagttca gggctcctaac taccaccaga agagcagtga cttctcagtt tcccaccago 1260
 ctccctacag aagatgatac caagatagca ctacatctaa aagataatgg agcttctaca 1320
 gatgacagtg cagctgagaa gaaaggggga accctccacg ctggcctcat cgttggaatc 1380
 ctcatctgg tctcattgt agccacagcc attcttgtga cagtctatat gtatcaccac 1440
 ccaacatcag cagccagcat cttctttatt gagagacgcc caagcagatg gctgcgatg 1500
 aagtttagaa gaggtctctg acatctctgc tatgctgaag ttgaaccagt tggagagaaa 1560
 gaaggcttta ttgtatcaga gcagtgttaa 1590

<210> 30
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Met Ala Arg Phe Pro Lys Ala Asp Leu Ala Ala Gly Val Met Leu
 1 5 10 15
 Leu Cys His Phe Phe Thr Asp Gln Phe Gln Phe Ala Asp Gly
 20 25 30

<210> 31
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Lys Pro Gly Asp Gln Ile Leu Asp Trp Gln Tyr Gly Val Thr Gln Ala
 1 5 10 15
 Phe Pro His Thr Glu Glu Glu Val Glu Val Asp Ser His Ala Tyr Ser
 20 25 30
 His Arg Trp Lys Arg Asn Leu Asp Phe Leu Lys Ala Val Asp Thr Asn
 35 40 45
 Arg Ala Ser Val Gly Gln Asp Ser Pro Glu Pro Arg Ser Phe Thr Asp
 50 55 60
 Leu Leu Leu Asp Asp Gly Gln Asp Asn Asn Thr Gln Ile Glu Glu Asp
 65 70 75 80

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

Thr Asp His Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Pro Ser Asp Ser
85 90 95

Ala Ser Arg Asp Leu Trp Val Asn Ile Asp Gln Met Glu Lys Asp Lys
100 105 110

Val Lys Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala Ala Arg
115 120 125

Val Asn Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu Arg Glu
130 135 140

Ile Thr Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val Val His
145 150 155

Arg Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe
165 170 175

Asp Pro Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp Asn Gly
180 185 190

Thr Ala Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp Asn Tyr
195 200 205

Asn Leu Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Leu Met Asp Gly Arg
210 215 220

Ile Ile Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln Ile Ser
225 230 235 240

Ser Thr Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe Val Val
245 250 255

Val His Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr
260 265 270

Glu Tyr His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser
275 280 285

Ala Val Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn Arg Cys
290 295 300

Gly Pro Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser
305 310 315 320

Lys Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp
325 330 335

Val Asp Ser Gly Cys Pro Glu Glu Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Asn
340 345 350

Thr Glu Pro Val Glu Thr Ser Ser Arg Thr Thr Thr Thr Ile Gly Ala
355 360 365

Thr Thr Thr Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg Ala Val Thr
370 375 380

Ser Gln Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Ala
385 390 395 400

Leu His Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu
405 410 415

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

Lys Lys Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly Ile Leu Ile
 420 425 430

Leu Val Leu Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu Val Thr Val Tyr Met Tyr
 435 440 445

His His Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro
 450 455 460

Ser Arg Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly His Pro Ala
 465 470 475 480

Tyr Ala Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe Ile Val Ser
 485 490 495

Glu Gln Cys

<210> 32
 <211> 28
 <212> FRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu Val Leu Ile Val
 1 5 10 15

Ala Thr Ala Ile Leu Val Thr Val Tyr Met Tyr His
 20 25

<210> 33
 <211> 1351
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (5)...(1351)

<400> 33
 oggc atg gcg agg ttc ccg aag gcc gac ctg gcc gct gca gga gtt atg 49
 Met Ala Arg Phe Pro Lys Ala Asp Leu Ala Ala Gly Val Met
 1 5 10 15

tta ctt tgc cac ttc ttc acg gac cag ttt cag ttc gcc gat ggg aaa 97
 Leu Leu Cys His Phe Phe Thr Asp Gln Phe Gln Phe Ala Asp Gly Lys
 20 25 30

ccc gga gac caa atc ctt gat tgg cag tat gga gtt act cag gcc ttc 145
 Pro Gly Asp Gln Ile Leu Asp Trp Gln Tyr Gly Val Thr Gln Ala Phe
 35 40 45

cct cac aca gag gag gag gtg gaa gtt gat tca cac gcg tac agc cac 193
 Pro His Thr Glu Glu Glu Val Glu Val Asp Ser His Ala Tyr Ser His
 50 55 60

agg tgg aaa aga aac ttg gac ttt ctc aag gcg gta gac acg aac cga 241
 Arg Trp Lys Arg Asn Leu Asp Phe Leu Lys Ala Val Asp Thr Asn Arg
 65 70 75

WO 02/051868										PCT/IB01/02839
gca agc gtc ggc caa gac tct cct gag ccc aga agc ttc aca gac ctg	289									
Ala Ser Val Gly Gln Asp Ser Pro Glu Pro Arg Ser Phe Thr Asp Leu										
80 85 90 95										
ctg ctg gat gat ggg cag gac aat aac act cag atc gag gag gat aca	337									
Leu Leu Asp Asp Gly Gln Asp Asn Asn Thr Gln Ile Glu Glu Asp Thr										
100 105 110										
gac cac aat tac tat ata tct cga ata tat ggt cca tct gat tct gcc	385									
Asp His Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Pro Ser Asp Ser Ala										
115 120 125										
agc cgg gat tta tgg gtg aac ata gac caa atg gaa aaa gat aaa gtg	433									
Ser Arg Asp Leu Trp Val Asn Ile Asp Gln Met Glu Lys Asp Lys Val										
130 135 140										
aag att cat gga ata ttg tcc aat act cat cgg caa gct gca aga gtg	481									
Lys Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala Ala Arg Val										
145 150 155										
aat ctg tcc ttc gat ttt cca ttt tat ggc cac ttc cta cgt gaa atc	529									
Asn Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu Arg Glu Ile										
160 165 170 175										
act gtg gca acc ggg ggt ttc ata tac act gga gaa gtc gta cat cga	577									
Thr Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val Val His Arg										
180 185 190										
atg cta aca gcc aca cag tac ata gca cct tta atg gca aat ttc gat	625									
Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asp										
195 200 205										
ccc agt gta tcc aga aat tca act gtc aga tat ttt gat aat ggc aca	673									
Pro Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp Asn Gly Thr										
210 215 220										
gca ctt gtg gtc cag tgg gac cat gta cat ctc cag gat aat tat aac	721									
Ala Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp Asn Tyr Asn										
225 230 235										
ctg gga agc ttc aca ttc cag gca acc ctg ctc atg gat gga cga atc	769									
Leu Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Leu Met Asp Gly Arg Ile										
240 245 250 255										
atc ttt gga tac aaa gaa att cct gtc ttg gtc aca cag ata agt tca	817									
Ile Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln Ile Ser Ser										
260 265 270										
acc aat cat cca gtg aaa gtc gga ctg tcc gat gca ttt gtc gtt gtc	865									
Thr Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe Val Val Val										
275 280 285										
cac agg atc caa caa att ccc aat gtt cga aga aga aca att tat gaa	913									
His Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu										
290 295 300										
tac cac cga gta gag cta caa atg tca aaa att acc aac att tcg gct	961									
Tyr His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala										
305 310 315										

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

gtg gag atg acc cca tta ccc aca tgc ctc cag ttt aac aga tgt ggc 1009
 Val Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn Arg Cys Gly
 320 325 330 335

ccc tgt gta tct tct cag att ggc ttc aac tgc agt tgg tgt agt aaa 1057
 Pro Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys
 340 345 350

ctt caa aga tgt tcc agt gga ttt gat cgt cat cgg cag gac tgg gtg 1105
 Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val
 355 360 365

gac agt gga tgc cct gaa gag tca aaa gag aag atg tgt gag aat aca 1153
 Asp Ser Gly Cys Pro Glu Glu Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Asn Thr
 370 375 380

gaa cca gtg gaa act tct tct cga acc acc aca acc ata gga gcg aca 1201
 Glu Pro Val Glu Thr Ser Ser Arg Thr Thr Thr Thr Ile Gly Ala Thr
 385 390 395

acc acc cag ttc agg gtc cta act acc acc aga aga gca gtg act tct 1249
 Thr Thr Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg Ala Val Thr Ser
 400 405 410 415

cag ttt ccc acc agc ctc cct aca gaa gat gat acc aag ata gca cta 1297
 Gln Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Ala Leu
 420 425 430

cat cta aaa gat aat gga gct tct aca gat gac agt gca gct gag aag 1345
 His Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys
 435 440 445

aaa ggg 1351
 Lys Gly

<210> 34
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Met Ala Arg Phe Pro Lys Ala Asp Leu Ala Ala Ala Gly Val Met Leu
 1 5 10 15

Leu Cys His Phe Phe Thr Asp Gln Phe Gln Phe Ala Asp Gly Lys Pro
 20 25 30

Gly Asp Gln Ile Leu Asp Trp Gln Tyr Gly Val Thr Gln Ala Phe Pro
 35 40 45

His Thr Glu Glu Glu Val Glu Val Asp Ser His Ala Tyr Ser His Arg
 50 55 60

Trp Lys Arg Asn Leu Asp Phe Leu Lys Ala Val Asp Thr Asn Arg Ala
 65 70 75 80

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

Ser Val Gly Gln Asp Ser Pro Glu Pro Arg Ser Phe Thr Asp Leu Leu
 85 90 95
 Leu Asp Asp Gly Gln Asp Asn Asn Thr Gln Ile Glu Glu Asp Thr Asp
 100 105 110
 His Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Pro Ser Asp Ser Ala Ser
 115 120 125
 Arg Asp Leu Trp Val Asn Ile Asp Gln Met Glu Lys Asp Lys Val Lys
 130 135 140
 Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala Ala Arg Val Asn
 145 150 155 160
 Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu Arg Glu Ile Thr
 165 170 175
 Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val Val His Arg Met
 180 185 190
 Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asp Pro
 195 200 205
 Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Ala
 210 215 220
 Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp Asn Tyr Asn Leu
 225 230 235 240
 Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Leu Met Asp Gly Arg Ile Ile
 245 250 255
 Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln Ile Ser Ser Thr
 260 265 270
 Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe Val Val Val His
 275 280 285
 Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu Tyr
 290 295 300
 His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala Val
 305 310 315 320
 Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn Arg Cys Gly Pro
 325 330 335

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys Leu
 340 345 350

Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val Asp
 355 360 365

Ser Gly Cys Pro Glu Glu Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Asn Thr Glu
 370 375 380

Pro Val Glu Thr Ser Ser Arg Thr Thr Thr Thr Ile Gly Ala Thr Thr
 385 390 395 400

Thr Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Ala Val Thr Ser Gln
 405 410 415

Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Thr Lys Ile Ala Leu His
 420 425 430

Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys Lys
 435 440 445

Gly

<210> 35
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Pro Arg Val Arg Pro Arg Val Arg Thr Asp His Asn Tyr Tyr Ile Ser
 1 5 10 15

Arg Ile Tyr Gly Pro Ser Asp Ser Ala Ser Arg Asp Leu Trp Val Asn
 20 25 30

Ile Asp Gln Met Glu Lys Asp Lys Val Lys Ile His Gly Ile Leu Ser
 35 40 45

Asn Thr His Arg Gln Ala Ala Arg Val Asn Leu Ser Phe Asp Phe Pro
 50 55 60

Phe Tyr Gly His Phe Leu Arg Glu Ile Thr Val Ala Thr Gly Gly Phe
 65 70 75 80

Ile Tyr Thr Gly Glu Val Val His Arg Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr
 85 90 95

Ile Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asp Pro Ser Val Ser Arg Asn Ser
 100 105 110

Thr Val Arg Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Ala Leu Val Val Gln Trp Asp
 115 120 125

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

His Val His Leu Gln Asp Asn Tyr Asn Leu Gly Ser Phe Thr Phe Gln
 130 135 140

Ala Thr Leu Leu Met Asp Gly Arg Ile Ile Phe Gly Tyr Lys Glu Ile
 145 150 155 160

Pro Val Leu Val Thr Gln Ile Ser Ser Thr Asn His Pro Val Lys Val
 165 170 175

Gly Leu Ser Asp Ala Phe Val Val Val His Arg Ile Gln Gln Ile Pro
 180 185 190

Asn Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu Tyr His Arg Val Glu Leu Gln
 195 200 205

Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala Val Glu Met Thr Pro Leu Pro
 210 215 220

Thr Cys Leu Gln Phe Asn Arg Cys Gly Pro Cys Val Ser Ser Gln Ile
 225 230 235 240

Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly
 245 250 255

Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val Asp Ser Gly Cys Pro Glu Glu
 260 265 270

Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Asn Thr Glu Pro Val Glu Thr Phe Leu
 275 280 285

Glu Pro Pro Gln Pro Glu Arg Gln Pro Pro Ser Ser Gly Ser Leu Pro
 290 295 300

Pro Glu Asp Ala Val Thr Ser Gln Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu
 305 310 315 320

Asp Asp Thr Lys Ile Ala Leu His Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr
 325 330 335

Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys Lys Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu
 340 345 350

Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu Val Leu Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu
 355 360 365

Val Thr Val Tyr Met Tyr His His Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe
 370 375 380

Phe Ile Glu Arg Arg Pro Ser Arg Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg
 385 390 395 400

Gly Ser Gly His Pro Ala Tyr Ala Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys
 405 410 415

Glu Gly Phe Ile Val Ser Glu Gln Cys
 420 425

<210> 36
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

Leu Ala Met Asp Thr Leu Pro Asp Asn Arg Thr Arg Val Val Glu Asp
 1 5 10 15
 Asn His Ser Tyr Tyr Val Ser Arg Leu Tyr Gly Pro Ser Glu Pro His
 20 25 30
 Ser Arg Glu Leu Trp Val Asp Val Ala Glu Ala Asn Arg Ser Gln Val
 35 40 45
 Lys Ile His Thr Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala Ser Arg Val
 50 55 60
 Val Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Pro Leu Arg Gln Ile
 65 70 75 80
 Thr Ile Ala Thr Gly Gly Phe Ile Phe Met Gly Asp Val Ile His Arg
 85 90 95
 Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Val Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asn
 100 105 110
 Pro Gly Tyr Ser Asp Asn Ser Thr Val Val Tyr Phe Asp Asn Gly Thr
 115 120 125
 Val Phe Val Val Gln Trp Asp His Val Tyr Leu Gln Gly Trp Glu Asp
 130 135 140
 Lys Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Ala Leu His His Asp Gly Arg Ile
 145 150 155 160
 Val Phe Ala Tyr Lys Glu Ile Pro Met Ser Val Pro Glu Ile Ser Ser
 165 170 175
 Ser Gln His Pro Val Lys Thr Gly Leu Ser Asp Ala Phe Met Ile Leu
 180 185 190
 Asn Pro Ser Pro Asp Val Pro Glu Ser Arg Arg Arg Ser Ile Phe Glu
 195 200 205
 Tyr His Arg Ile Glu Leu Asp Pro Ser Lys Val Thr Ser Met Ser Ala
 210 215 220
 Val Glu Phe Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln His Arg Ser Cys Asp
 225 230 235 240
 Ala Cys Met Ser Ser Asp Leu Thr Phe Asn Cys Ser Trp Cys His Val
 245 250 255
 Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg Tyr Arg Gln Glu Trp Asp
 260 265 270
 Gly Thr Met Gly Cys Ala Gln Glu Ala Glu Gly Gln Asp Val Arg Gly
 275 280 285
 Leu Pro Gly Met Arg Thr Thr Thr Ser Ala Ser Pro Asp Thr Ser Phe
 290 295 300
 Ser Pro Tyr Asp Gly Asp Leu Thr Thr Thr Ser Ser Ser Leu Phe Ile
 305 310 315 320
 Asp Ser Leu Thr Thr Glu Asp Asp Thr Lys Leu Asn Pro Tyr Ala Gly
 325 330 335

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

Gly Asp Gly Leu Gln Asn Asn Leu Ser Pro Lys Thr Lys Gly Thr Pro
 340 345 350
 Val His Leu Gly Thr Ile Val Gly Ile Val Leu Ala Val Leu Leu Val
 355 360 365
 Ala Ala Ile Ile Leu Ala Gly Ile Tyr Ile Asn Gly His Pro Thr Ser
 370 375 380
 Asn Ala Ala Leu Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro His His Trp Pro Ala
 385 390 395 400
 Met Lys Phe Arg Ser His Pro Asp His Ser Thr Tyr Ala Glu Val Glu
 405 410 415
 Pro Ser Gly His Glu Lys Glu Gly Phe Met Glu Ala Glu Gln Cys
 420 425 430

<210> 37

<211> 2797

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (873)..(2465)

<400> 37
 gggagggttc agcgtagat ctacaaatg gcaagccgcc ttccctcccc aaagtgtaga 60
 gctggagcgc ggggagcgc ggccggcgcct ccgccaccaa actcctgggg ctccgcggcg 120
 ttccggagcca cctcctgcct agcccgaggg ggctctctta ccaggctgca acctcacttt 180
 ccggtttttc tttttcttta aaaaacaccc ccacctctct tctgtctaca gcagctgggtg 240
 cattccgggc tctactctcc ggagctgccc atccctccgg ctgcggggcga ggaagcgcg 300
 tcagccttgg gcgaagcaaa gaagaaaaac ttgtcagagg ggtttctcca gcctccacta 360
 acctccttct ctccgggaaca ccaaccaccc gccggggcca gacctaatgc tgggaaaagt 420
 cctccgggtgc tcagcgccct cttgaatctg gaacagcacc ggccgagcca gtggaattag 480
 atctgttttg aaccagtggt agccgctgcg gggcgctcgg aagtcaccgt ctgtgggcgc 540
 ccgggtggcg ctgcctgaga ggaccgggga gtttgcgac cctactgcaa gtgacctttc 600
 ctccctcac ttggttgatt gtgtctcagt tggggctgc gagggtgaca agtgcagtg 660
 agagctcccg aagttcggag aggggttcagc tgtctctcct tcacttctgt taaccggagt 720

WO 02/051868	PCT/IB01/02839
gaaatcctag cgaactgtc agaggcctcc ggatccccc caagactcac cagcagagct	780
cgcccggtgc gcccatccc cagggataac cccggagccc agggctctcaa gaaaaaattc	840
gttgggcagg ggagagaggt cgcggcagcg gc atg gca agg ttc cgg agg gcc	893
	Met Ala Arg Phe Arg Arg Ala
	1 5
gac ctg gcc gca gca gga gtt atg tta ctt tgt cac ttt tta aca gac	941
Asp Leu Ala Ala Gly Val Met Leu Leu Cys His Phe Leu Thr Asp	
	10 15 20
cgg ttc cag ttc gcc cac ggg gag cct gga cac cat acc aat gat tgg	989
Arg Phe Gln Phe Ala His Gly Glu Pro Gly His His Thr Asn Asp Trp	
	25 30 35
att tat gaa gtt aca aac gct ttt cct tgg aat gaa gag ggg gta gaa	1037
Ile Tyr Glu Val Thr Asn Ala Phe Pro Trp Asn Glu Glu Gly Val Glu	
	40 45 50 55
gtg gac tct caa gca tac aac cac agg tgg aaa aga aat gtg gac cct	1085
Val Asp Ser Gln Ala Tyr Asn His Arg Trp Lys Arg Asn Val Asp Pro	
	60 65 70
ttt aag gca gta gac aca aac aga gcc agc atg ggc caa gcc tct cca	1133
Phe Lys Ala Val Asp Thr Asn Arg Ala Ser Met Gly Gln Ala Ser Pro	
	75 80 85
gag tcc aaa ggg ttc act gac ctg cta ctg gat gac gga cag gac aat	1181
Glu Ser Lys Gly Phe Thr Asp Leu Leu Leu Asp Asp Gly Gln Asp Asn	
	90 95 100
aac acc cag ata gag gag gac acg gat cac aat tac tac att tct cgg	1229
Asn Thr Gln Ile Glu Glu Asp Thr Asp His Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg	
	105 110 115
ata tat ggt cca gcg gat tct gcc agc cgg gat ctg tgg gtt aac ata	1277
Ile Tyr Gly Pro Ala Asp Ser Ala Ser Arg Asp Leu Trp Val Asn Ile	
	120 125 130 135
gac caa atg gaa aaa gac aaa gtg aag att cac ggg ata ctt tcc aac	1325
Asp Gln Met Glu Lys Asp Lys Val Lys Ile His Gly Ile Leu Ser Asn	
	140 145 150
act cat cgg caa gct gca aga gtg aat ctg tcc ttc gat ttt oca ttt	1373
Thr His Arg Gln Ala Ala Arg Val Asn Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe	
	155 160 165
tat ggt cat ttt cta aat gaa gtc act gtg gca act ggg ggt ttc ata	1421
Tyr Gly His Phe Leu Asn Glu Val Thr Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile	
	170 175 180
tat act gga gaa gtt gta cat cga atg ctc aca gct aca cag tat ata	1469
Tyr Thr Gly Glu Val Val His Arg Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile	
	185 190 195
gct cct tta atg gca aat ttt gat ccc agt gta tcc aga aat tca act	1517
Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asp Pro Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr	
	200 205 210 215
gtc aga tat ttt gat aat ggc aca gct ctt gtt gtc cag tgg gac cat	1565
Val Arg Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Ala Leu Val Val Gln Trp Asp His	
	220 225 230

WO 02/051868	PCT/IB01/02839
gtc cac ctg cag gat aat tac aac ctg gga agc ttc aca ttc cag gcc Val His Leu Gln Asp Asn Tyr Asn Leu Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala 235 240 245	1613
aca ctc ctc atg gac ggg cgc atc atc ttt gga tac aaa gaa atc cct Thr Leu Leu Met Asp Gly Arg Ile Ile Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro 250 255 260	1661
gtc ttg gtc aca cag ata agt tct acc aac cat cca gtg aaa gtc ggg Val Leu Val Thr Gln Ile Ser Ser Thr Asn His Pro Val Lys Val Gly 265 270 275	1709
ttg tct gat gca ttt gtc gtg gtc cac agg atc cag caa ata ccc aat Leu Ser Asp Ala Phe Val Val Val His Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn 280 285 290	1757
gtt cga aga aga aca att tat gaa tat cac cga gta gaa cta caa atg Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu Tyr His Arg Val Glu Leu Gln Met 300 305 310	1805
tcc aaa att acc aac atc tca gct gtg gag atg act cca ctt ccc aca Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala Val Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr 315 320 325	1853
tgt ctc cag ttc aat ggt tgt ggc cct tgt gtg tcc tcg cag att ggt Cys Leu Gln Phe Asn Gly Cys Gly Pro Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly 330 335 340	1901
ttc aac tgc agt tgg tgc agc aaa ctt caa aga tgc tcc agt gga ttt Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe 345 350 355	1949
gat cgc cat cgg cag gac tgg gtg gac agt gga tgc cgg gaa gag gta Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val Asp Ser Gly Cys Pro Glu Glu Val 360 365 370 375	1997
cag tca aaa gag aag atg tgt gag aag aca gag cca gga gag aca tct Gln Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Lys Thr Glu Pro Gly Glu Thr Ser 380 385 390	2045
caa act acc acg acc tcc cac acg acc acc atg caa ttc agg gtc ctg Gln Thr Thr Thr Thr Ser His Thr Thr Thr Met Gln Phe Arg Val Leu 395 400 405	2093
acc acc acc agg aga gct gtg aca tct cag atg cct acc agc ctg cct Thr Thr Thr Arg Arg Ala Val Thr Ser Gln Met Pro Thr Ser Leu Pro 410 415 420	2141
aca gaa gat gac acg aag ata gcc cta cat ctc aaa gac agt gga gcc Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Ala Leu His Leu Lys Asp Ser Gly Ala 425 430 435	2189
tcc aca gat gac agt gca gct gag aag aaa gga gga acc ctc cat gca Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys Lys Gly Gly Thr Leu His Ala 440 445 450 455	2237
ggc ctc att gtt gga att ctc atc ttg gtc ctc att ata gca gcg gcc Gly Leu Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu Val Leu Ile Ile Ala Ala Ala 460 465 470	2285
att ctg gtg aca gtg tat atg tat cac cat cca aca tca gca gcc agc Ile Leu Val Thr Val Tyr Met Tyr His His Pro Thr Ser Ala Ala Ser 475 480 485	2333

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

atc ttc ttc att gag aga cgc cca agc aga tgg cca gca atg aag ttt 2381
 ile phe phe ile glu arg arg pro ser arg trp pro ala met lys phe
 490 495 500

cga aga ggc tca gga cac cct gcc tat gca gaa gtt gaa cca gtt gga 2429
 arg arg gly ser gly his pro ala tyr ala glu val glu pro val gly
 505 510 515

gag aaa gaa ggt ttt att gta tca gag cag tgc taa aatttttagga 2475
 glu lys glu gly phe ile val ser glu gln cys
 520 525 530

cagagcagca ccagtactgg cttacaggtg ttaagactaa aacttactgc tgtagacaga 2535
 agggcgacga gattttctgga caagcccagc ccaggaaacat tgaaggaaa actcagactt 2595
 gtacaagaca ccatgtacaa tgattaaaga attcctagt ggaatgacat ccattggttca 2655
 caaggacat ctccggtgga cttgccagga gtgtgacgag atgacgatgc ttttggttta 2715
 ggtgcagggt tgcaaggaaa tcaaggaaaa aaatatgac aataataaa gcttttagtcc 2775
 acaagggtgc ggcaaaaaaa aa 2797

<210> 38

<211> 530

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 38

Met Ala Arg Phe Arg Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ala Gly Val Met Leu
 1 5 10 15

Leu Cys His Phe Leu Thr Asp Arg Phe Gln Phe Ala His Gly Glu Pro
 20 25 30

Gly His His Thr Asn Asp Trp Ile Tyr Glu Val Thr Asn Ala Phe Pro
 35 40 45

Trp Asn Glu Glu Gly Val Glu Val Asp Ser Gln Ala Tyr Asn His Arg
 50 55 60

Trp Lys Arg Asn Val Asp Pro Phe Lys Ala Val Asp Thr Asn Arg Ala
 65 70 75 80

Ser Met Gly Gln Ala Ser Pro Glu Ser Lys Gly Phe Thr Asp Leu Leu
 85 90 95

Leu Asp Asp Gly Gln Asp Asn Asn Thr Gln Ile Glu Glu Asp Thr Asp
 100 105 110

35

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

His Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Pro Ala Asp Ser Ala Ser
 115 120 125
 Arg Asp Leu Trp Val Asn Ile Asp Gln Met Glu Lys Asp Lys Val Lys
 130 135 140
 Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala Ala Arg Val Asn
 145 150 155 160
 Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu Asn Glu Val Thr
 165 170 175
 Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val Val His Arg Met
 180 185 190
 Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asp Pro
 195 200 205
 Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Ala
 210 215 220
 Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp Asn Tyr Asn Leu
 225 230 235 240
 Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Leu Met Asp Gly Arg Ile Ile
 245 250 255
 Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln Ile Ser Ser Thr
 260 265 270
 Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe Val Val Val His
 275 280 285
 Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu Tyr
 290 295 300
 His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala Val
 305 310 315 320
 Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn Gly Cys Gly Pro
 325 330 335
 Cys Val Ser Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys Leu
 340 345 350
 Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val Asp
 355 360 365

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

Ser Gly Cys Pro Glu Glu Val Gln Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Lys
 370 375 380

Thr Glu Pro Gly Glu Thr Ser Gln Thr Thr Thr Thr Ser His Thr Thr
 385 390 395 400

Thr Met Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg Ala Val Thr Ser
 405 410 415

Gln Met Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Ala Leu
 420 425 430

His Leu Lys Asp Ser Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys
 435 440 445

Lys Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu
 450 455 460

Val Leu Ile Ile Ala Ala Ala Ile Leu Val Thr Val Tyr Met Tyr His
 465 470 475 480

His Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro Ser
 485 490 495

Arg Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly His Pro Ala Tyr
 500 505 510

Ala Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe Ile Val Ser Glu
 515 520 525

Gln Cys
 530

<210> 39

<211> 2508

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (596) .. (2185)

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

<400> 39
 cctccggctg cgagaaagga cgcgcgcctt ggcgcggcgc aagaaaagaa gcaaaacttg 60
 tcgggagggt ttgcctatca acctccttcc cgaaaacctc aacctcctgc cggggccatc 120
 cctagacaga ggaagttcc tgcagagcgc accagcccta gtggatctgg ggcaggcagc 180
 ggcgcctggct gtggaattag atctgttttg aaccoagtg agcgcctcgc tggggctcgg 240
 aagtcaccgt cgcgcgggac cgggttggcg ctgcgcaggt ggaaccgaca gtttgcgagc 300
 ctgcgctgca agtggcctct cctcccccgc gtgtgtgttc agtgcgggt gagggtcgcg 360
 agtgcggcaa gttgcaaga ggcctcaga ggtccgaaga gcgctgcgt cctactcgcg 420
 ttgccttctt cctcttctcg gttccctact gtgaaatcgc agcgacattt acaaaagcct 480
 ccgggtccta ccgagacaga tccgcagcgt ttggcccggt cgcgcctatt gcacggggag 540
 cccccgagca ccggcgaagg actggcgggt ggggtaggga ggtggcggcg gcggc atg 598
 Met
 1
 gcg agg ttc cgc aag gcc gac ctg gcc gct gca gga gtt atg tta ctt 646
 Ala Arg Phe Pro Lys Ala Asp Leu Ala Ala Gly Val Met Leu Leu
 5 10 15
 tgc cac ttc ttc acg gac cag ttt cag ttc gcc gat ggg aaa ccc gga 694
 Cys His Phe Phe Thr Asp Gln Phe Gln Phe Ala Asp Gly Lys Pro Gly
 20 25 30
 gac caa atc ctt gat tgg cag tat gga gtt act cag gcc ttc cct cac 742
 Asp Gln Ile Leu Asp Trp Gln Tyr Gly Val Thr Gln Ala Phe Pro His
 35 40 45
 aca gag gag gag gtg gaa gtt gat tca cac gcg tac agc cac agg tgg 790
 Thr Glu Glu Glu Val Glu Val Asp Ser His Ala Tyr Ser His Arg Trp
 50 55 60 65
 aaa aga aac ttg gac ttt ctc aag gcg gta gac acg aac cga gca agc 838
 Lys Arg Asn Leu Asp Phe Leu Lys Ala Val Asp Thr Asn Arg Ala Ser
 70 75 80
 gtc gcc caa gac tct cct gag ccc aga agc ttc aca gac ctg ctg ctg 866
 Val Gly Gln Asp Ser Pro Glu Pro Arg Ser Phe Thr Asp Leu Leu Leu
 85 90 95
 gat gat ggg cag gac aat aac act cag atc gag gag gat aca gac cac 934
 Asp Asp Gly Gln Asp Asn Asn Thr Gln Ile Glu Glu Asp Thr Asp His
 100 105 110
 aat tac tat ata tct cga ata tat ggt cca tct gat tct gcc agc cgg 982
 Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Pro Ser Asp Ser Ala Ser Arg
 115 120 125
 gat tta tgg gtg aac ata gac caa atg gaa aaa gat aaa gtg aag att 1030
 Asp Leu Trp Val Asn Ile Asp Gln Met Glu Lys Asp Lys Val Lys Ile
 130 135 140 145
 cat gga ata ttg tcc aat act cat cgg caa gct gca aga gtg aat ctg 1078
 His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala Ala Arg Val Asn Leu
 150 155 160

WO 02/051868	PCT/IB01/02839
tcc ttc gat ttt cca ttt tat ggc cac ttc cta cgt gaa atc act gtg Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu Arg Glu Ile Thr Val 165 170 175	1126
gca acc ggg ggt ttc ata tac act gga gaa gtc gta cat cga atg cta Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val Val His Arg Met Leu 180 185 190	1174
aca gcc aca cag tac ata gca cct tta atg gca aat ttc gat ccc agt Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asp Pro Ser 195 200 205	1222
gta tcc aga aat tca act gtc aga tat ttt gat aat ggc aca gca ctt Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Ala Leu 210 215 220 225	1270
gtg gtc cag tgg gac cat gta cat ctc cag gat aat tat aac ctg gga Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp Asn Tyr Asn Leu Gly 230 235 240	1318
agc ttc aca ttc cag gca acc ctg ctc atg gat gga cga atc atc ttt Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Met Asp Gly Arg Ile Ile Phe 245 250 255	1366
gga tac aaa gaa att cct gtc ttg gtc aca cag ata agt tca acc aat Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln Ile Ser Ser Thr Asn 260 265 270	1414
cat cca gtg aaa gtc gga ctg tcc gat gca ttt gtc gtt gtc cac agg His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe Val Val Val His Arg 275 280 285	1462
atc caa caa att ccc aat gtt cga aga aga aca att tat gaa tac cac Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu Tyr His 290 295 300 305	1510
cga gta gag cta caa atg tca aaa att acc aac att tog gct gtg gag Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala Val Glu 310 315 320	1558
atg acc cca tta ccc aca tgc ctc cag ttt aac aga tgt ggc ccc tgt Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn Arg Cys Gly Pro Cys 325 330 335	1606
gta tct tct cag att ggc ttc aac tgc agt tgg tgt agt aaa ctt caa Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys Leu Gln 340 345 350	1654
aga tgt tcc agt gga ttt gat cgt cat cgg cag gac tgg gtg gac agt Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val Asp Ser 355 360 365	1702
gga tgc cct gaa gag tca aaa gag aag atg tgt gag aat aca gaa cca Gly Cys Pro Glu Glu Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Asn Thr Glu Pro 370 375 380 385	1750
gtg gaa act tct tct cga acc acc aca acc gta gga gcg aca acc acc Val Glu Thr Ser Ser Arg Thr Thr Thr Thr Val Gly Ala Thr Thr Thr 390 395 400	1798

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

cag ttc agg gtc cta act acc acc aga aga gca gtg act tct cag ttt 1846
 Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg Ala Val Thr Ser Gln Phe
 405 410 415

ccc acc agc ctc cct aca gaa gat gat acc aag ata gca cta cat cta 1894
 Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Ala Leu His Leu
 420 425 430

aaa gat aat gga gct tct aca gat gac agt gca gct gag aag aaa ggg 1942
 Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys Lys Gly
 435 440 445

gga acc ctc cac gct ggc ctc atc gtt gga atc ctc atc ctg gtc ctc 1990
 Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu Val Leu
 450 455 460 465

att gta gcc aca gcc att ctt gtg aca gtc tat atg tat cac cac cca 2038
 Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu Val Thr Val Tyr Met Tyr His His Pro
 470 475 480

aca tca gca gcc agc atc ttc ttt att gag aga cgc cca agc aga tgg 2086
 Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro Ser Arg Trp
 485 490 495

cct gcg atg aag ttt aga aga ggc tct gga cat cct gcc tat gct gaa 2134
 Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly His Pro Ala Tyr Ala Glu
 500 505 510

gtt gaa cca gtt gga gag aaa gaa ggc ttt att gta tca gag cag tgc 2182
 Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe Ile Val Ser Glu Gln Cys
 515 520 525

taa aattctagg acagaacaac accagtactg gttacaggt gttaagacta 2235

aaattttgcc tatactttta agacaaacaa acaaacacac acacaaacaa gctotaagct 2295

gctgtagcct gaagaagaca agattctgg acaagctcag cccaggaac aaagggtaaa 2355

caaaaaacta aaacttatac aagataccat ttactactgaa catagaattc cctagtggaa 2415

tgctatctat agttcactcg gaacatctcc cgtggactta tctgaagtat gacaagatta 2475

taatgctttt ggcttagtg caggggtgca aag 2508

<210> 40

<211> 529

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Ala Arg Phe Pro Lys Ala Asp Leu Ala Ala Ala Gly Val Met Leu
 1 5 10 15

Leu Cys His Phe Phe Thr Asp Gln Phe Gln Phe Ala Asp Gly Lys Pro
 20 25 30

40

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

Gly Asp Gln Ile Leu Asp Trp Gln Tyr Gly Val Thr Gln Ala Phe Pro
 35 40 45
 His Thr Glu Glu Glu Val Glu Val Asp Ser His Ala Tyr Ser His Arg
 50 55 60
 Trp Lys Arg Asn Leu Asp Phe Leu Lys Ala Val Asp Thr Asn Arg Ala
 65 70 75 80
 Ser Val Gly Gln Asp Ser Pro Glu Pro Arg Ser Phe Thr Asp Leu Leu
 85 90 95
 Leu Asp Asp Gly Gln Asp Asn Asn Thr Gln Ile Glu Glu Asp Thr Asp
 100 105 110
 His Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Pro Ser Asp Ser Ala Ser
 115 120 125
 Arg Asp Leu Trp Val Asn Ile Asp Gln Met Glu Lys Asp Lys Val Lys
 130 135 140
 Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala Ala Arg Val Asn
 145 150 155 160
 Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu Arg Glu Ile Thr
 165 170 175
 Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val Val His Arg Met
 180 185 190
 Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asp Pro
 195 200 205
 Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Ala
 210 215 220
 Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp Asn Tyr Asn Leu
 225 230 235 240
 Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Leu Met Asp Gly Arg Ile Ile
 245 250 255
 Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln Ile Ser Ser Thr
 260 265 270
 Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe Val Val Val His
 275 280 285

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu Tyr
 290 295 300
 His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala Val
 305 310 315 320
 Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn Arg Cys Gly Pro
 325 330 335
 Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys Leu
 340 345 350
 Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val Asp
 355 360 365
 Ser Gly Cys Pro Glu Glu Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Asn Thr Glu
 370 375 380
 Pro Val Glu Thr Ser Ser Arg Thr Thr Thr Thr Val Gly Ala Thr Thr
 385 390 395 400
 Thr Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg Ala Val Thr Ser Gln
 405 410 415
 Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Ala Leu His
 420 425 430
 Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys Lys
 435 440 445
 Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu Val
 450 455 460
 Leu Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu Val Thr Val Tyr Met Tyr His His
 465 470 475 480
 Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro Ser Arg
 485 490 495
 Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly His Pro Ala Tyr Ala
 500 505 510
 Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe Ile Val Ser Glu Gln
 515 520 525
 Cys

WO 02/051868

PCT/IB01/02839

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> primer #2728F

<400> 41

agcaaatacc caatgttoga a

21

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> primer #2728R

<400> 42

agatgtcaca gctctcctgg t

21

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> primer

<400> 43

taatacgact cactataggg

20

<210> 44

<211> 26

<212> DNA

<213> primer

<400> 44

ctcgggaagc gcgccattgt gttggt

26

<210> 45

<211> 30

<212> DNA

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

<213> primer #2728RACE1

<400> 45
aactggaacc ggtctgttaa aaagtgacaa 30

<210> 46

<211> 17

<212> DNA

<213> primer M13 Reverse

<400> 46
caggaaacag ctatgac 17

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> primer

<400> 47
gatttttaggt gacactatag 20

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> primer H2728F

<400> 48
cattcctccg gctgcgagaa agga 24

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> primer H2728R

<400> 49
atttctttgc aacctgcac ctaa 24

WO 02/051868 PCT/IB01/02839

<210> 50
<211> 38
<212> DNA
<213> primer m2760orfF

<400> 50
cogctcgagc caccatggca aggttcgga gggccgac 38

<210> 51
<211> 28
<212> DNA
<213> primer m2728orfR

<400> 51
cggaattctt attgggttcac tctgtctg 28

<210> 52
<211> 38
<212> DNA
<213> primer h2728orfF

<400> 52
cogctcgagc caccatggcg aggttcgga aggcgac 38

<210> 53
<211> 33
<212> DNA
<213> primer h2728orfR

<400> 53
ccggaattct tagcactgct ctgatacaat aaa 33

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 July 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/051868 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/705, 14/475, 16/28, C12N 5/10, C12Q 1/68, G01N 33/53, 33/566, A61K 38/17, 31/713, 39/395
(74) Agents: TOYAMA, Tsutomu et al.; Yokoyama Building 6th Floor, 4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0004 (JP).

(21) International Application Number: PCT/IB01/02839

(22) International Filing Date: 25 July 2001 (25.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: PCT/US00/35260
23 December 2000 (23.12.2000) US

(71) Applicant: KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA [JP/JP]; 10-1, Shinkawa 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-8288 (JP).

(72) Inventors: NISHIKAWA, Mitsuo; Iyaku Tansaku Kenkyusho, 3, Miyahara-cho, Takusakishi, Gunma 370-1295 (JP). LABAT, Ivan; 1735 Steiner Street, San Francisco, CA 94115 (US). DRMANAC, Radoje, T.; 850 East Greenwich Place, Palo Alto, CA 94303 (US). TANG, Y., Tom; 4230 Ranvie Court, San Jose, CA 95118 (US). CHAO, Cheng-Chi; 19980 Portal Plaza, Cupertino, CA 95014 (US). MIZE, Nancy; 622 Mountain View Avenue, Mountain View, CA 94041 (US). CHILDS, John; 611 Arcadia Terr., Unit 303, Sunnyvale, CA 94085 (US).

(81) Designated States (national): AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
30 May 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/051868 A3

(54) Title: METHODS AND MATERIALS RELATING TO STEM CELL GROWTH FACTOR-LIKE POLYPEPTIDES AND POLYNUCLEOTIDES

(57) Abstract: The invention novel polynucleotides and polypeptides encoded by such polynucleotides and mutants or variants thereof that correspond to a novel human and mouse secreted stem cell growth factor-like polypeptide. These polynucleotides comprise nucleic acid sequences isolated from cDNA libraries prepared from mouse bone marrow and human fetal liver spleen, ovary, adult brain, lung tumor, spinal cord, cervix, ovary, endothelial cells, umbilical cord, placental, lymphocyte, lung fibroblast, fetal brain, and testis. Other aspects of the invention include vectors containing processes for producing novel human secreted stem cell growth factor-like polypeptides, and antibodies specific for such polypeptides.

【手続補正書】

【提出日】平成15年2月10日(2003.2.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

幹細胞成長因子の活性を有するポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、配列番号27、29、33、37、もしくは39、それらの翻訳されるタンパク質をコードする部分、それらの成熟タンパク質をコードする部分、それらの細胞外部分、またはそれらの活性ドメインからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項2】

生物活性を有するポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で請求項1に記載のポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項3】

生物活性を有するポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、請求項1に記載のポリヌクレオチドと約90%を超える配列同一性を有するポリヌクレオチド。

【請求項4】

DNA配列である、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】

請求項1に記載のポリヌクレオチドの相補体を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項7】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項8】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを発現するように遺伝子操作した宿主細胞。

【請求項9】

前記ポリヌクレオチドは、前記宿主細胞において前記ポリヌクレオチドの発現を制御する調節配列と作動可能に結合している、請求項8に記載の宿主細胞。

【請求項10】

配列番号28、30、31、32、34、38、または40、それらの翻訳されるタンパク質をコードする部分、それらの成熟タンパク質をコードする部分、それらの細胞外部分、またはそれらの活性ドメインからなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項11】

請求項10に記載のポリペプチド、およびキャリアを含む組成物。

【請求項12】

配列番号28、30、31、32、34、38、または40からなる群から選択されるポリペプチド配列由来の少なくとも10個の連続したアミノ酸を含む、幹細胞成長因子様活性を有するポリペプチド。

【請求項13】

配列番号28、30、31、32、34、38、または40からなる群から選択されるポリペプチド配列由来の少なくとも5個の連続したアミノ酸を含む、請求項12に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

請求項 12 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 15】

請求項 13 に記載するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 16】

請求項 10 に記載するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 17】

請求項 10 に記載のポリペプチドに特異的な抗体。

【請求項 18】

試料中の、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを検出する方法であって：

- a) 該試料を、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドに結合して、該ポリヌクレオチドとの複合体を形成する化合物と、該複合体を形成するのに十分な期間接触させ、
 - b) 該複合体を検出し、もし複合体が検出される場合、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドが検出されること
- を含む方法。

【請求項 19】

試料中の、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを検出する方法であって：

- a) 該試料を、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドにアニーリングする核酸プライマーと、かかる条件下で接触させ、
 - b) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの少なくとも一部を含む産物を増幅し、そして
 - c) 前記産物、およびそれによって該試料中の請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを検出すること
- を含む方法。

【請求項 20】

前記ポリヌクレオチドは、RNA 分子を含み、前記方法はアニーリングされた RNA 分子を、cDNA ポリヌクレオチドへ逆転写することをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

試料中の、請求項 10 に記載のポリペプチドを検出する方法であって：

- a) 該試料を、前記ポリペプチドに結合して、該ポリペプチドとの複合体を形成する化合物と、該複合体を形成するのに十分な条件下で、そして十分な期間接触させ、そして
 - b) 該複合体の構造を検出し、もし複合体の構造が検出される場合、請求項 11 に記載のポリペプチドが検出されこと
- を含む方法。

【請求項 22】

請求項 11 に記載のポリペプチドに結合する化合物を特定する方法であって：

- a) 該化合物を、請求項 10 に記載のポリペプチドと、ポリペプチド／化合物複合体を形成するのに十分な条件下で、そして十分な期間接触させ、そして
 - b) 該化合物を検出し、もし該ポリペプチド／化合物複合体が検出される場合、請求項 10 に記載のポリペプチドに結合する化合物が特定されること
- を含む方法。

【請求項 23】

請求項 10 に記載のポリペプチドに結合する化合物を特定する方法であって：

- a) 細胞において、該化合物を、請求項 10 に記載のポリペプチドと、ポリペプチド／化合物複合体を形成するのに十分な期間接触させ（ここで、該複合体は、細胞においてレポーター遺伝子の発現を駆動する）、そして
 - b) レポーター遺伝子配列の発現を検出することにより該複合体を検出し、もし該ポリペプチド／化合物複合体が検出される場合、請求項 10 に記載のポリペプチドに結合する化合物が特定されること
- を含む方法。

【請求項 24】

幹細胞成長因子様ポリペプチドを生産する方法であって：

- a) 請求項 8 に記載の宿主細胞を、前記細胞において該ポリペプチドを発現するのに十分な条件下で培養し、そして
- b) 工程 (a) の細胞培養物または細胞から、該ポリペプチドを単離することを含む方法。

【請求項 25】

請求項 10 に記載のポリペプチドを含むキット。

【請求項 26】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチド、または表面に結合させた請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの特有のセグメントを含む核酸アレイ

【請求項 27】

前記アレイは、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの特有のセグメントに対する完全なマッチを検出する、請求項 26 に記載のアレイ。

【請求項 28】

前記アレイは、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドの特有のセグメントに対するミスマッチを検出する、請求項 26 に記載のアレイ。

【請求項 29】

請求項 10 に記載の幹細胞成長因子様ポリペプチドの増大した活性または発現を必要とする被験体の治療方法であって：

- (a) 治療量の、前記ポリペプチドのアゴニスト、
 - (b) 治療量の、前記ポリペプチド、および
 - (c) 治療量の、該ポリペプチドが生産される形態かつ条件下にある前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
- からなる群から選択される組成物、ならびに薬学的に許容可能なキャリアを、該被験体に投与することを含む方法。

【請求項 30】

請求項 10 に記載の幹細胞成長因子様ポリペプチドの活性または発現を阻害することが必要な被験体の治療方法であって：

- (d) 治療量の、前記ポリペプチドのアンタゴニスト、
 - (e) 治療量の、前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を阻害するポリヌクレオチド、および
 - (f) 治療量の、該幹細胞成長因子様ポリペプチドと、そのリガンドに関して競合するポリペプチド
- からなる群から選択される組成物、ならびに薬学的に許容可能なキャリアを、該被験体に投与することを含む方法。

【請求項 31】

配列番号 28, 30, 31, 32, 34, 38、または 40 のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に結合する、請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 32】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片、単鎖抗体、二重特異性抗体、または異種結合抗体である、請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 33】

請求項 17 に記載の抗体を含むキット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IB 01/02839
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 C07K14/475 C07K16/28 C12N5/10 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 A61K38/17 A61K31/713 A61K39/395		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N C12Q G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 01 53500 A (CHILDS JOHN ;HYSEQ INC (US); CHAO CHENG CHI (US); LABAT IVAN (US);) 26 July 2001 (2001-07-26) Nucleotide Seq Id 27 Protein Seq Id 28	1-30
E	WO 02 10217 A (KINZLER KENNETH W ;ST CROIX BRAD (US); VOGELSTEIN BERT (US); UNIV) 7 February 2002 (2002-02-07) SEQ ID 199, 200	1-30
X	WO 00 77037 A (ASHKENAZI AVI J;GENENTECH INC) 21 December 2000 (2000-12-21) Sequence 127 figures 65,66 -/-	1-30
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 November 2002		Date of mailing of the international search report 05/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5416 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 940-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 940-2016		Authorized officer Aslund, J

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/IB 01/02839
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ST CROIX BRAD ET AL: "Genes expressed in human tumor endothelium." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 289, no. 5482, 2000, pages 1197-1202, XP002216776 ISSN: 0036-8075 cited in the application	
A	MIO H ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A CDNA FOR HUMAN, MOUSE, AND RAT FULL-LENGTH STEM CELL GROWTH FACTOR, A NEW MEMBER OF C-TYPE LECTIN SUPERFAMILY" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 249, no. 1, 1998, pages 124-130, XP002076567 ISSN: 0006-291X	
T	CARSON-WALTER ELEANOR B ET AL: "Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans." CANCER RESEARCH, vol. 61, no. 18, 15 September 2001 (2001-09-15), pages 6649-6655, XP002216775 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-30

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1999)

International Application No. PCT/IB 01 02839

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 29-30 (partially)

Present claims 29-30 (partially) relate to a product (a composition) defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the ability to exert an agonist or antagonist action on polypeptide of claim 10 or the ability to compete with said polypeptide for its ligand. The claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the products by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the polypeptide of claim 10, a nucleotide (sense and antisense) encoding said polypeptide or an antibody directed to said polypeptide.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/IB 01/02839
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 29,30 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. ☒ Claims Nos.: 29-30 (partially) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal application No
PCT/IB 01/02839

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0153500	A	26-07-2001	AU 2292401 A
			31-07-2001
			AU 2591801 A
			31-07-2001
			AU 2593601 A
			31-07-2001
			AU 2595501 A
			31-07-2001
			AU 2596501 A
			31-07-2001
			AU 2598301 A
			31-07-2001
			AU 2728401 A
			31-07-2001
			AU 2734401 A
			31-07-2001
			AU 2734801 A
			31-07-2001
			AU 2738501 A
			31-07-2001
			AU 3265701 A
			31-07-2001
			EP 1242596 A1
			25-09-2002
			EP 1240179 A2
			18-09-2002
			EP 1242580 A1
			25-09-2002
			EP 1242443 A1
			25-09-2002
			EP 1250346 A2
			23-10-2002
			EP 1254256 A2
			06-11-2002
			EP 1248848 A1
			16-10-2002
			WO 0153312 A1
			26-07-2001
			WO 0153453 A2
			26-07-2001
			WO 0153326 A1
			26-07-2001
			WO 0153454 A2
			26-07-2001
			WO 0153455 A2
			26-07-2001
			WO 0153456 A2
			26-07-2001
			WO 0153466 A1
			26-07-2001
			WO 0152616 A2
			26-07-2001
			WO 0153500 A1
			26-07-2001
			WO 0153515 A1
			26-07-2001
			WO 0153485 A1
			26-07-2001
			US 6465620 B1
			15-10-2002
			US 2002146692 A1
			10-10-2002
WO 0210217	A	07-02-2002	AU 8306201 A
			13-02-2002
			WO 0210217 A2
			07-02-2002
			WO 02083874 A2
			24-10-2002
WO 0077037	A	21-12-2000	AU 5152700 A
			02-01-2001
			EP 1208195 A2
			29-05-2002
			WO 0077037 A2
			21-12-2000
			AU 1748200 A
			19-06-2000
			AU 1749800 A
			04-10-2000
			AU 1749900 A
			12-07-2000
			AU 2390700 A
			05-02-2001
			AU 2495200 A
			28-09-2000
			AU 2600800 A
			28-09-2000
			AU 2879400 A
			31-07-2001
			AU 2883600 A
			28-09-2000
			AU 2883700 A
			09-01-2001
			AU 2883900 A
			30-01-2001
			AU 3107000 A
			19-06-2000
			AU 3246100 A
			28-12-2000
			AU 3381600 A
			28-09-2000
			AU 3514400 A
			28-09-2000
			AU 3774300 A
			18-12-2000
			AU 5441200 A
			18-12-2000
			EP 1173563 A1
			23-01-2002
			EP 1159419 A1
			05-12-2001
			EP 1220905 A2
			10-07-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International	Application No
PCT/IB	01/02839

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0077037	A	EP 1210418 A1	05-06-2002
		EP 1212417 A2	12-06-2002
		EP 1135485 A2	26-09-2001
		EP 1141284 A2	10-10-2001
		EP 1135491 A2	26-09-2001
		JP 2002531092 T	24-09-2002
		WO 0053753 A2	14-09-2000
		WO 0053755 A2	14-09-2000
		WO 0153486 A1	26-07-2001
		WO 0053756 A2	14-09-2000
		WO 0078961 A1	28-12-2000
		WO 0104311 A1	18-01-2001
		WO 0075327 A1	14-12-2000
		WO 0053757 A2	14-09-2000
		WO 0053758 A2	14-09-2000
		WO 0073454 A1	07-12-2000
		WO 0073445 A2	07-12-2000
		WO 0032221 A2	08-06-2000
		WO 0032778 A2	08-06-2000
		WO 0055319 A1	21-09-2000
		WO 0037638 A2	29-06-2000
		WO 0105836 A1	25-01-2001
		US 2002010137 A1	24-01-2002
		AU 4851900 A	28-12-2000
		EP 1185642 A2	13-03-2002
		WO 0075317 A2	14-12-2000
		AU 2192800 A	12-07-2000
		AU 3107700 A	28-09-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 14/475	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/475	C 0 7 K 16/22	4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/22	C 1 2 M 1/00	4 H 0 4 5
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/34	
C 1 2 M 1/34	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	H
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 15/00	F
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

フロッピー

テフロン

(72)発明者 ラバット, アイヴァン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 5 サンフランシスコ スタイナー ストリート 1
7 3 5

(72)発明者 ドルマナック, ラドジェ ティー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 3 パロ アルト イースト グリーンウィッチ プ
レイス 8 5 0

(72)発明者 タン, トム ワイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 1 1 8 サン ノゼ ランウイック コート 4 2 3 0

(72)発明者 カオ, チェンーチ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 1 4 クーパーティノ ポータル プラザ 1 9 9 8 0

(72)発明者 マイズ, ナンシー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 4 1 マウンテン ビュー マウンテン ビュー アベ
ニュー 6 6 2

(72)発明者 チャイルズ, ジョン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 5 サニーバール ユニット 3 0 3 アルカディア
テラス 6 1 1

Fターム(参考) 2G045 AA35 BB14 BB24 BB50 BB51 CB01 DA13 FA16 FB02 JA01
4B024 AA01 AA11 AA19 BA21 CA04 CA07 CA09 CA12 CA20 DA02
DA03 DA06 EA02 EA04 FA01 GA11 GA13 GA25 HA03 HA11
HA13 HA14
4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15
4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ43 QQ53
QQ61 QQ79 QQ89 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR48 QR56
QR62 QR77 QR80 QR84 QS16 QS25 QS33 QS34 QS36 QX01
QX02
4B064 AG02 CA02 CA10 CA19 CC01 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA26X AA58X AA72X AA90X AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AC14
BA02 BA05 BA16 BB01 BC03 BC26 BD14 CA24 CA43 CA44
CA46
4C084 AA01 AA13 AA17 BA02 BA44 CA18 CA23 CA53 DB52 NA14
ZA162 ZB262
4C086 AA01 EA16 NA14 ZA16 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA01 DA75 EA20
EA50 FA71 FA74 GA01 GA26