

(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2005-508172

(P2005-508172A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 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 39/395 Y	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 153 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-541767 (P2003-541767)	(71) 出願人	500287639
(86) (22) 出願日	平成14年11月7日 (2002. 11. 7)		ミレニアム・ファーマシューティカルズ・
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月19日 (2003. 12. 19)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/035824		MILLENNIUM PHARMACE
(87) 国際公開番号	W02003/039475		UTICALS, INC.
(87) 国際公開日	平成15年5月15日 (2003. 5. 15)		アメリカ合衆国O2139マサチューセツ
(31) 優先権主張番号	60/344, 552		州ケンブリッジ、ランズタウン・ストリ
(32) 優先日	平成13年11月7日 (2001. 11. 7)		ート40番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 フラクタルカインレセプターのモジュレーターを同定する方法、およびフラクタルカインレセプターのモジュレーターを使用する方法

(57) 【要約】

本発明は、泌尿器系障害の診断および処置のための方法に関する。特に、本発明は、泌尿器系障害に関連する組織において、正常でのそれらの発現もしくは非泌尿器系障害状態での発現に対して、および/または泌尿器系障害に関連する処置に対して、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子の差示的な発現を同定する。本発明は、種々の泌尿器系疾患の診断的評価および予後、ならびにこのような状態についての素因を示す被験体を同定するための方法を記載する。本発明はまた、泌尿器系障害を調節し得る化合物を同定する方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

泌尿器系障害を処置し得る化合物を同定する方法であって、該方法は、313、333、5464、18817または33524の核酸発現あるいは313、333、5464、18817または33524のペプチド活性を調節する化合物の能力を評価し、それによって、疼痛障害を処置し得る化合物を同定する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

過形成を調節し得る化合物を同定する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 313、333、5464、18817または33524を発現する細胞と、試験化合物とを接触させる工程；および

b) 313、333、5464、18817または33524の核酸発現あるいは313、333、5464、18817または33524のポリペプチド活性を調節する化合物の能力を評価し、それによって、過形成を調節し得る化合物を同定する工程、を包含する、方法。

【請求項 3】

細胞と、313、333、5464、18817または33524のモジュレーターとを接触させ、それによって、細胞における過形成を調節する工程を包含する、細胞における過形成を調節する、方法。

【請求項 4】

前記細胞が、膀胱細胞または前立腺細胞である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 313、333、5464、18817または33524のモジュレーターが、有機低分子、ペプチド、抗体またアンチセンス核酸分子である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 313、333、5464、18817または33524のモジュレーターが、313、333、5464、18817または33524ペプチド活性を調節し得る、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 313、333、5464、18817または33524のモジュレーターが、有機低分子、ペプチド、抗体またアンチセンス核酸分子である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 313、333、5464、18817または33524のモジュレーターが、313、333、5464、18817または33524の核酸発現を調節し得る、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

異常な 313、333、5464、18817または33524のポリペプチド活性、あるいは異常な 313、333、5464、18817または33524の核酸発現によって特徴付けられる泌尿器系障害を有する被験体を処置するための方法であって、該方法は、313、333、5464、18817または33524のモジュレーターを被験体に投与し、それによって、泌尿器系疾患を有する該被験体を処置する工程を包含する、方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法であって、前記泌尿器系障害が、過剰活性 / 過剰感受性の膀胱を含む切迫尿失禁、溢流切迫尿失禁、膀胱、尿道もしくは中枢神経系 / 末梢神経系の機能不全によって引き起こされるストレス性切迫尿失禁、前立腺炎、良性前立腺過形成、前立腺癌、および腎臓障害を含む、方法。

【請求項 11】

前記 313、333、5464、18817または33524のモジュレーターが薬学的に受容可能な処方物において投与される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

前記 3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または 3 3 5 2 4 のモジュレーターが、有機低分子、ペプチド、抗体またアンチセンス核酸分子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または 3 3 5 2 4 のモジュレーターが、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または 3 3 5 2 4 のペプチド活性を調節し得る、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

本願は、米国仮出願第 6 0 / 3 4 4 , 5 5 2 号 (2 0 0 1 年 1 1 月 7 日出願) に対する優先権を主張する。米国仮出願第 6 0 / 3 4 4 , 5 5 2 号の内容全体は、本明細書中に参考として援用される。

【0 0 0 2】

尿失禁 (U I) には何種類があり、そのうち最も一般的な 2 つの尿失禁は、緊張性尿失禁 (S U I) および急迫性尿失禁 (U U I) である。S U I は、U U I と共存し得、それゆえ、混合型尿失禁と呼ばれる。U U I は、過活動性または過敏性膀胱として公知の複合物の一部であり、これは、U U I を伴うかまたは伴わない、頻尿 (f r e q u e n c y) および / または尿意促迫の症状を包含する。失禁を有する患者の 7 5 % は、高齢の女性である。

【0 0 0 3】

膀胱の過活動は、排尿筋の不安定性または反射亢進から生じ得る。きっかけは、膀胱における求心性末梢神経末端の活性増大または中枢神経系および / もしくは末梢神経節における阻害制御の低減を包含し得る。排尿筋の筋肉の構造または機能における変化 (例えば、脱神経に起因した筋肉細胞の興奮性増大) はまた、この充填障害 (f i l l i n g d i s o r d e r) の病因において役割を果たし得る。

【0 0 0 4】

良性前立腺肥大 (B P H) は、世界中のヒトに罹患する一般的な加齢性病理状態である。6 0 歳では、少なくとも 2 5 % は、B P H の症状を有する。B P H の症状は現在、下部尿路症状 (L U T S) と呼ばれる。L U T S は、伝統的に、閉塞性症状 (流量低下 (w e a k s t r e a m) 、間欠性、緊張 (s t r a i n i n g) など) および刺激性症状 (頻尿、夜間多尿症、尿意促迫など) に分けられる。これらは、少なくとも 3 つの病態生理学的要素 (すなわち、静的排尿筋関連要素、動的排尿筋関連要素および膀胱排尿筋関連要素) によって引き起こされる。前立腺腫脹、またはより具体的には良性前立腺結節腫脹は、静的閉塞性要素の多くの原因であり、そして高齢の男性においては、移行帯および尿道周囲腺組織に主に制限されている。対照的に、動的成分は、前立腺および膀胱頸部における平滑筋緊張の反映である。筋緊張における変動は、出口の閉塞程度において対応する変化を引き起こす。膀胱および排尿筋関連成分は、主に刺激性症状を有する人において優勢であると考えられる。これらは、阻害されない排尿筋収縮の発生の増大および同時に、膀胱の収縮能力の喪失を反映し、これらは両方とも、既存の閉塞に対する応答である。

【0 0 0 5】

U I および B P H に有用な治療に関して、未だ満たされていない医学的必要性が存在する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

本発明は、U I および B P H を含むがこれらに限定されない泌尿器系障害の診断および処置のための方法および組成物を提供する。本明細書中で使用される場合、泌尿器系障害は、膀胱、尿道または中枢神経系 / 末梢神経系の機能不全によって引き起こされる、尿失禁 (過活動膀胱 / 過敏膀胱を含む) 、溢流性尿失禁、緊張性尿失禁を含むがこれらに限定されない、膀胱の疾患であり得る。

10

20

30

40

50

【0007】

本明細書中で使用される場合、泌尿器系障害は、雄性骨盤領域において生じた、例えば、雄性性機能不全および/または尿症状によって特徴付けられる、異常な状態を言及する「前立腺障害」を含むがこれらに限定されない、前立腺の障害であり得る。この障害は、前立腺炎、良性前立腺肥大および前立腺の癌（例えば、腺癌または癌）を含む、前立腺のいくつかの一般的疾患においてように、尿生殖器炎症（例えば、平滑筋細胞の炎症）の形態で症状発現し得る。

【0008】

本明細書中で使用される場合、泌尿器系障害は、以下を含むがこれらに限定されない腎臓の障害であり得る：先天異常（腎臓の嚢胞疾患（嚢胞腎臓形成異常、常染色体優性（成人）多発性嚢胞腎疾患、常染色体劣性（小児期）多発性嚢胞腎疾患、および腎髄質の嚢胞疾患（髄質海綿腎、および複合型腎ろう - 尿毒症髄質嚢胞疾患（nephronophthisis-uremic medullary cystic disease complex）、後天性（透析関連）嚢胞疾患（例えば、単純嚢腫）を含むがこれらに限定されない）を含むがこれらに限定されない）を含むがこれらに限定されない）；糸球体疾患（インサイチュ免疫複合体沈着（抗GBM腎炎、ヘイマン腎炎、および移植した抗原に対する抗体）を含むがこれらに限定されない糸球体傷害の病理を含む）、循環免疫複合体腎炎、糸球体細胞に対する抗体、糸球体腎炎における細胞媒介免疫、第2補体経路の活性化、上皮細胞傷害、および糸球体傷害のメディエーター（細胞メディエーターおよび可溶性メディエーターを含む）を含む病理、急性糸球体腎炎（例えば、急性増殖（溶連菌後（poststreptococcal）、感染後）糸球体腎炎（溶連菌感染後糸球体腎炎および非溶連菌性急性糸球体腎炎、急速進行性（半月体）糸球体腎炎、ネフロローゼ症候群、膜性糸球体腎炎（膜性腎症）、微小変化疾患（minimal change disease）（リポイドネフロローゼ）、巣状分節状糸球体硬化症、膜性増殖性糸球体腎炎、IgA腎症（パーガー疾患）、巣状増殖性および壊死性糸球体腎炎（巣状糸球体腎炎）を含むがこれらに限定されない）、遺伝性腎炎（アルポート症候群および薄膜疾患（良性家族性血尿）を含むがこれらに限定されない）、慢性糸球体腎炎、全身性疾患（全身性エリテマトーデス、ヘーノホ - シェーンライン紫斑病、細菌性心内膜炎、糖尿病性糸球体硬化症、アミロイドーシス、線維性およびイムノトクトイド（immunotactoid）糸球体腎炎、および他の全身性障害を含むがこれらに限定されない）に関連した糸球体損傷；細管および間隙に罹患する疾患（急性細管壊死および尿細管間質性腎炎（腎盂腎炎および尿路感染症を含むがこれらに限定されない）を含む）、急性腎盂腎炎、慢性腎盂腎炎および逆流性腎症、ならびに薬物および毒素によって誘導される尿細管間質性腎炎（急性薬物誘発性間質性腎炎、鎮痛薬濫用腎症、非ステロイド性抗炎症薬物に関連した腎症、および他の尿細管間質性疾患（尿酸腎症、高カルシウム血症および腎石灰症、および多発性骨髄腫を含むがこれらに限定されない）を含むがこれらに限定されない）；血管の疾患（良性腎硬化症、悪性高血圧症および加速性腎硬化症を含む）、腎動脈狭窄、および血栓性細小血管症（古典的（小児期）溶血性尿毒症症候群、成人溶血性尿毒症症候群 / 血栓性血小板減少性紫斑病、特発性HUS / TTP、および他の血管障害（アテローム硬化性虚血性腎臓疾患、アテローム塞栓性腎臓疾患、鎌状赤血球疾患腎症、びまん性皮質壊死、および腎臓梗塞を含むがこれらに限定されない）を含むがこれらに限定されない）；尿路閉塞（閉塞性尿路疾患）；尿石症（腎石、結石）；ならびに腎臓の腫瘍（良性腫瘍（例えば、腎乳頭腺腫、腎線維腫または過誤腫（線維過誤腫）、血管筋脂肪腫、および膨大細胞腫）および悪性腫瘍（腎盂の尿路上皮癌を含む腎細胞癌（副腎腫、腎臓の腺癌）を含む）を含むがこれらに限定されない）。

【0009】

「処置」は、本明細書中で使用される場合、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の少なくとも1つの症状、または疾患もしくは障害に対する素因の治療（curing）、治癒（healing）、緩和（alleviating）、軽減（relieving）、変更（altering）、救済（remedying）、改善（ameliorating）

10

20

30

40

50

ng)、向上(improving)または影響(affecting)を目的とする、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状または疾患もしくは障害に対する素因を有する患者への治療薬剤の適用もしくは投与、またはこの患者由来の単離された組織もしくは細胞株への治療薬剤の適用もしくは投与と定義される。治療薬剤としては、低分子、ペプチド、抗体、リボザイムおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられるがこれらに限定されない。代表的な分子は、本明細書中に記載される。

【0010】

本発明は少なくとも一部、核酸分子およびタンパク質分子(以下に記載される)が、疾患状態においては、正常な状態、すなわち疾患でない状態におけるそれらの発現と比較して示差的に発現されるという知見に基づく。本発明の方法に従って同定される本発明の分子のモジュレーターは、UIおよびBPHを含むがこれらに限定されない疾患を調節(例えば、阻害、処置または予防)または診断するために用いられ得る。

10

【0011】

「示差的発現」は、本明細書中で使用される場合、遺伝子の時間的発現パターンおよび/または組織発現パターンにおける定量的相違および定性的相違の両方を包含する。従って、示差的に発現される遺伝子は、その発現が、正常な状態と比較して、疾患状態において活性化または不活化されていてもよい。発現が、正常状態と疾患状態とで、またはコントロール状態と実験状態とで異なる程度は、標準的な特徴付け技術(例えば、定量的PCR、ノーザン分析、差引きハイブリダイゼーション)を介して可視化されるに十分に大きいことのみを必要とする。示差的に発現される遺伝子の発現パターンは、疾患(例えば、UIおよびBPH)評価の予後判定もしくは診断の一部として用いられ得るか、または疾患(例えば、UIまたはBPH)の処置に有用な化合物を同定するための方法において用いられ得る。さらに、疾患に關与する示差的に発現される遺伝子は、標的遺伝子発現のレベルまたは標的遺伝子産物の活性のレベルの調節が、疾患状態(例えば、UIおよび/またはBPH)を治療、治癒、緩和、軽減、変更、救済、改善、向上または影響するように作用するように、標的遺伝子を提示し得る。標的遺伝子の発現または標的遺伝子産物の活性を調節する化合物は、疾患の処置において用いられ得る。本明細書中に記載される遺伝子は、疾患に關して示差的に発現され得、そして/またはそれらの産物は、疾患に対して重要な遺伝子産物と相互作用し得るが、これらの遺伝子はまた、さらなる疾患細胞プロセスに重要な機構に關与し得る。

20

30

【0012】

本発明の分子としては、以下の分類が挙げられるがこれらに限定されない: Gタンパク質共役レセプター(GPCR)。脂質メディエーターおよびリガンド型イオンチャネルのGPCRは、(特に、c線維における)増大した求心性神経活性に關連している。神経伝達物質を異化/代謝する酵素、神経伝達物質/ペプチドホルモンGPCR、プロテアーゼ/ペプチダーゼおよびトランスポーターは、以下に關与することが示されている: a) CNS/末梢神経節における低減した阻害コントロール、b) CNS/末梢神経節における増大した興奮性神経伝達、およびc) 排尿筋における遠心性刺激に対する増大した感度。cAMP/cGMPを異化/代謝する酵素、リガンド型イオンチャネル、Ca²⁺/K⁺チャネル、Ser/Thr-キナーゼおよびATPaseは、膀胱平滑筋収縮の筋原性調節に關係している。神経伝達物質GPCRおよびcAMP/cGMPを異化/代謝する酵素の關与は、膀胱の貯蔵反射の神経学的調節および筋原性の調節において実証されている。

40

【0013】

ペプチドホルモンGPCR、プロテイナーゼ/ペプチダーゼ、ステロイドおよび核ホルモンレセプターを異化/代謝する酵素は、テストステロン産生の内分泌調節に關与することが示されている。レセプターチロシンキナーゼおよびSer/Thr-キナーゼは、支質細胞由来増殖因子および局所因子を通して、BPHにおける初期上皮増殖を媒介することに関連している。ペプチドホルモン/神経伝達物質GPCRおよびトランスポーターは、平滑筋緊張の神経学的調節を媒介することが実証されている。cAMP/cGMPを異化/代謝する酵素、リガンド型イオンチャネル、Ca²⁺/K⁺チャネル、ATPaseは

50

、前立腺における平滑筋緊張の筋原性調節に関連している。

【0014】

(遺伝子番号313)

ヒト313配列(配列番号1)(GI:665580、フラクタルカイン(fractal kinase)レセプターV28としても公知)(これは、非翻訳領域を含めて、約3100ヌクレオチド長である)は、終結コドンを含めて約1068ヌクレオチドの推定メチオニン開始コード配列(配列番号1のコーディングとして示されるヌクレオチド、配列番号2)を含む。このコード配列は、355アミノ酸のタンパク質(配列番号3)(GI:407807)をコードする。

【0015】

TaqMan分析によって評価した場合、313のmRNAは、脳サンプルにおいて最大の発現を示す。313のmRNAはまた、BPHの前立腺細胞、胸部細胞および骨髄の単核細胞において中程度に発現される。さらに、TaqManデータは、313のmRNAが、BPHサンプルのうち3つにおいて、正常なヒト前立腺サンプルと比較してアップレギュレートされることを示す。313のmRNA発現は、前立腺の上皮および支質の両方において見られるが、支質において比較的より高いレベルである。免疫組織化学的データは、前立腺の腺領域を取り囲む支質細胞における発現を示す。

【0016】

313についてのリガンドはフラクタルカインであり、これは、上皮細胞および内皮細胞において発現されることが公知である。白血球の移動および接着におけるその主な役割に加えて、313のリガンドフラクタルカインは、いくつかの細胞におけるアポトーシスを阻害し、フラクタルカインは、脳小グリアのFas媒介細胞死を阻害する。フラクタルカインについてのレセプターである313の発現パターンは、313分子を介して作用するフラクタルカインが、前立腺において類似の役割を果たすことを示す。313活性を拮抗する薬剤は前立腺肥大を阻害し、そしてBPHについての治療剤として有用である。

【0017】

(遺伝子番号333)

ヒト333配列(配列番号4)(GI:14102645、C-Cケモカインレセプター5型(CCR5)として公知)(これは、非翻訳領域を含め、約1376ヌクレオチド長である)は、終結コドンを含め、約1059ヌクレオチドの推定メチオニン開始コード配列(配列番号4のコーディングとして示すヌクレオチド、配列番号5)を含む。このコード配列は、352アミノ酸のタンパク質(配列番号6)(GI:14102646)をコードする。

【0018】

TaqMan分析によって評価されるように、333 mRNAは、プールされた正常ヒト前立腺サンプルと比較して、4つのBPHサンプルのうち3つでアップレギュレートされた。これはまた、平滑筋細胞ならびに尿管において高度に発現されていた。その発現パターンを考慮すると、333活性を調節する薬剤は、BPHおよび/またはUIのための治療剤として有用である。

【0019】

(遺伝子ID5464)

ヒト5464配列(配列番号7)(GI:190443)(これは、非翻訳領域を含んで約647ヌクレオチド長であるプロスタグランジンDシンターゼ(PGD2)としても既知である)は、末端の終止コドンを含んで約573ヌクレオチド長である推定メチオニン開始コード配列を含む(配列番号7のコードとして示されるヌクレオチド、配列番号8)。コード配列は、190アミノ酸タンパク質(配列番号9)(GI:190444)をコードする。

【0020】

TaqMan分析によって評価されるように、5464 mRNAは、試験された組織の殆どにて発現され、前立腺組織および神経系組織において最もレベルが高かった。さらな

10

20

30

40

50

る T a q M a n 研究は、5 4 6 4 m R N A がプールされた正常ヒト前立腺サンプルと比較して B P H サンプルのうちの 3 つでアップレギュレートされたことを示した。前立腺間質細胞における 5 4 6 4 m R N A の発現は、前立腺の上皮細胞における 5 4 6 4 m R N A 発現の 3 倍高かった。

【0021】

一般的にプロスタグランジン (P G) そして特に 5 4 6 4 は、筋収縮に關与する分子であることが知られている。5 4 6 4 は、様々なモデルおよび様々な系における収縮を誘導することが示されている。例えば、モルモット肺実質ストリップにおいて、モルモット気管調製物において、膀胱排尿筋において、および心筋細胞において、5 4 6 4 は収縮を誘導する。B P H の最初期の変化は、間質増殖である。この増殖は、正常な間質よりも、多くの骨格筋かつ少ない弾性組織を含む。これらの細胞構成要素の収縮能力をブロックすることによって、B P H の症候状態は改善される。5 4 6 4 の発現パターンおよび多数の異なる組織における収縮を誘導する能力を考慮すると、5 4 6 4 活性をブロックする薬剤は、B P H および / または U I にとって有用な治療剤である。

10

【0022】

(遺伝子 I D 1 8 8 1 7)

非翻訳領域を含んで約 7 4 7 ヌクレオチド長であるヒト 1 8 8 1 7 配列 (配列番号 1 0) (G I : 6 1 6 6 2 4 8 、これはまた、カリクレイン様タンパク質 5 (K L K - L 5) として既知である) は、終止コドンを含んで約 7 4 7 ヌクレオチドの推定メチオニン開始コード配列 (配列番号 1 0 のコードとして示されるヌクレオチド、配列番号 1 1) を含む。コード配列は、2 4 8 アミノ酸のタンパク質 (配列番号 1 2) (G I : 6 1 6 6 2 4 9) をコードする。

20

【0023】

T a q M a n 分析によって評価されるように、1 8 8 1 7 m R N A は、正常ヒト前立腺における発現と比較したときに B P H サンプルにおいてアップレギュレートされる。さらに、これはまた、唾液腺腫ならびに前立腺腫瘍において高度に発現される。その発現パターンを考慮すると、1 8 8 1 7 の発現を調節する薬剤は、B P H および / または U I に対する治療剤として有用である。

【0024】

(遺伝子 I D 3 3 5 2 4)

非翻訳領域を含んで約 8 4 0 ヌクレオチド長であるヒト 3 3 5 2 4 配列 (配列番号 1 3) (G I : 1 5 3 9 1 6 0 0 、これはまたホスホリパーゼとして既知である) は、終止コドンを含んで約 4 5 9 ヌクレオチドの推定メチオニン開始コード配列 (配列番号 1 3 のコードとして示されるヌクレオチド、配列番号 1 4) を含む。コード配列は、1 5 2 アミノ酸のタンパク質 (配列番号 1 5) (G I : 1 5 3 9 1 6 0 1) を含む。

30

【0025】

T a q M a n 分析によって評価されるように、3 3 5 2 4 m R N A は、正常なヒト前立腺における発現と比較して B P H サンプル中でアップレギュレートされていた。さらに、3 3 5 2 4 m R N A は、膀胱平滑筋、精巢、および尿管において高度に発現されていた。その発現パターンを考慮すると、1 8 8 1 7 発現を調節する薬剤は、B P H および / または U I についての治療剤として有用である。

40

【0026】

本発明の種々の局面は、以下のサブセクションにおいてさらに詳細に記載される。

【0027】

(I . スクリーニングアッセイ)

本発明は、3 1 3 タンパク質、3 3 3 タンパク質、5 4 6 4 タンパク質、1 8 8 1 7 タンパク質または 3 3 5 2 4 タンパク質に結合しかつ例えば、3 1 3 , 3 3 3 , 5 4 6 4 , 1 8 8 1 7 または 3 3 5 2 4 の発現、あるいは 3 1 3 , 3 3 3 , 5 4 6 4 , 1 8 8 1 7 または 3 3 5 2 4 の活性に対して刺激効果または阻害効果を有するか、あるいは 3 1 3 , 3 3 3 , 5 4 6 4 , 1 8 8 1 7 または 3 3 5 2 4 の基質の発現または活性に対して刺激効果ま

50

たは阻害効果を有する、モジュレーター（すなわち、候補化合物もしくは試験化合物または候補薬剤もしくは試験薬剤）を同定するための方法（これはまた、本明細書中で「スクリーニングアッセイ」として述べられている）を提供する。本明細書中に記載のアッセイを使用して同定される化合物は、泌尿器系障害を処置するのに有用であり得る。

【0028】

これらのアッセイは、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質に結合する化合物、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質と相互作用する他の細胞内タンパク質または細胞外タンパク質に結合する化合物、および他の細胞内タンパク質または細胞外タンパク質と313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質との相互作用を妨害する化合物を同定するように設計されている。例えば、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質（これは、膜貫通レセプター型タンパク質である）の場合、このような技術は、このようなレセプターのためのリガンドを同定し得る。313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質のリガンドまたは基質は、例えば、泌尿器系障害の少なくとも1つの症状を改善するために使用され得る。このような化合物としては、ペプチド、抗体、または他の有機低分子もしくは無機低分子が挙げられ得るがこれらに限定されない。このような化合物はまた、他の細胞性タンパク質を含み得る。

10

20

【0029】

アッセイによって同定される化合物（例えば、本明細書に記載の化合物）は、泌尿器系障害を処置するのに有用であり得る。泌尿器系障害は、細胞または組織における、全体的に低いレベルの313、333、5464、18817または33524の遺伝子発現および/または313、333、5464、18817または33524のタンパク質により生じる例において、313、333、5464、18817または33524のタンパク質と相互作用する化合物は、結合した313、333、5464、18817または33524のタンパク質の活性を強調するかまたは増幅する化合物を含み得る。このような化合物は、313、333、5464、18817または33524のタンパク質活性のレベルの効果的な増大を引き起し、したがって、症状を改善する。

30

【0030】

他の例において、313、333、5464、18817または33524の遺伝子における変異は、泌尿器系障害にいたる有害な効果を有する、異常型または過剰量の、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質を生じ得る。同様に、生理学的状態は、泌尿器系障害に至る、313、333、5464、18817または33524の遺伝子発現の過剰な増大を引き起こし得る。このような場合、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質に結合する化合物は、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の活性を阻害するタンパク質として同定され得る。本節に記載されるような技術によって同定される化合物の効果を試験するためのアッセイは、本明細書中に議論されている。

40

【0031】

1つの実施形態において、本発明は、313、333、5464、18817または33524のタンパク質またはポリペプチドあるいはそれらの生物学的に活性な部分の基質である候補化合物または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。別の実施形態において、本発明は、313、333、5464、18817もしくは33524のタンパク質もしくはポリペプチドまたはその生物学的活性な部分に結合するかまたはその活性を調節するための候補化合物または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、以下に挙げられる当該分野で公知のコンビナト

50

リアルライブラリー法における多くのアプローチのうちの任意のものを使用して得られ得る：生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な並列固相ライブラリーまたは液相ライブラリー；デコンプレッション処理を必要とする合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択法を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されるが、その一方で、他の4つのアプローチは、化合物の、ペプチドライブラリー、非ペプチドオリゴマーライブラリー、または低分子ライブラリーに利用可能である (Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145)。

【0032】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、例えば、以下において、当該分野で見出され得る：DeWittら (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909；Erbら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422；Zuckermannら (1994)、*J. Med. Chem.* 37:2678；Choら (1993) *Science* 261:1303；Carrellら (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059；Carrellら (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061；およびGallopら (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233。

【0033】

化合物のライブラリーは、溶液中 (例えば、Houghten (1992) *Biotec hniques* 13:412~421)、ビーズ上 (Lam (1991) *Nature* 354:82~84)、チップ上 (Fodor (1993) *Nature* 364:555~556)、細菌上 (Ladner、米国特許第5,223,409号)、芽胞上 (Ladner、USP'409号)、プラスミド上 (Cullら (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865~1869) またはファージ上 (ScottおよびSmith (1990) *Science* 249:386~390)；(Devlin (1990) *Science* 249:404~406)；(Cwirllaら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378~6382)；(Felicci (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301~310)；(Ladner 前出) に存在し得る。

【0034】

1つの実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、ここで313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞を、試験化合物と接触させ、そして試験化合物が313、333、5464、18817、もしくは33524活性を調節する能力を決定する。試験化合物が313、333、5464、18817、もしくは33524活性を調節する能力の決定を、例えば、細胞内カルシウム、IP₃、cAMP、またはジアシルグリセロール濃度、細胞内タンパク質のリン酸化プロフィール、細胞増殖および/または移動、例えば、細胞表面接着分子もしくはUIおよび/もしくはBPHに関連する遺伝子の遺伝子発現、または313、333、5464、18817、もしくは33524調節転写因子の活性をモニタリングすることによって達成し得る。この細胞は、哺乳動物由来 (例えば、神経細胞由来) であり得る。1つの実施形態において、レセプタードメインと相互作用する化合物が、リガンドとして (すなわち、レセプターに結合し、シグナル伝達経路を調節するよう) 機能するそれらの能力についてスクリーニングされ得る。リガンドの同定、およびリガンド-レセプター複合体の活性の測定は、この相互作用のモジュレーター (例えば、アンタゴニスト) の同定を導く。このようなモジュレーターは、泌尿器系障害の処置に有用であり得る。

【0035】

試験化合物が、基質への313、333、5464、18817、もしくは33524の結合を調節する能力、または313、333、5464、18817、もしくは33524に結合する能力もまた、決定し得る。基質への313、333、5464、18817

、もしくは33524の結合を調節する試験化合物の能力の決定は、例えば、313、333、5464、18817、もしくは33524基質を、放射性同位体または酵素標識とカップリングさせることによって達成され得、その結果、313、333、5464、18817、もしくは33524への313、333、5464、18817、もしくは33524基質の結合は、複合体中の標識された313、333、5464、18817、もしくは33524基質を検出することによって、決定され得る。313、333、5464、18817、もしくは33524はまた、放射性同位体または酵素標識とカップリングされて、複合体中の313、333、5464、18817、もしくは33524基質への313、333、5464、18817、もしくは33524の結合を調節する試験化合物の能力をモニタリングし得る。313、333、5464、18817、もしくは33524と結合する試験化合物の能力の決定は、例えば、その化合物と、放射性同位体または酵素標識とをカップリングさせることによって達成され、その結果、313、333、5464、18817、もしくは33524へのこの化合物の結合は、複合体中の標識された313、333、5464、18817、もしくは33524化合物を検出することによって決定され得る。例えば、化合物（例えば、313、333、5464、18817、もしくは33524のリガンドまたは基質）を、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で、直接的または間接的のいずれかで標識し得、そしてこの放射性同位体が、放射線照射の直接的な計数によってか、またはシンチレーション計数によってかで検出され得る。化合物はさらに、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素標識され得、そして適切な基質の産物への変換を定量することによって、この酵素標識を検出し得る。

10

20

30

40

50

【0036】

化合物（例えば、313、333、5464、18817、もしくは33524のリガンドまたは基質）が、任意の相互作用物質（interactant）の標識化を有さない313、333、5464、18817、もしくは33524と相互作用する能力を、決定することもまた、本発明の範囲内である。例えば、マイクロフィジオメーター（microphysiometer）を使用して、化合物または313、333、5464、18817、もしくは33524のいずれかの標識化を有さない313、333、5464、18817、もしくは33524との化合物の相互作用を検出し得る（McConnell, H. M.ら（1992）Science 257: 1906-1912）。本明細書中で使用される場合、「マイクロフィジオメーター」（例えば、Cytosensor）は、光アドレス可能な電位差測定センサー（LAPS）を使用して、細胞がその環境を酸性化する速度を測定する、分析装置である。この酸性化速度の変化は、化合物と313、333、5464、18817、もしくは33524との間の相互作用の指標として使用され得る。

【0037】

別の実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、313、333、5464、18817、もしくは33524標的分子（例えば、313、333、5464、18817、もしくは33524基質）を発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程、および313、333、5464、18817、もしくは33524標的分子の活性を調節する（例えば、刺激または阻害）する試験化合物の能力を決定する工程を包含する。313、333、5464、18817、もしくは33524標的分子の活性を調節する試験化合物の能力の決定は、例えば、313、333、5464、18817、もしくは33524標的分子に結合するかまたは313、333、5464、18817、もしくは33524と相互作用する313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質の能力を決定することによって達成され得る。

【0038】

313、333、5464、18817、もしくは33524標的分子に結合するかまたはそれと相互作用する313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質またはその生物学的に活性なフラグメントの能力の決定は、直接結合の決定につい

ての上記方法の1つにより達成され得る。好ましい実施形態において、313、333、5464、18817、もしくは33524標的分子に結合するかまたはそれと相互作用する313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質の能力の決定は、その標的分子の活性を決定することによって達成され得る。例えば、標的分子の活性は、標的の細胞性セカンドメッセンジャー（すなわち、細胞内Ca²⁺、ジアシルグリセロール、IP₃、cAMP）の誘導を検出するか、適切な基質に対するその標的の触媒/酵素活性を検出するか、レポーター遺伝子（検出マーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動可能に連結された標的応答性調節エレメントを含む）の誘導を検出するか、または標的により調節される細胞応答（例えば、遺伝子発現）を検出することによって、決定され得る。

10

【0039】

さらに別の実施形態において、本発明のアッセイは、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質またはその生物学的に活性な部分が、試験化合物と接触され、そして313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する試験化合物の能力が決定される、無細胞アッセイである。本発明のアッセイにおいて使用される313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質の好ましい生物学的に活性な部分としては、非313、333、5464、18817、もしくは33524分子との相互作用に参与するフラグメント（例えば、高い表面確率スコアを有するフラグメント）が挙げられる。313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質への試験化合物の結合は、上記のように直接的かまたは間接的かのいずれかで決定され得る。好ましい実施形態において、このアッセイは、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質またはその生物学的に活性な部分と、313、333、5464、18817、もしくは33524に結合する既知の化合物とを接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物と、試験化合物を接触させる工程、および313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程（313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程は、既知の化合物と比較して313、333、5464、18817、もしくは33524またはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する試験化合物の能力を決定する工程を包含する）を包含する。313、333、5464、18817、もしくは33524と、既知の標的タンパク質との相互作用を調節する化合物は、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質（特に、変異313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質）の活性を調節するのに有用であり得る。

20

30

【0040】

別の実施形態において、アッセイは、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質またはその生物学的に活性な部分が試験化合物と接触され、そして313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する試験化合物の能力が決定される、無細胞アッセイである。313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質の活性を調節する試験化合物の能力の決定は、例えば、直接結合の決定についての上記の方法の1つにより、313、333、5464、18817、もしくは33524標的分子に結合する313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質の能力を決定することによって達成され得る。313、333、5464、18817、もしくは33524標的分子に結合する313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質の能力の決定はまた、リアルタイムBiomolecular Interaction Analysis (BLA) (Sjolander, S. およびUrbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63: 2338-2345 ならびにSzaboら (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705) のような技術を用いて達成され得る。本明細書中で

40

50

使用する場合、「BIA」は、いかなる相互作用物質も標識することなく、生物特異的相互作用をリアルタイムで研究するための技術である（例えば、BIACore）。表面プラズモン共鳴（SPR）の光学的現象の変化は、生物学的分子間のリアルタイムの反応の指標として使用され得る。

【0041】

別の実施形態において、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質の活性を調節する試験化合物の能力の決定は、313、333、5464、18817、もしくは33524標的分子の下流エフェクターの活性をさらに調節する313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質の能力を決定することにより達成され得る。例えば、適切な標的に対するエフェクター分子の活性が決定されるか、または適切な標的へのエフェクターの結合が、以前に記載されたように決定され得る。

10

【0042】

なお別の実施形態において、無細胞アッセイは、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質またはその生物学的に活性な部分と、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質に結合する既知の化合物とを接触させてアッセイ混合物を形成させる工程、そのアッセイ混合物と試験化合物を接触させる工程、および313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程（313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程は、313、333、5464、18817、もしくは33524標的分子に優先的に結合するかまたはその活性を調節する313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質の能力を決定する工程を包含する）を包含する。

20

【0043】

本発明の上記アッセイ方法の1つより多くの実施形態において、313、333、5464、18817、もしくは33524またはその標的分子のいずれかを固定化して、そのタンパク質の1つまたは両方の複合体化形態と非複合体化形態との分離を容易にすること、およびこのアッセイの自動化に適応させることが望ましくあり得る。候補化合物の存在下および非存在下での、試験化合物と、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質との結合、または313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質と、標的分子との相互作用は、反応物を収容するのに適した任意の容器で達成され得る。このような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管、およびマイクロ遠心分離管が挙げられる。1つの実施形態において、1つまたは両方のタンパク質がマトリクスに結合することを可能にするドメインを付加した融合タンパク質が、提供され得る。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/313、333、5464、18817、もしくは33524融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質が、グルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical, St. Louis, MO）またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、これらは、次いで、試験化合物、または試験化合物および非吸着標的タンパク質もしくは313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質のいずれかと合わされ、そしてこの混合物は、複合体形成が生じる条件下（例えば、塩およびpHについての生理学的条件）でインキュベートされる。インキュベーション後、このビーズまたはマイクロタイタープレートウェルは、全ての非結合成分を除去するために洗浄され、ビーズの場合、マトリクスが固定化され、複合体が、例えば、上記のように、直接的にかまたは間接的にかのいずれかで決定される。あるいは、複合体は、マトリクスから解離され得、そして標準的な技術を用いて、313、333、5464、18817、もしくは33524の結合または活性のレベルが決定される。

30

40

【0044】

タンパク質をマトリクス上に固定化するための他の技術がまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、313、333、5464、18817、もし

50

くは33524タンパク質または313、333、5464、18817、もしくは33524標的分子のいずれかは、ビオチンとストレプトアビジンとの結合体を使用して固定化され得る。ビオチン化された313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質または標的分子を、当該分野において公知の技術を使用して、ビオチン-NHS (N-ヒドロキシ-スクシンイミド) から調製し得 (例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals、Rockford、IL)、そしてストレプトアビジンでコーティングした96ウェルのプレート (Pierce Chemical) のウェル中に固定し得る。あるいは、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質または標的分子と反応性であるが、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質のその標的への結合と干渉しない抗体を、プレートのウェルに誘導体化し得、そして非結合標的または313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質が、抗体結合によってウェルに捕捉される。このような複合体を検出する方法としては、GST固定化複合体についての上記方法に加えて、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質または標的分子と反応性の抗体を用いる複合体の免疫検出、および313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質または標的分子と関連する酵素活性の検出に基づく酵素連結アッセイが挙げられる。

【0045】

別の実施形態において、313、333、5464、18817、もしくは33524発現のモジュレーターは、細胞が候補化合物と接触され、そして細胞中での313、333、5464、18817、もしくは33524のmRNAまたはタンパク質の発現が決定される方法が同定される。候補化合物の存在下での313、333、5464、18817、もしくは33524のmRNAまたはタンパク質の発現のレベルは、候補化合物の非存在下での313、333、5464、18817、もしくは33524のmRNAまたはタンパク質の発現のレベルと比較される。次いで、候補化合物は、この比較に基づき、313、333、5464、18817、もしくは33524発現のモジュレーターとして同定され得る。例えば、313、333、5464、18817、もしくは33524のmRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の非存在下よりも存在下で多い (統計的に有意に多い) 場合、候補化合物は、313、333、5464、18817、もしくは33524のmRNAまたはタンパク質発現の刺激物質として同定される。あるいは、313、333、5464、18817、もしくは33524のmRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の非存在下よりも存在下でより低い (統計学的に有意に低い) 場合、候補化合物は、313、333、5464、18817、もしくは33524のmRNAまたはタンパク質発現のインヒビターとして同定される。細胞中での313、333、5464、18817、もしくは33524のmRNAまたはタンパク質のレベルは、313、333、5464、18817、もしくは33524のmRNAまたはタンパク質の検出について本明細書中に記載される方法により決定され得る。

【0046】

本発明のなお別の局面において、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイ (例えば、米国特許第5,283,317号; Zervosら、(1993) Cell 72: 223~232; Maduraら (1993) J. Biol. Chem. 268: 12046~12054; Bartelら (1993) Biotechnology 14: 920~924; Iwabuchiら (1993) Oncogene 8: 1693-1696; および Brent WO94/10300を参照のこと) において「ベイト (bait) タンパク質」として使用されて、313、333、5464、18817、もしくは33524 (「313、333、5464、18817、もしくは33524結合タンパク質」または「313、333、5464、18817、もしくは33524-bp」と結合または相互作用し、そして313、333、5464、18817、もしくは33524活性に関連する他のタンパク質を同定し得る。このような313、333、5

464、18817、もしくは33524結合タンパク質はまた、例えば、313、333、5464、18817、もしくは33524媒介性シグナル伝達経路の下流エレメントのような、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質または313、333、5464、18817、もしくは33524標的によるシグナル伝達に関連する可能性がある。あるいは、このような313、333、5464、18817、もしくは33524結合タンパク質は、313、333、5464、18817、もしくは33524インヒビターである可能性がある。

【0047】

ツーハイブリッドシステムは、別個のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる大半の転写因子のモジュラー性質に基づく。手短には、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。1つの構築物において、313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質をコードする遺伝子は、公知の転写因子（例えば、GAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。もう一方の構築物において、同定されていないタンパク質（「プレイ（prey）」または「サンプル」）をコードするDNA配列のライブラリー由来のDNA配列は、公知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。「ベイト」タンパク質および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用して313、333、5464、18817、もしくは33524依存性複合体を形成し得る場合、転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、近接する。このように近接することにより、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結したレポーター遺伝子（例えば、lacZ）の転写が可能になる。レポーター遺伝子の発現は検出され得、そして機能的転写因子を含む細胞コロニーは、単離され得、そして313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするクローン化遺伝子を得るために使用され得る。

10

20

【0048】

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載されるアッセイの2つ以上の組み合わせに関する。例えば、調節剤は、細胞ベースのアッセイまたは無細胞アッセイを用いて同定され得、そして313、333、5464、18817、もしくは33524タンパク質の活性を調節する因子の能力は、例えば、動物（例えば、本明細書中に記載される、泌尿器系障害の動物モデル）においてインビボで確認され得る。

【0049】

本発明は、さらに上記のスクリーニングアッセイによって同定される新規薬剤に関する。従って、適切な動物モデルにおいて、本明細書中に記載されるように同定された薬剤をさらに使用することは本発明の範囲内である。例えば、本明細書中に記載されるように同定された薬剤（例えば、313、333、5464、18817、もしくは33524調節剤、アンチセンス313、333、5464、18817、もしくは33524核酸分子、313、333、5464、18817、もしくは33524特異的抗体、または313、333、5464、18817、もしくは33524結合パートナー）は、このような薬剤を用いる処置の効果、毒性、または副作用を決定するために、動物モデルにおいて使用され得る。あるいは、本明細書中に記載されるように同定される薬剤は、このような薬剤の作用の機構を決定するために、動物モデルにおいて使用され得る。さらに、本発明は、本明細書中に記載されるような処置のための上記スクリーニングアッセイによって同定された新規薬剤の使用に関する。

30

40

【0050】

任意の化合物（上記アッセイ系において同定されるような化合物が挙げられるがこれらに限定されない）が、泌尿器系障害の少なくとも1つの徴候を改善する能力について試験され得る。泌尿器系障害の少なくとも1つの徴候を改善するこのような能力を示す化合物の同定のための細胞ベースのアッセイおよび動物モデルベースのアッセイは、本明細書中に記載される。

【0051】

さらに、泌尿器系障害の動物ベースのモデル（例えば、本明細書中に記載されるようなモ

50

デル)は、泌尿器系障害を処置し得る化合物を同定するために使用され得る。このような動物モデルは、泌尿器系障害を処置する上で有効であり得る薬物、医薬品、治療、および介入の同定のための試験基質として使用され得る。例えば、動物モデルは、泌尿器系障害を処置する能力を示すことが予測される化合物に、曝露された動物における泌尿器系障害の少なくとも1つの徴候のこのような改善を導くのに十分な濃度および十分な時間、曝露され得る。この曝露に対する動物の応答は、処置の前および後の泌尿器系障害の徴候の逆転を評価することによりモニタリングされ得る。

【0052】

本発明に関して、泌尿器系障害の任意の局面を逆転する(すなわち、UIおよび/またはBPHに対する効果を有する)任意の処置が、ヒト泌尿器系障害治療介入の候補として考慮されるべきである。試験薬剤の用量は、用量応答曲線を得ることによって決定され得る。

10

【0053】

さらに、遺伝子発現パターンは、泌尿器系障害の少なくとも1つの徴候を改善する化合物の能力を評価するために使用され得る。例えば、1つ以上の遺伝子の発現パターンは、「遺伝子発現プロファイル」または「転写プロファイル」の一部を形成し得、次いで、このような評価において使用され得る。本明細書中で使用される場合、「遺伝子発現プロファイル」または「転写プロファイル」は、所定のセットの条件下で、所定の組織または細胞型について獲得されるmRNA発現のパターンを含む。遺伝子発現プロファイルは、例えば、ディファレンシャルディスプレイ手順、ノーザン分析、および/またはRT-PCRを使用することによって、生成され得る。1つの実施形態において、313、333、5464、18817、もしくは33524遺伝子配列は、このような遺伝子発現プロファイルの作製および裏付けのためのプローブおよび/またはPCRプライマーとして使用され得る。

20

【0054】

遺伝子発現プロファイルは、細胞および/または動物ベースのモデル系における、既知の状態(心臓血管疾患または正常のいずれか)について特徴付けられ得る。その後、これらの既知の遺伝子発現プロファイルは、効果を確認するために比較され得、試験化合物は、このような遺伝子発現プロファイルを改変する必要がある、そしてそのプロファイルがより望ましいプロファイルの化合物とより緊密に類似させる必要がある。

30

【0055】

例えば、化合物の投与は、泌尿器系障害疾患モデル系の遺伝子発現プロファイルを、コントロール系とより緊密に類似させ得る。あるいは、化合物の投与は、コントロール系の遺伝子発現プロファイルに、泌尿器系障害または泌尿器系障害疾患状態を模倣させ得る。このような化合物は、例えば、目的の化合物のさらなる特徴付けにおいて使用され得るか、または、さらなる動物モデルの作製において使用され得る。

【0056】

(II. 細胞ベースおよび動物ベースのモデル系)

泌尿器系障害のためのモデルとしての役割を果たす、細胞ベースおよび動物ベースの系が、本明細書中に記載される。これらの系は、種々の適用において使用され得る。例えば、細胞ベースおよび動物ベースのモデル系を使用して、泌尿器系障害に関連する、差次的に発現される遺伝子(例えば、313、333、5464、18817または33524)をさらに特徴付けし得る。さらに動物ベースおよび細胞ベースのアッセイは、以下に記載されるような泌尿器系障害の少なくとも1つの症状を回復させ得る化合物を同定するように設計された、スクリーニングストラテジーの一部として使用され得る。従って、動物ベースおよび細胞ベースのモデルを使用して、泌尿器系障害を処置する際に有効であり得る薬物、医薬品、治療およびインターベンションを同定し得る。さらに、このような動物モデルを使用して、哺乳動物被験体におけるLD50およびED50を決定し得、そしてこのようなデータを使用して、潜在的な泌尿器系障害処置のインビボでの効力を決定し得る。

40

50

【 0 0 5 7 】

(A . 動物ベースの系)

泌尿器系障害の動物ベースのモデル系としては、非組換え動物および操作されたトランスジェニック動物が挙げられ得るがこれらに限定されない。

【 0 0 5 8 】

泌尿器系障害のための非組換え動物モデルとしては、例えば、ゲノムモデルが挙げられ得る。

【 0 0 5 9 】

さらに、泌尿器系障害を示す動物モデルは、例えば、当業者に周知であるトランスジェニック動物を作製するための技術とともに、上記の 3 1 3 遺伝子配列、3 3 3 遺伝子配列、5 4 6 4 遺伝子配列、1 8 8 1 7 遺伝子配列または 3 3 5 2 4 遺伝子配列を使用することによって、操作され得る。例えば、3 1 3 遺伝子配列、3 3 3 遺伝子配列、5 4 6 4 遺伝子配列、1 8 8 1 7 遺伝子配列または 3 3 5 2 4 遺伝子配列は、目的の動物のゲノムに導入され得、そしてこの目的の動物のゲノムにおいて過剰発現され得るか、あるいは内因性の 3 1 3 遺伝子配列、3 3 3 遺伝子配列、5 4 6 4 遺伝子配列、1 8 8 1 7 遺伝子配列または 3 3 5 2 4 遺伝子配列が存在する場合、これらは、過剰発現され得るか、またはあるいは、3 1 3 遺伝子発現、3 3 3 遺伝子発現、5 4 6 4 遺伝子発現、1 8 8 1 7 遺伝子発現または 3 3 5 2 4 遺伝子発現を過少発現させるかまたはこれらの遺伝子発現を不活化させるために破壊され得るかのいずれかであり得る。

【 0 0 6 0 】

本発明の宿主細胞をまた使用して、非ヒトトランスジェニック動物を作製し得る。例えば、1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、受精卵または胚性幹細胞であり、この細胞に、3 1 3 コード配列、3 3 3 コード配列、5 4 6 4 コード配列、1 8 8 1 7 コード配列または 3 3 5 2 4 コード配列が導入される。次いで、このような宿主細胞を使用して、非ヒトトランスジェニック動物を作製し得、ここにおいて、外因性の 3 1 3 配列、3 3 3 配列、5 4 6 4 配列、1 8 8 1 7 配列または 3 3 5 2 4 配列が、それらのゲノムまたは相同な組換え動物に導入され、ここで、内因性の 3 1 3 配列、3 3 3 配列、5 4 6 4 配列、1 8 8 1 7 配列または 3 3 5 2 4 配列が、変更される。このような動物は、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または 3 3 5 2 4 の機能および/または活性を研究するため、ならびに 3 1 3 活性、3 3 3 活性、5 4 6 4 活性、1 8 8 1 7 活性または 3 3 5 2 4 活性のモジュレーターを同定および/または評価するために、有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」は、非ヒト動物であり、好ましくは、哺乳動物であり、より好ましくは、ラットまたはマウスのようなげっ歯類であり、ここで、これらの動物の1つ以上の細胞が、導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。導入遺伝子は、外因性 DNA であり、この外因性 DNA は、トランスジェニック動物が成長する細胞のゲノムに取り込まれ、かつ成熟動物のゲノムにおいて維持され、それによってこのトランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織における、コードされた遺伝子産物の発現を指向する。本明細書中で使用される場合、「相同な組換え動物」は、非ヒト動物であり、好ましくは、哺乳動物であり、より好ましくは、マウスであり、ここで、内因性の 3 1 3 遺伝子、3 3 3 遺伝子、5 4 6 4 遺伝子、1 8 8 1 7 遺伝子または 3 3 5 2 4 遺伝子は、この内因性遺伝子と、動物の成長前にこの動物の細胞(例えば、動物の胚細胞)に導入される外因性 DNA 分子との間の相同組換えによって変更される。

【 0 0 6 1 】

本発明の方法において使用されるトランスジェニック動物は、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または 3 3 5 2 4 のコード核酸を、受精卵の雄前核に、例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって導入し、そして卵母細胞を偽妊娠雌養母動物において成長させることによって作製され得る。3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または 3 3 5 2 4 の cDNA 配列は、導入遺伝子として、非ヒト動物のゲノムに導入され得る。あるいは、ヒトの 3 1 3 遺伝子、3 3 3 遺伝子、5 4 6 4 遺伝子、1 8 8 1 7 遺

10

20

30

40

50

伝子または33524 遺伝子の非ヒトホモログ（例えば、マウスまたはラットの313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子）が、導入遺伝子として使用され得る。あるいは、313、333、5464、18817 または33524 の遺伝子ホモログ（例えば、別の313、333、5464、18817 または33524 のファミリーメンバー）は、313、333、5464、18817 または33524 のcDNA 配列へのハイブリダイゼーションに基づいて単離され得、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた、導入遺伝子の発現の効力を増加させるように、この導入遺伝子に含まれ得る。組織特異的調節配列は、313、333、5464、18817 または33524 の導入遺伝子に作動可能に連結されて、313 タンパク質、333 タンパク質、5464 タンパク質、18817 タンパク質または33524 タンパク質の発現を特定の細胞に指向し得る。胚操作およびマイクロインジェクションを介して、トランスジェニック動物（特に、マウスのような動物）を作製するための方法は、当該分野において慣習的であり、例えば、以下に記載されている：米国特許第4,736,866号および同第4,870,009号（両方が、Lederらによる）、米国特許第4,873,191号（Wagnerらによる）、ならびにHogan, B., Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)。類似の方法が、他のトランスジェニック動物の作製のために使用され得る。トランスジェニックファウンダー (founder) 動物は、そのゲノムにおける313、333、5464、18817 または33524 の導入遺伝子の存在、および/あるいは動物の組織または細胞における313、333、5464、18817 または33524 のmRNAの発現に基づいて、同定され得る。次いで、トランスジェニックファウンダー動物を使用して、導入遺伝子を保有するさらなる動物を産出し得る。さらに、313 タンパク質、333 タンパク質、5464 タンパク質、18817 タンパク質または33524 タンパク質をコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物はさらに、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物を産出し得る。

10

20

【0062】

相同な組換え動物を作製するために、313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子の少なくとも一部を含むベクターが調製され、このベクターに、欠失、付加または置換が導入されて、それによって、313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子に変更される（例えば、機能的に破壊される）。この313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子は、ヒト遺伝子であり得るが、より好ましくは、ヒトの313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子の非ヒトホモログである。例えば、ラットの313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子を使用して、マウスゲノムにおいて内因性の313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子を変更するのに適切な、相同な組換え核酸分子（例えば、ベクター）を構築し得る。好ましい実施形態において、相同な組換え核酸分子は、相同組換えの際に、内因性の313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子が機能的に破壊される（すなわち、もはや機能的タンパク質をコードしない；「ノックアウト」ベクターとも呼ばれる）ように、設計される。あるいは、相同な組換え核酸分子は、相同組換えの際に、内因性の313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子が発現されるか、さもなければ変更されるが依然として機能的タンパク質をコードする（例えば、上流の調節領域が変更され、それによって内因性の313 タンパク質、333 タンパク質、5464 タンパク質、18817 タンパク質または33524 タンパク質の発現を変更し得る）ように、設計され得る。相同な組換え核酸分子において、313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子の変更された部分は、313 遺伝子、333 遺伝子、5464

30

40

50

遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子のさらなる核酸配列によって、その5'末端および3'末端に隣接し、相同な組換え核酸分子によって保有される外因性の313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子と、細胞（例えば、胚性幹細胞）における内因性313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子との間に、相同組換えが生じることを可能にする。さらなる隣接の313、333、5464、18817または33524の核酸配列は、内因性遺伝子との首尾よい相同組換えに十分な長さの核酸配列である。代表的には、隣接したDNA（5'末端と3'末端との両方）の数キロベースが、この相同組換え核酸分子に含まれる（例えば、相同組換えベクターの記載については、Thomas, K. R. および Capecechi, M. R. (1987) Cell 51: 503を参照のこと）。相同組換え核酸分子は、細胞（例えば、胚性幹細胞株）に（例えば、エレクトロポーションによって）導入され、そして導入された313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子が内因性の313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子と相同に組み換わる細胞が、選択される（例えば、Li, E. ら (1992) Cell 69: 915を参照のこと）。次いで、この選択された細胞は、動物（例えば、マウス）の胚盤胞に注射され、凝集キメラを形成し得る。（例えば、Bradley, A. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編 (IRL, Oxford, 1987) 113-152頁）を参照のこと）。次いで、キメラ胚は、適切な偽妊娠雌養母動物に移植され得、そしてこの胚は、生殖（term）され得る。生殖細胞において相同組換えされたDNAを含む子孫を使用して、動物を繁殖させ得、ここにおいて、この動物の全ての細胞は、導入遺伝子の生殖系列伝達によって相同組換えされたDNAを含む。相同な組換え核酸分子（例えば、ベクター）または相同な組換え動物を構築するための方法は、以下にさらに記載される：Bradley, A. (1991) Current Opinion in Biotechnology 2: 823-829、およびLe Mouellecらによる、PCT国際公開番号WO 90/11354；Smithiesらによる、WO 91/01140；Zijlstraらによる、WO 92/0968；およびBernsらによる、WO 93/04169。

【0063】

別の実施形態において、本発明の方法において使用するためのトランスジェニック非ヒト動物が作製され得、この系は、導入遺伝子の調節された発現を可能にする、選択された系を含む。このような系の1つの例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。cre/loxPリコンビナーゼ系の記載については、例えば、Laksosら (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Saccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系である（O'Gormanら (1991) Science 251: 1351-1355）。cre/loxPリコンビナーゼ系を使用して導入遺伝子の発現を調節する場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が、必要とされる。このような動物は、「二重」トランスジェニック動物の構築によって（例えば、2種のトランスジェニック動物（一方は、選択されたタンパク質をコードするトランスジーンを含み、他方は、リコンビナーゼをコードするトランスジーンを含む）を交配させることによって）提供され得る。

【0064】

本明細書中に記載される非ヒトトランスジェニック動物のクローンはまた、以下に記載される方法に従って作製され得る：Wilmut, I. ら (1997) Nature 385: 810-813およびPCT国際公開番号WO 97/07668およびWO 97/07669。簡潔には、トランスジェニック動物由来の細胞（例えば、体細胞）が単離され得、そして増殖周期を出てG₀期に入るように誘導され得る。次いで、休止細胞は、

例えば、電気パルスの使用を介して、この休止細胞が単離される同じ種の動物由来の除核された卵母細胞に融合され得る。次いで、この再構築された卵母細胞は、桑実胚または未分化胚芽細胞が成長するように培養され、次いで、偽妊娠雌養母動物に移される。この雌養母動物の子孫は、細胞（例えば、体細胞）が単離される動物のクローンである。

【0065】

次いで、容易に検出可能なレベルの313、333、5464、18817または33524のmRNAあるいは313、333、5464、18817または33524のペプチド（313、333、5464、18817または33524のエピトープに対する抗体を使用して、免疫細胞化学的に検出される）を発現する、313、333、5464、18817または33524のトランスジェニック動物は、特徴的な泌尿器系障害を表示する動物を同定するために、さらに評価されるべきである。

【0066】

（B．細胞ベースの系）

313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質をコードする、313遺伝子配列、333遺伝子配列、5464遺伝子配列、18817遺伝子配列または33524の遺伝子配列を含み、かつこれらを発現し、そしてさらにBPHおよび/またはUIに関連する細胞表現型を示す細胞を使用して、泌尿器系障害に対する効果を示す化合物を同定し得る。このような細胞としては、以下が挙げられ得る：非組換え単球細胞株（例えば、U937（ATCC番号CRL-1593）、THP-1（ATCC番号TIB-202）、およびP388D1（ATCC番号TIB-63））；内皮細胞（例えば、ヒト臍静脈内皮細胞（HUEC）、ヒト微小血管内皮細胞（HMVEC）、およびウシ大動脈内皮細胞（BAEC））；ならびに、一般的な哺乳動物細胞株（例えば、HeLa細胞およびCOS細胞（例えば、COS-7（ATCC番号CRL-1651）、前立腺細胞株および膀胱細胞株））。さらに、このような細胞としては、組換え細胞株、トランスジェニック細胞株が挙げられ得る。例えば、上で議論される、本発明の泌尿器系障害の動物モデルを使用して、この障害に対する細胞培養モデルとして使用され得る細胞株（これは、BPHおよび/またはUIに關与する1種以上の細胞型を含有する）を作製し得る。本発明の泌尿器系障害モデルのトランスジェニック動物由来の一次培養物が利用され得るが、連続した細胞株の作製が、好ましい。トランスジェニック動物から連続した細胞株を誘導するために使用され得る技術の例については、Smallら（1985）Mol. Cell Biol. 5: 642-648を参照のこと。

【0067】

あるいは、BPHおよび/またはUIに關与することが知られている細胞型の細胞は、細胞内での313遺伝子発現、333遺伝子発現、5464遺伝子発現、18817遺伝子発現または33524遺伝子発現の量を増加または低下させ得る配列でトランスフェクトされ得る。例えば、313遺伝子配列、333遺伝子配列、5464遺伝子配列、18817遺伝子配列または33524遺伝子配列は、目的の細胞のゲノムに導入され得、そしてこの目的の動物のゲノムにおいて過剰発現され得るか、あるいは内因性の313遺伝子配列、333遺伝子配列、5464遺伝子配列、18817遺伝子配列または33524遺伝子配列が存在する場合、これらは、過剰発現され得るか、またはあるいは、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子を過少発現させるかまたはこれらの遺伝子発現を不活化させるために破壊され得るかのいずれかであり得る。

【0068】

313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子を過剰発現させるために、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子のコード部分は、目的の細胞型（例えば、内皮細胞）において遺伝子発現を駆動し得る調節配列に連結され得る。このような調節領域は、当業者に周知であり、そして過度な実験を行うことなく利用され得る。標的遺伝子が発現させるた

めの組換え方法は、上に記載されている。

【0069】

内因性の313、333、5464、18817または33524の遺伝子配列の過少発現のために、このような配列は、単離され得、そして目的の細胞型のゲノムに再導入された場合、内因性の313、333、5464、18817または33524の対立遺伝子が不活化されるように、操作され得る。好ましくは、この操作された313、333、5464、18817または33524の配列は、遺伝子ターゲティングを介して導入され、その結果、内因性の313、333、5464、18817または33524の配列は、操作された313、333、5464、18817または33524の配列を、細胞のゲノムに組み込む際に破壊される。313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子を用いた、宿主細胞のトランスフェクションは、上に記載されている。

10

【0070】

化合物で処置されたかあるいは313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子を用いてトランスフェクトされた細胞は、BPHおよび/またはUIに関連する表現型について試験され得る。

【0071】

313、333、5464、18817または33524の核酸のトランスフェクションは、標準的な技術（例えば、Ausubel（1989）前出、に記載される）を使用することによって、達成され得る。トランスフェクトされた細胞は、313、333、5464、18817または33524の組換え遺伝子配列の存在について、313、333、5464、18817または33524のmRNAの発現および蓄積について、ならびに313、333、5464、18817または33524の組換えタンパク質産物の存在について、評価されるべきである。313、333、5464、18817または33524の遺伝子発現の減少が望ましい例において、標準的な技術を使用して、内因性の313、333、5464、18817または33524の遺伝子発現および/あるいは313、333、5464、18817または33524のタンパク質産生の低下が達成されるか否かを、実証し得る。

20

【0072】

（III．予測医学）

本発明はまた、予測医学の分野に関し、ここにおいて、診断アッセイ、予後アッセイ、モニタリング臨床試験が、診断（予測）目的のために使用され、それによって個体を予防的に処置する。従って、本発明の1つの局面は、生物学的サンプル（例えば、血液、血清、細胞（例えば、内皮細胞）、または組織（例えば、血管組織、膀胱組織または前立腺組織））の状況において、313、333、5464、18817または33524のタンパク質および/または核酸の発現、ならびに313、333、5464、18817または33524の活性を決定し、それによって、個体が、泌尿器系障害の素因に罹患しているかまたは泌尿器系障害を被っているか否かを決定するための診断アッセイに関する。本発明はまた、個体が泌尿器系障害を発病する危険性があるか否かを決定するための、診断（または予測）アッセイを提供する。例えば、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子における変異が、生物学的サンプルにおいてアッセイされ得る。このようなアッセイは、診断目的または予測目的のために使用され得、それによって個体は、泌尿器系障害の発症前に、予防的に（*prophylactically*）処置される。

30

40

【0073】

本発明の別の局面は、臨床試験における、313、333、5464、18817または33524の発現または活性に対する、313、333、5464、18817または33524のモジュレーター（例えば、抗313抗体、抗333抗体、抗5464抗体、抗18817抗体または抗33524抗体、あるいは313、333、5464、18817または33524のリボザイム）の影響のモニタリングに関する。

50

【0074】

これらの因子および他の因子は、以下の節で、さらに詳細に記載される。

【0075】

(A. 診断アッセイ)

被験体が疾患に罹患しているか否かを決定するために、生物学的サンプルが被験体から得られ得、そしてこの生物学的サンプルは、この生物学的サンプル中で、313、333、5464、18817または33524のタンパク質、あるいは313、333、5464、18817または33524のタンパク質をコードする核酸(例えば、mRNAまたはゲノムDNA)を検出することができる、化合物または因子と接触され得る。313、333、5464、18817または33524のmRNAまたはゲノムDNAを検出するために好ましい因子は、標識核酸プローブであり、このプローブは、313、333、5464、18817または33524のmRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズし得る。この核酸プローブは、例えば、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10もしくは配列番号13に示される313、333、5464、18817または33524の核酸またはそれらの一部(例えば、少なくとも15ヌクレオチド長、20ヌクレオチド長、25ヌクレオチド長、30ヌクレオチド長、25ヌクレオチド長、40ヌクレオチド長、45ヌクレオチド長、50ヌクレオチド長、100ヌクレオチド長、250ヌクレオチド長または500ヌクレオチド長であり、かつストリンジентな条件下で、313、333、5464、18817または33524のmRNAまたはゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするに十分であるオリゴヌクレオチド)であり得る。本発明の診断アッセイにおいて使用するのに適切な他のプローブが、本明細書中に記載されている。

10

20

【0076】

サンプル中で、313、333、5464、18817または33524のタンパク質を検出するのに好ましい因子は、313、333、5464、18817または33524のタンパク質に結合し得る抗体であり、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナル抗体であり得、より好ましくは、モノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体、またはそのフラグメント(例えば、FabまたはF(ab')₂)が、使用され得る。プローブまたは抗体に関して、用語「標識(された)」は、検出可能な物質をそのプローブまたは抗体にカップリング(すなわち、物理的に連結する)し、そして直接的に標識される別の試薬との反応性によってこのプローブまたは抗体を間接的に標識することによる、プローブまたは抗体の直接的な標識を含むことが意図される。間接的な標識の例は、蛍光標識された二次抗体を使用し、そして蛍光標識されたストレプトアビジンで検出され得るように、ビオチンでDNAプローブを末端標識する、一次抗体の検出を含む。

30

【0077】

用語「生物学的サンプル」は、被験体から単離された組織、細胞、および生物学的流体、ならびに被験体内に存在する組織、細胞、および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を使用して、インビトロおよびインビボで、生物学的サンプル中の313、333、5464、18817または33524のmRNA、タンパク質、またはゲノムDNAを検出し得る。例えば、313、333、5464、18817または33524のmRNAを検出するためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。313、333、5464、18817または33524のタンパク質を検出するためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫ソルベント検定法(ELISA)、ウエスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光検査法が挙げられる。313、333、5464、18817または33524のゲノムDNAを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、313、333、5464、18817または33524のタンパク質を検出するためのインビボ技術は、被験体に、標識された抗313抗体、抗333抗体、抗5464抗体、抗18817抗体または抗33524抗体を導入することを含む。例えば、抗体は、被験体における存在および位置が、標準的な画像化技術によっ

40

50

て検出され得る放射標識マーカで、標識され得る。

【0078】

別の実施形態において、本発明はさらに、以下の工程を包含する：コントロール被験体から、コントロールの生物学的サンプルを得る工程；このコントロールサンプルを、313、333、5464、18817または33524のタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAを検出することができる化合物または因子と接触させる工程であって、その結果、313、333、5464、18817または33524のタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在が、生物学的サンプル中で検出される、工程；ならびに、コントロールサンプルにおける313、333、5464、18817または33524のタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在を、試験サンプルにおける313、333、5464、18817または33524のタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在と比較する工程。

10

【0079】

(B. 予後アッセイ)

本発明はさらに、異常な313、333、5464、18817または33524の発現または活性に関連する疾患を有するかまたはそのような疾患を発症する危険性のある被験体を同定するための方法に関する。

【0080】

本明細書中で使用される場合、用語「異常な」は、野生型の313、333、5464、18817または33524の発現または活性から逸脱した、313、333、5464、18817または33524の発現または活性を含む。異常な発現または活性は、発現または活性の増加または減少、ならびに野生型の発現のパターンまたは亜細胞の発現パターンに従わない、発現または活性を含む。例えば、異常な313、333、5464、18817または33524の発現または活性は、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子における変異により、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子が、過少発現または過剰発現される場合、ならびにこのような変異によって、非機能的な313、333、5464、18817または33524のタンパク質または野生型様式で機能しないタンパク質（例えば、313、333、5464、18817または33524の基質と相互作用しないタンパク質、または非313基質、非333基質、非5464基質、非18817基質または非33524基質と相互作用するタンパク質）が生じる状況、を含むことが意図される。

20

30

【0081】

本明細書中に記載されるアッセイ（例えば、前述の診断アッセイまたは以下のアッセイ）を使用して、疾患を有する被験体または疾患が発症する危険性のある被験体を同定し得る。生物学的サンプルを、被験体より取得し得、そして遺伝的変更の存在または非存在について試験し得る。例えば、このような遺伝的変更は、以下の少なくとも1つの存在を確認することにより検出され得る：1) 313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子由来の1つ以上のヌクレオチドの検出、2) 313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加、3) 313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、4) 313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子の染色体再構築、5) 313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルにおける変更、6) ゲノムDNAのメチル化パターンのような、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子の異常な改変、7) 313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の非野生型レベ

40

50

ル、9) 313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子対立遺伝子喪失、および10) 313 タンパク質、333 タンパク質、5464 タンパク質、18817 タンパク質または33524 タンパク質の不適切な翻訳後修飾。

【0082】

本明細書中で記載されるように、313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子における遺伝的変異を検出するために使用され得る当該分野において公知の多くのアッセイが、存在する。例えば、313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子における遺伝的変異は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (例えば、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号を参照のこと) (例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR) あるいは、ライゲーション連鎖反応 (LCR) (例えば、Landegranら (1988) *Science* 241:1077-1080; およびNakazawaら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364を参照のこと) においてプローブ/プライマーを使用して検出され得、これらのうちの後者は、313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る (Abravayaら (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675-682を参照のこと)。この方法は、被験体から生物学的サンプルを収集する工程、このサンプルから核酸 (例えば、ゲノムDNA、mRNAまたはこれらの両方) を単離する工程、(存在するならば) 313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で、この核酸サンプルを、313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと接触させる工程; ならびに増幅産物の存在または非存在を検出するかまたは増幅産物のサイズを検出しそしてコントロールサンプルと長さを比較する工程。PCRおよび/またはLCRが、本明細書中に記載される変異を検出するために使用される任意の技術と組合わせて予備的増幅工程として使用するに好ましくあり得ることは、明白である。

【0083】

代替の増幅法としては以下が挙げられる: 持続的配列増幅 (Guatelli, J. C. ら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878)、転写増幅系 (Kwoh, D. Y. ら (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177)、Q-レプリカーゼ (Lizardi, P. M. ら (1988) *Bio-Technology* 6:1197)、または他の核酸増幅法のいずれか、その後の当業者に周知の技術を使用する増幅分子の検出。これらの検出スキームは、このような分子が非常に少数で存在する場合に、核酸分子の検出に特に有用である。

【0084】

代替の実施形態において、生物学的サンプル由来の313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子における変異は、制限酵素切断パターンにおける変更によって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールDNAが、単離され、(必要に応じて) 増幅され、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化され、そしてフラグメント長サイズが、ゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルとコントロールDNAとの間のフラグメント長サイズの差異は、サンプルDNA中の変異を示す。さらに、配列特異的リボザイム (例えば、米国特許第5,498,531号) の使用は、リボザイム切断部位の発生または喪失によって、特異的変異の存在についてスコア付けられ得る。

【0085】

他の実施形態において、313、333、5464、18817または33524における遺伝的変異は、生物学的サンプル由来の核酸およびコントロール核酸 (例えば、DNA

10

20

30

40

50

またはRNA)を、何百個または何千個のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイにハイブリダイズさせることによって同定され得る(Cronin, M. T.ら(1996) Human Mutation 7:244-255; Kozal, M. J.ら(1996) Nature Medicine 2:753-759)。例えば、313、333、5464、18817または33524における遺伝的変異は、Cronin, M. T.ら(1996)(上述)に記載されるような光生成DNAプローブを含む2次元アレイにおいて同定され得る。簡単には、プローブの第1のハイブリダイゼーションアレイを使用して、連続的で重複するプローブの線状アレイを作製することによって、サンプルおよびコントロールにおけるDNAの長鎖を通して走査して配列間の塩基変化を同定し得る。この工程は、点変異の同定を可能とする。この工程の後、検出される全ての改変体または変異に相補的なより小さな特定化されたプローブアレイを使用することによって、特異的変異の特徴付けを可能にする第2のハイブリダイゼーションアレイが続く。各変異アレイは、パラレルプローブセット、野生型遺伝子に対するある相補体および変異遺伝子に対する他の相補体から構成される。

10

【0086】

なお別の実施形態において、当該分野において公知の種々の配列決定反応のいずれかを使用して、生物学的サンプル中の313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子を直接的に配列決定し得、そして生物学的サンプル中の313、333、5464、18817または33524の配列を、対応する野生型(コントロール)配列と比較することによって変異を検出し得る。配列決定反応の例としては、MaxamおよびGilbert(1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560またはSanger(1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463によって開発された技術に基く反応が挙げられる。種々の自動化配列決定手順が、質量分析法による配列決定(例えば、PCT国際公開番号WO94/16101; Cohenら(1996) Adv. Chromatogr. 36:127-162; およびGriffinら(1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38:147-159を参照のこと)を含む診断アッセイ(Naeve, C. W. (1995) Biotechniques 19:448-53)を行う場合に利用され得ることもまた、企図される。

20

【0087】

313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、切断剤からの保護がRNA/RNA異種二重鎖またはRNA/DNA異種二重鎖中でミスマッチした塩基を検出するために使用される方法が挙げられる(Myersら(1985) Science 230:1242)。一般に、「ミスマッチ切断」の分野の技術は、野生型313配列、333配列、5464配列、18817配列または33524配列を含む(標識された)RNAまたはDNAを、組織サンプルより得られた潜在的変異RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成される異種二重鎖を提供することによって開始する。二本鎖二重鎖は、コントロール鎖とサンプル鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するような二本鎖の一本鎖領域を切断する因子で処理される。例えば、ミスマッチ領域を酵素的に消化するために、RNA/DNA二重鎖はRNaseで処理され得、DNA/DNAハイブリッドはS1ヌクレアーゼで処理され得る。他の実施形態において、DNA/DNA二重鎖またはRNA/DNA二本鎖のいずれかが、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムで処理され、そして、ミスマッチ領域を消化するためにピペリジンで処理される。ミスマッチ領域の消化後、次いで、生じた物質が、変異部位を決定するために変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズで分けられる。例えば、Cottonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397およびSaleebaら(1992) Methods Enzymol. 217:286-295を参照のこと。好ましい実施形態において、コントロールDNAまたはRNAが、検出のために標識され得る。

30

40

【0088】

50

さらに別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、細胞のサンプルより得られた 3 1 3 cDNA、3 3 3 cDNA、5 4 6 4 cDNA、1 8 8 1 7 cDNA または 3 3 5 2 4 cDNA 中の点変異を検出およびマッピングするために規定された系において二本鎖 DNA 中のミスマッチ塩基対を認識する 1 つ以上のタンパク質（「DNA ミスマッチ修復」酵素と呼ばれる）を使用する。例えば、E. coli の mutY 酵素は、G/A ミスマッチで A を切断し、そして HeLa 細胞由来のチミジン DNA グリコシラーゼは、G/T ミスマッチで T を切断する（Hsu ら（1994）Carcinogenesis 15 : 1657 - 1662）。例示的实施形態に従って、3 1 3 配列、3 3 3 配列、5 4 6 4 配列、1 8 8 1 7 配列または 3 3 5 2 4 配列（例えば、野生型の 3 1 3 配列、3 3 3 配列、5 4 6 4 配列、1 8 8 1 7 配列または 3 3 5 2 4 配列）に基づくプローブは、試験細胞からの cDNA 産物または他の DNA 産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、DNA ミスマッチ修復酵素で処理され、そして存在する場合、切断産物は、電気泳動的プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第 5, 459, 039 号を参照のこと。

10

【0089】

他の実施形態において、電気泳動的移動度の変更を使用して、3 1 3 遺伝子、3 3 3 遺伝子、5 4 6 4 遺伝子、1 8 8 1 7 遺伝子または 3 3 5 2 4 遺伝子における変異を同定する。例えば、一本鎖コンフォーメーション多型（SSCP）を使用して、変異体核酸と野生型核酸との間の電気泳動的移動度の差異を検出し得る（Orिताら（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA : 86 : 2766 ; Cotton（1993）Mutat. Res. 285 : 125 - 144 および Hayashi（1992）Genet. Anal. Tech. Appl. 9 : 73 - 79 もまた参照のこと）。サンプルおよびコントロールの 3 1 3 核酸、3 3 3 核酸、5 4 6 4 核酸、1 8 8 1 7 核酸または 3 3 5 2 4 核酸の一本鎖 DNA フラグメントは変性され、そして再生される。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変化し、電気泳動的移動度において生じた変更は、単一の塩基変化の検出さえ可能にする。DNA フラグメントは、標識されたプローブで標識されても検出されてもよい。このアッセイの感度は、（DNA ではなく）RNA を用いることにより増強され、ここで二次構造は、配列の変化により感受性である。好ましい実施形態において、目的の方法は、電気泳動的移動度の変化に基いて二本鎖ヘテロ二重鎖分子を分離するためにヘテロ二重鎖分析を利用する（Keenら（1991）Trends Genet 7 : 5）。

20

30

【0090】

なお別の実施形態において、変性剤の勾配を含有するポリアクリルアミドゲル中での変異体フラグメントまたは野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動（DGGE）（Myersら（1985）Nature 313 : 495）を使用してアッセイされる。DGGE が分析法として使用される場合、DNA は、例えば、PCR によって約 40 bp の高温融解 GC リッチ DNA の GC クランプを付加することにより完全には変性していないことを確認するために改変される。さらなる実施形態において、温度勾配は、コントロール DNA およびサンプル DNA の移動度の差異を同定するための変性勾配の代わりに使用される（Rosenbaum および Reissner（1987）Biophys Chem 265 : 12753）。

40

【0091】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーが調製され得、ここで、公知の変異が中心におかれ、次いで、完全な一致が見出される場合にのみハイブリダイゼーションを可能にする条件下で標的 DNA にハイブリダイズする（Saikiら（1986）Nature 324 : 163）；Saikiら（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 6230）。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に結合しそして標識標的 DNA とハイブリダイズする場合に、PCR 増幅標的 DNA または多くの種々の変異にハイブリダイズされ

50

る。

【0092】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と組合わせて使用され得る。増幅に特異的なプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心に目的の変異を保有し得るか（その結果、増幅は、差示的ハイブリダイゼーションに依存する）（Gibbsら（1989）Nucleic Acids Res. 17: 2437-2448）、または適切な条件下で、ミスマッチが、防がれ得るかまたはポリメラーゼ伸長を低減され得る場合、一方のプライマーの3'末端で目的の変異を保有し得る（Prossner（1993）Tibtech 11: 238）。さらに、切断ベース検出を作製するために、変異領域中に新規の制限部位を導入することが、好ましくあり得る（Gaspariniら（1992）Mol. Cell Probes 6: 1）。特定の実施形態において、増幅のためにTaqリガーゼを使用して増幅が行われ得ることもまた、明らかである（Barany（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189）。このような場合に、連結は、5'配列の3'末端で完全なミスマッチが存在する場合にのみ生じ、これにより、増幅の存在または非存在を探索することによって特定の部位で既知の変異の存在を検出し得る。

10

20

30

40

50

【0093】

さらに、本明細書中に記載される診断アッセイを使用して、疾患を効果的に処置するために、被験体が313モジュレーター、333モジュレーター、5464モジュレーター、18817モジュレーターまたは33524モジュレーター（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸または低分子）を投与され得るか否かを、決定し得る。

【0094】

（C. 臨床試験の間の効果のモニタリング）

本発明はさらに、313モジュレーター、333モジュレーター、5464モジュレーター、18817モジュレーターまたは33524モジュレーター（例えば、本明細書中に同定された313モジュレーター、333モジュレーター、5464モジュレーター、18817モジュレーターまたは33524モジュレーター）の、疾患の処置に対する有効性を決定するための方法を提供する。例えば、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子の発現増加、タンパク質レベル増加、あるいは313活性、333活性、5464活性、18817活性または33524活性のアプレギュレートにおいて、313モジュレーター、333モジュレーター、5464モジュレーター、18817モジュレーターまたは33524モジュレーターは、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子の発現減少、タンパク質レベル減少、あるいは313活性、333活性、5464活性、18817活性または33524活性のダウンレギュレートを示す被験体の臨床試験においてモニタリングされ得る。あるいは、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子の発現減少、タンパク質レベル減少、あるいは313活性、333活性、5464活性、18817活性または33524活性のダウンレギュレートにおける313モジュレーター、333モジュレーター、5464モジュレーター、18817モジュレーターまたは33524モジュレーターの有効性は、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子の発現増加、タンパク質レベル増加、あるいは313活性、333活性、5464活性、18817活性または33524活性の増加を示す被験体の臨床試験においてモニタリングされ得る。このような臨床試験において、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子、好ましくは、痛覚に参与する任意の遺伝子の発現または活性が、「読み出し」すなわち特定の細胞の表現型のマーカーとして使用され得る。

【0095】

例えば（限定のためではなく）、（例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニン

グアッセイにおいて同定される) 3 1 3 活性、3 3 3 活性、5 4 6 4 活性、1 8 8 1 7 活性または3 3 5 2 4 活性を調節する因子での処置によって細胞において調節される、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または3 3 5 2 4 を含む遺伝子が、同定され得る。よって、泌尿器系障害を罹患する被験体に対する3 1 3 活性、3 3 3 活性、5 4 6 4 活性、1 8 8 1 7 活性または3 3 5 2 4 活性を調節する因子の効果(例えば、臨床試験において)研究するために、細胞が単離され得、そしてRNAが調製され得、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または3 3 5 2 4、および泌尿器系障害に関連する他の遺伝子の発現レベルについて分析され得る。遺伝子発現レベル(例えば、遺伝子発現パターン)は、本明細書中に記載されるようなノザンプロット分析またはRT-PCRによって、あるいは本明細書中に記載される方法の1つによって生成されるタンパク質の量を測定することによって、または3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 もしくは3 3 5 2 4、または他の遺伝子の活性レベルを測定することによって、定量され得る。この方法において、遺伝子発現パターンは、3 1 3 活性、3 3 3 活性、5 4 6 4 活性、1 8 8 1 7 活性または3 3 5 2 4 活性を調節する因子に対する細胞の生理学的応答を示すマーカーとして働き得る。この応答状態は、個体を3 1 3 活性、3 3 3 活性、5 4 6 4 活性、1 8 8 1 7 活性または3 3 5 2 4 活性を調節する因子で処置する前、あるいはその間の種々の時点で測定され得る。

10

【0096】

好ましい実施形態において、本発明は、3 1 3 活性、3 3 3 活性、5 4 6 4 活性、1 8 8 1 7 活性または3 3 5 2 4 活性を調節する因子(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される低分子)での被験体の処置の有効性をモニタリングするための方法を提供し、以下の工程を包含する:(i)この因子の投与前に予め投与するサンプルを被験体から得る工程;(ii)この予め投与するサンプル中の3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または3 3 5 2 4 のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルを検出する工程;(iii)1つ以上の後に投与するサンプルを被験体から得る工程;(iv)これらの後に投与するサンプル中の3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または3 3 5 2 4 のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルまたは活性レベルを検出する工程;(v)予め投与するサンプル中の3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または3 3 5 2 4 のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルまたは活性レベルを、後に投与するサンプル中の3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または3 3 5 2 4 のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルまたは活性レベルと比較する工程;ならびに(vi)よって被験体に対する因子の投与を変更する工程。例えば、因子の投与増加は、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または3 3 5 2 4 の発現または活性を、検出された(すなわち、因子の有効性を増加させる)レベルよりも高いレベルに増加することが、好ましくあり得る。あるいは、因子の投与減少は、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または3 3 5 2 4 の発現または活性を、検出された(すなわち、因子の有効性を減少させる)レベルよりも低いレベルに減少することが、好ましくあり得る。この実施形態に従って、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7 または3 3 5 2 4 の発現または活性は、観察可能な表現型応答の非存在下ですら、因子の有効性の指標として使用され得る。

20

30

40

【0097】

(IV. 処置方法)

本発明は、被験体(例えば、疾患の危険性のある(または疾患を罹患しそうな)ヒト)を処置する予防法および治療法を提供する。処置の予防法および治療法の両方の観点で、このような処置は、薬理ゲノム学(pharmacogenomics)の分野から得られる知識に基づいて、特異的に仕立てられ(tailored)得るかまたは改変され得る。本明細書中で使用される場合、「薬理ゲノム学」は、遺伝子配列決定、統計的遺伝学および遺伝子発現分析のようなゲノム技術の、臨床開発および市場での薬物に対する適用をいう。より詳細には、この用語は、患者の遺伝子がどのように薬物に対する患者の応答(例え

50

ば、患者の「薬物応答表現型」または「薬物応答遺伝子型」)を決定するののかについての研究をいう。

【0098】

従って、本発明の別の局面は、個々の薬物応答遺伝子型に従って、本発明の313分子、333分子、5464分子、18817分子または33524分子、あるいは、313モジュレーター、333モジュレーター、5464モジュレーター、18817モジュレーターまたは33524モジュレーターのいずれかを用いる被験体の予防処置または治療処置を仕立てるための方法を提供する。薬理ゲノム学によって、臨床医(c l i n i c i a n)または内科医(p h y s i c i a n)は、この処置から最も利益を得る患者に対して予防処置または治療処置を標的化することが可能になり、そして毒性薬物関連副作用を被る患者の処置を避けることが可能になる。

10

【0099】

(A. 予防法)

1つの局面において、本発明は、313、333、5464、18817または33524の発現、あるいは313、333、5464、18817または33524の活性を調節する因子を被験体に投与することによって、被験体において疾患を予防するための方法を提供する。泌尿器科学(例えば、BPHおよび/またはUI)の危険性のある患者は、例えば、本明細書中に記載される診断アッセイまたは予防アッセイのいずれかまたはその組み合わせによって、同定され得る。予防薬の投与は、異常な313、333、5464、18817または33524の発現または活性に特徴的な症状の徴候の前に生じ得、その結果、疾患が、その進行において予防、または遅延される。313、333、5464、18817または33524の異常の型に依存して、例えば、313、333、5464、18817または33524、313、333、5464、18817または33524のアゴニスト剤、あるいは313、333、5464、18817または33524のアンタゴニスト剤が、被験体の処置のために使用され得る。適切な因子は、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイに基いて決定され得る。

20

【0100】

(B. 治療法)

泌尿器系障害が改善される方法および組成物が、本明細書中に記載される。特定の泌尿器系障害が、過剰なレベルの遺伝子産物によってか、または異常な活性もしくは過剰な活性を示す遺伝子産物の存在によって、少なくとも部分的にもたらされる。それ自体、このような遺伝子産物のレベルおよび/または活性の減少は、泌尿器系障害の少なくとも1つの症状の改善をもたらす。遺伝子発現レベルまたはタンパク質活性の減少のための技術は、以下に議論される。

30

【0101】

あるいは、特定の他の泌尿器系障害が、遺伝子発現レベルの非存在または減少によってかまたはタンパク質活性レベルの減少によって、少なくとも部分的にもたらされる。それ自体、このようなタンパク質の遺伝子発現および/または活性のレベルの増加は、泌尿器系障害の少なくとも1つの症状の改善をもたらす。

【0102】

いくつかの場合において、疾患状態における遺伝子のアップレギュレートは、疾患状態に対応するその遺伝子産物についての保護的役割を反映する。このような遺伝子発現の増加、または遺伝子産物の活性の増加は、それが発揮する保護的効果を強化する。いくつかの泌尿器科学の疾患状態は、このような保護的遺伝子の異常に低いレベルの活性から生じ得る。これらの場合において、遺伝子発現のレベルの増加および/またはこのような遺伝子産物の活性の増加は、泌尿器系障害の少なくとも1つの症状の改善をもたらす。標的遺伝子発現レベルまたは標的遺伝子産物活性レベルを増加するための技術は、本明細書中に議論される。

40

【0103】

従って、本発明の別の局面は、治療目的で313、333、5464、18817または

50

33524の発現または活性を調節する方法に関する。よって、例示的实施形態において、本発明の調節方法は、細胞を、313、333、5464、18817または33524、あるいは細胞（例えば、内皮細胞、卵巣細胞、膀胱細胞および前立腺細胞）に関連する313、333、5464、18817または33524のタンパク質活性の1つ以上の活性を調節する因子と接触させる工程を、包含する。313、333、5464、18817または33524のタンパク質活性を調節する因子は、本明細書中に記載されるような因子（例えば、核酸またはタンパク質、313、333、5464、18817もしくは33524のタンパク質の天然に存在する標的分子（例えば、313、333、5464、18817または33524のリガンドまたは基質）、313、333、5464、18817または33524の抗体、313、333、5464、18817または33524のアゴニストまたはアンタゴニスト、313、333、5464、18817または33524のアゴニストまたはアンタゴニストのペプチド模倣物、あるいは、他の低分子）であり得る。1つの実施形態において、この因子は、1つ以上の313、333、5464、18817または33524の活性を刺激する。このような刺激因子の例としては、活性な313、333、5464、18817または33524のタンパク質、および細胞中に導入された313、333、5464、18817または33524をコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この因子は、1つ以上の313、333、5464、18817または33524の活性を阻害する。このような阻害因子の例としては、アンチセンス313核酸分子、アンチセンス333核酸分子、アンチセンス5464核酸分子、アンチセンス18817核酸分子またはアンチセンス33524の核酸分子、抗313抗体、抗333抗体、抗5464抗体、抗18817抗体または抗33524抗体、および313、333、5464、18817または33524のインヒビターが挙げられる。これらの調節法は、（例えば、細胞を因子とともに培養することによって）インピトコで、あるいは（例えば、因子を被験体に投与することによって）インビボで行われ得る。それ自体、本発明は、313、333、5464、18817または33524のタンパク質または核酸分子の、異常な発現もしくは活性または所望されない発現もしくは活性によって特徴付けられる疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、本発明は、因子（例えば、本明細書中に記載される少なくともアッセイによって同定される因子）、あるいは313、333、5464、18817または33524の発現または活性を調節する（例えば、アップレギュレートまたはダウンする）因子の組合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、本方法は、313、333、5464、18817または33524の減少した異常な発現もしくは活性または所望されない発現もしくは活性を補う治療薬として、313、333、5464、18817または33524のタンパク質または核酸分子を投与する工程を包含する。

【0104】

313、333、5464、18817または33524の活性の刺激は、313、333、5464、18817または33524が異常にダウンレギュレートされる状況および/または313、333、5464、18817または33524の増加した活性が有益な効果を有するようである状況において望ましい。同様に、313、333、5464、18817または33524の活性の阻害は、313、333、5464、18817または33524が異常にアップレギュレートされる状況および/または313、333、5464、18817または33524の減少した活性が有益な効果を有するようである状況において望ましい。

【0105】

（（i）標的遺伝子の発現、合成、または活性を阻害するための方法）
 上で考察されるように、心臓血管障害に関連する遺伝子は、遺伝子活性の増加したレベルを介してこのような障害を引き起こし得る。いくつかの場合において、このようなアップレギュレーションは、疾患状態に対して原因となるかまたは増悪させる影響を有し得る。種々の技術が、このような遺伝子および/またはタンパク質の発現、合成、または活性を

阻害するために使用され得る。

【0106】

例えば、上記のアッセイを介して同定される化合物のような化合物（阻害性活性を示す）は、本発明に従って、泌尿器系障害の少なくとも1つの症状を軽減するために使用され得る。このような分子としては、有機低分子、ペプチド、抗体などが挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0107】

例えば、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質に対する内因性リガンドと競合する化合物が投与され得る。リガンド結合した313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の量に生じる減少は、内皮細胞生理学を調節する。この目的のために特に有用であり得る化合物は、例えば、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の可溶性タンパク質または可溶性ペプチド、1つ以上の細胞外ドメインを含むペプチド、またはその一部および/もしくはアナログ（例えば、Ig-テールド（tailed）融合タンパク質のような可溶性融合タンパク質を含む）が挙げられる（Ig-テールド融合タンパク質の産生についての考察について、例えば、米国特許第5,116,964号を参照のこと）。あるいは、313レセプター部位、333レセプター部位、5464レセプター部位、18817レセプター部位または33524レセプター部位に結合するが、タンパク質を活性化しない、リガンドアナログまたは抗体のような化合物（例えば、レセプター-リガンドアンタゴニスト）は、313タンパク質活性、333タンパク質活性、5464タンパク質活性、18817タンパク質活性または33524タンパク質活性を阻害するのに有効であり得る。

【0108】

さらに、313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子の発現を阻害するアンチセンス分子およびリボザイム分子もまた、本発明に従って、異常な313遺伝子活性、333遺伝子活性、5464遺伝子活性、18817遺伝子活性または33524遺伝子活性を阻害するために使用され得る。なおさらに、3重らせん分子は、異常な313遺伝子活性、333遺伝子活性、5464遺伝子活性、18817遺伝子活性または33524遺伝子活性を阻害する際に利用され得る。

【0109】

本発明の方法に使用されるアンチセンス核酸分子は、代表的に、被験体に投与されるかまたはインサイチュで産生され、その結果、これらは、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質をコードする細胞性mRNAおよび/またはゲノムDNAにハイブリダイズするかまたは結合して、それによって、例えば、転写および/または翻訳を阻害することによって、タンパク質の発現を阻害する。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の従来のヌクレオチド相補性によって、または、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、二重らせんの主溝における特異的な相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与の経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子を改変して、選択された細胞を標的化し、次いで、全身に投与し得る。例えば、全身投与に関して、アンチセンス分子は、例えば、細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に、アンチセンス核酸分子を連結することによって、このアンチセンス分子が、選択された細胞表面上で発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中で記載されるベクターを使用して、細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が、強力なpol I Iプロモーターまたはpol I I Iプロモーターの制御下に配置されるベクター構築物が、好ましい。

【0110】

10

20

30

40

50

なお別の実施形態において、本発明の方法に使用されるアンチセンス核酸分子は、*-アノマー*核酸分子である。*-アノマー*核酸分子は、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する。ここでは、通常の*-ユニット*とは対照的に、鎖は互いに対して平行に走る(Gaultierら(1987)Nucleic Acids Res. 15: 6625-6641)。アンチセンス核酸分子はまた、2'-*o*-メチルリボヌクレオチド(Inoueら(1987)Nucleic Acids Res. 15: 6131-6148)またはキメラRNA-DNAアナログ(Inoueら(1987)FEBS Lett. 215: 327-330)を含み得る。

【0111】

なお別の実施形態において、本発明の方法に使用されるアンチセンス核酸は、リボザイムである。リボザイムは、これらのリボザイムが相補的領域を有する、一本鎖核酸(例えば、mRNA)を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子である。従って、リボザイム(例えば、ハンマーヘッドリボザイム(HaselhoffおよびGerlach(1988)Nature 334: 585-591に記載される))は、313 mRNA転写物、333 mRNA転写物、5464 mRNA転写物、18817 mRNA転写物または33524 mRNA転写物を触媒的に切断するために使用されて、それによって、313 mRNA、333 mRNA、5464 mRNA、18817 mRNAまたは33524 mRNAの翻訳を阻害し得る。313コード核酸、333コード核酸、5464コード核酸、18817コード核酸または33524コード核酸に対して特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示される313 cDNA、333 cDNA、5464 cDNA、18817 cDNAまたは33524 cDNA(すなわち、配列番号1または配列番号3)のヌクレオチド配列に基づいて設計され得る。例えば、Tetrahyena L-19 IVS RNAの誘導体は、活性部位のヌクレオチド配列が313コードmRNA、333コードmRNA、5464コードmRNA、18817コードmRNAまたは33524コードmRNAにおいて切断されるべきヌクレオチド配列に対して相補的であるように構築され得る(例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号;およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと)。あるいは、313 mRNA、333 mRNA、5464 mRNA、18817 mRNAまたは33524 mRNAを使用して、RNA分子のプールから特異的なリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択し得る(例えば、Bartel, D.およびSzostak, J.W. (1993) Science 261: 1411-1418を参照のこと)。

【0112】

313、333、5464、18817または33524の遺伝子の発現はまた、標的細胞中で313、333、5464、18817または33524の遺伝子の転写を阻害する三重ヘリックス構造を形成するために、313、333、5464、18817または33524の調節領域(例えば、313、333、5464、18817または33524のプロモーターまたはエンハンサー)に相補的なヌクレオチド配列を標的化することによって阻害され得る(例えば、Helene, C. (1991) Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84; Helene, C. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27-36; およびMaher, L.J. (1992) Bioassays 14(12): 807-15を参照のこと)。

【0113】

313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質に特異的に結合し、かつその活性を妨害する抗体もまた、313、333、5464、18817または33524のタンパク質機能を調節または阻害するために使用され得る。このような抗体は、313、333、5464、18817または33524のタンパク質自体、あるいはこのタンパク質の部分に対応するペプチドに対して、本明細書中に記載される標準的技術を使用して作製され得る。このような抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fabフラグメント、単鎖抗体、またはキメラ抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0114】

標的遺伝子タンパク質が細胞内であり、かつ全抗体が使用される例において、内部移行 (internalizing) 抗体が好ましくあり得る。リポフェクチンリポソームは、標的エピトープを細胞に結合する Fab 領域の抗体またはフラグメントを送達するために使用され得る。抗体のフラグメントが使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに結合する最小の阻害性フラグメントが、好ましい。例えば、標的遺伝子タンパク質に結合する抗体の可変領域のドメインに対応するアミノ酸配列を有するペプチドが使用され得る。このようなペプチドは、当該分野で周知の方法を使用して、化学的に合成され得るかまたは組換え DNA 技術を介して産生され得る (例えば、Creighton (1983)、上記; および Sambrook ら、(1989) 上記に記載される)。細胞内標的遺伝子エピトープに結合する単鎖中和抗体もまた、投与され得る。このような単鎖抗体は、例えば、Marasco ら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893 に記載されるような技術を利用することにより、例えば、標的細胞集団内で単鎖抗体をコードするヌクレオチド配列を発現させることによって、投与され得る。

10

【0115】

いくつかの例において、標的遺伝子タンパク質は、細胞外であるか、または膜貫通タンパク質 (例えば、313 タンパク質、333 タンパク質、5464 タンパク質、18817 タンパク質または 33524 タンパク質) である。例えば、313 タンパク質、333 タンパク質、5464 タンパク質、18817 タンパク質または 33524 タンパク質の 1 つ以上の細胞外ドメインに特異的であり、かつその活性を妨害する抗体は、泌尿器系障害 (urological disorder) または泌尿器系障害 (urological disorder) の処置に特に有用である。このような抗体は、特に効率的である。なぜなら、これらは、血流から直接的に標的ドメインにアクセスし得るからである。ペプチド投与に適切な、以下に記載される任意の投与技術が、阻害性標的遺伝子抗体をそれらの作用部位に効率的に投与するために利用され得る。

20

【0116】

((ii) 標的遺伝子活性を再生または増大させる方法)

泌尿器系障害を生じる遺伝子は、BPH および / または UI 内で過小発現され得る。あるいは、このような遺伝子のタンパク質産物の活性は、低下され得、泌尿器系障害の発症を導く。このような遺伝子発現のダウンレギュレートまたはタンパク質活性の低下は、疾患状態に対する原因的影響または悪化させる影響を有し得る。

30

【0117】

いくつかの場合、疾患状態においてアップレギュレートされる遺伝子は、予防効果を発揮し得る。種々の技術が、泌尿器系障害に対する予防効果を発揮する、遺伝子および / またはタンパク質の発現、合成、または活性を増大させるために用いられ得る。

【0118】

この節に記載されるものは、泌尿器系障害の症状が改善されるレベルまで、313、333、5464、18817 または 33524 の活性のレベルが増大され得る方法である。313、333、5464、18817 または 33524 の活性のレベルは、例えば、313、333、5464、18817 または 33524 の遺伝子発現のレベルを増加させるか、または存在する活性な 313、333、5464、18817 または 33524 のタンパク質のレベルを増加させることのいずれかによって、増加され得る。

40

【0119】

例えば、313、333、5464、18817 または 33524 のタンパク質は、泌尿器系障害の少なくとも 1 つの症状を改善するのに十分なレベルで、このような症状を示す患者に投与され得る。以下で議論される技術のいずれかが、このような投与のために用いられ得る。当業者は、以下に記載されるような技術を利用して、313、333、5464、18817 または 33524 のタンパク質の有効な、非毒性用量の濃度を決定する方法を容易に知る。

50

【0120】

さらに、313、333、5464、18817または33524のタンパク質をコードするRNA配列は、泌尿器系障害を示す患者に、泌尿器系障害が改善される313、333、5464、18817または33524のタンパク質のレベルを生じるのに十分な濃度で、直接投与され得る。化合物の細胞内投与を達成する以下に記載される技術（例えば、リポソーム投与）のいずれかは、このようなRNA分子の投与のために用いられ得る。RNA分子は、例えば、本明細書中に記載されるような組換え技術により作製され得る。

【0121】

さらに、被験体は、遺伝子置換治療により処置され得る。313、333、5464、18817または33524の機能を有する、正常な313、333、5464、18817または33524のタンパク質の産生を指向する、313、333、5464、18817または33524の遺伝子、あるいはその部分の1以上のコピーは、DNAを細胞へと導入する他の粒子（例えば、リポソーム）に加えて、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、およびレトロウイルスベクターを含むが、これらに限定されない、ベクターを用いて細胞へと挿入され得る。さらに、上記のような技術は、ヒト細胞への、313、333、5464、18817または33524の遺伝子配列の導入のために用いられ得る。

10

【0122】

次いで、細胞、好ましくは、313、333、5464、18817または33524発現遺伝子配列を含む自系の細胞は、泌尿器系障害の少なくとも1つの症状の改善を可能にする位置で被験体へと導入または再導入され得る。このような細胞置換技術は、例えば、遺伝子産物が、分泌された、細胞外遺伝子産物である場合、好適であり得る。

20

【0123】

（C．薬学的組成物）

本発明の別の局面は、疾患に罹患した被験体を処置するための方法に関する。これらの方法は、313、333、5464、18817または33524の発現または活性を調節する因子（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイにより同定される因子）、またはこのような因子の組み合わせを、被験体に投与することを包含する。別の実施形態では、この方法は、低下した、異常な、または望ましくない、313、333、5464、18817または33524の発現または活性を補償するための治療として、313、333、5464、18817または33524のタンパク質または核酸分子を、被験体に投与することを包含する。

30

【0124】

313、333、5464、18817または33524の活性の刺激は、313、333、5464、18817または33524が異常にダウンレギュレートされる、そして/あるいは低下した313、333、5464、18817または33524の活性が、有益な効果を有すると考えられる状況において好適である。同様に、313、333、5464、18817または33524の活性の阻害は、313、333、5464、18817または33524が、異常にアップレギュレートされる、そして/あるいは減少した313、333、5464、18817または33524の活性が、有益な効果を有すると考えられる状況において好適である。

40

【0125】

313、333、5464、18817または33524の活性を調節する因子は、このような投与に適切な薬学的組成物を用いて、被験体に投与され得る。このような組成物は、代表的には、因子（例えば、核酸分子、タンパク質、または抗体）および薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書中で使用される場合、語「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的投与に適合性の、任意および全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌性および抗真菌性の薬剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことが意図される。このような媒体および薬剤の、薬学的に活性な物質のための使用は、当該分野で周知である。活性な化合物と非適合性の任意の従来媒体または薬剤の範囲を除いて、このような媒体の本

50

発明の組成物における使用が意図される。補助的な活性化合物もまた、この組成物に組み込まれ得る。

【0126】

本発明の治療方法において用いられる薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合性となるように処方される。投与経路の例としては、非経口的（例えば、静脈内）、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所的）、経粘膜、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：滅菌希釈剤（例えば、注射のための水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；抗菌剤（例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸）；緩衝液（例えば、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩）、および張性を調整するための薬剤（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。pHは、酸または塩基（例えば、塩酸または水酸化ナトリウム）を用いて調整され得る。非経口的調製物は、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、または複数用量のバイアルに封入され得る。

10

【0127】

注射用途に適切な薬学的組成物は、滅菌注射溶液または分散液の即時調製物のための滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液、および滅菌粉末を含む。静脈内投与については、適切なキャリアには、生理学的生理食塩水、静菌水、Cremophor ELTM（BASF; Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、この組成物は、滅菌されなければならない、そして容易なシリンジ能力（syringability）が存在する程度にまで流動的にされるべきである。これは製造および貯蔵の条件下で安定でなければならない、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の汚染作用に対して保存されなければならない。このキャリアは、溶媒または分散媒体（例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）を含む）、ならびにそれらの安定な混合物であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散の場合に必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の予防は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど）によって達成され得る。多くの場合、等張剤（例えば、糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール、ソルビトール）、および塩化ナトリウム）をこの組成物中に含むことが好ましい。注射用組成物の延長した吸収は、吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）をこの組成物中に含むことによって、もたらされ得る。

20

30

【0128】

滅菌注射用溶液は、313、333、5464、18817または33524の活性を調節する因子（例えば、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質のフラグメント、あるいは抗313抗体、抗333抗体、抗5464抗体、抗18817抗体または抗33524抗体）を、上記で列挙した成分の1以上の組合せを用いて、必要とされる量で、適切な溶媒中に取り込ませ、必要に応じて、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散剤は、活性化合物を、塩基性分散媒体および上記に列挙された成分のうちの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中に取り込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、滅菌乾燥および凍結乾燥であり、これらは、予め滅菌濾過された溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる。

40

【0129】

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤に加圧され得る。経口治療投与の目的で、この活性

50

化合物は、賦形剤と共に組み込まれ、そして錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で使用され得る。経口組成物はまた、うがい薬としての使用のための流体キャリアを使用して調製され得、ここで、流体キャリア中の化合物は、経口的に適用され、そしてスウィッシュ (swish) されて、吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント材料が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分のいずれかまたは同様の性質を有する化合物を含み得る：結合剤（例えば、微結晶セルロース、ガムトラガントまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸、PrimoGel、またはコーンスターチ）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはSterotes）；グライダント (glidant)（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは矯味矯臭剤（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー）。

10

【0130】

吸入による投与のために、化合物は、適切な噴霧剤（例えば、二酸化炭素のような気体）を含む加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからのエアロゾルスプレーの形態で送達される。

【0131】

全身投与もまた、経粘膜手段または経皮手段によってなされ得る。経粘膜投与または経皮投与のために、透過されるべき障壁に対して適切な透過剤が、処方物中に使用される。そのような透過剤は、当該分野で一般的に公知であり、そのような透過剤としては、例えば、経粘膜投与のためには、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、経鼻スプレーまたは坐剤の使用を介して達成され得る。経皮投与のために、活性化化合物は、当該分野で一般的に公知であるような、軟膏、軟膏剤、ゲル、またはクリームへと処方される。

20

【0132】

313 活性、333 活性、5464 活性、18817 活性、または33524 活性を調節する薬剤もまた、（例えば、カカオ脂および他のグリセリドのような、従来の坐剤基剤を用いて）坐剤の形態で調製され得るか、または経直腸送達のために保持浣腸の形態で調製され得る。

【0133】

1つの実施形態において、313 活性、333 活性、5464 活性、18817 活性、または33524 活性を調節する薬剤は、その化合物が身体から迅速に排出されるのを防ぐキャリアを用いて調製される（例えば、移植体および微小カプセル化送達システムを含む、徐放性処方物）。生分解性の生体適合性ポリマー（例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）が、使用され得る。そのような処方物の調製方法は、当業者にとって明らかである。それらの物質はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手され得る。リポソーム懸濁物（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を含む、感染細胞標的化リポソームを含む）もまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

30

40

【0134】

投与の容易さおよび投与量の均一さのために、単位投与形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有利である。本明細書中で使用される場合、単位投与形態とは、処置される被験体にとっての単位投与量として適切な、物理的に別個の単位を指す；各単位は、必要な薬学的キャリアに付随した状態で、所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化化合物を含む。本発明の単位投薬形態についての説明は、313 活性、333 活性、5464 活性、18817 活性、または33524 活性を調節する薬剤の独特の特徴、ならびに達成されるべき特定の治療効果、ならびに被験体の処置のためにそのような薬剤を配合する分野に固有の制限により決定され、直接依存する。

50

【0135】

そのような薬剤の毒性および治療効力は、例えば、LD50（集団の50%に対して致死生である用量）およびED50（集団のうちの50%において治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養物または実験動物における標準的薬学的手順によって決定され得る。毒性効果と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、そしてそれは、比LD50/ED50として表され得る。大きな治療指数を示す薬剤が、好ましい。毒性副作用を示す薬剤が使用され得るが、非感染細胞に対して生じ得る損傷を最小にして副作用を低減するために、罹患した組織部位にそのような薬剤を標的とする送達システムを設計するために注意が払われるべきである。

【0136】

細胞培養アッセイおよび動物実験から得られるデータは、ヒトにおける使用のために一定範囲の投与量を処方する際に使用され得る。そのような313調節薬剤、333調節薬剤、5464調節薬剤、18817調節薬剤、または33524調節薬剤の投与量は、好ましくは、毒性をほとんど伴わないかまたは全く伴わない、ED50を含む一定範囲の循環濃度内に存在する。その投与量は、使用される投与形態および利用される投与経路に依存して、この範囲内で変動し得る。本発明の治療方法において使用されるどの薬剤についても、治療上有効な用量は、細胞培養アッセイからまず推定され得る。細胞培養において決定されるようなIC50（すなわち、症状の最大阻害半分を達成する試験化合物濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するための用量が、動物モデルにおいて処方され得る。そのような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために、使用され得る。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定され得る。

【0137】

本明細書中で規定される場合、タンパク質またはポリペプチドの治療上有効な量（すなわち、有効投与量）は、約0.001~30mg/kg体重、好ましくは、約0.01~25mg/kg体重、より好ましくは、約0.1~20mg/kg体重、およびなおより好ましくは、約1~10mg/kg体重、2~9mg/kg体重、3~8mg/kg体重、4~7mg/kg体重、または5~6mg/kg体重の範囲である。特定の要因が、被験体を有効に処置するために必要な投与量に影響し得ることを当業者は認識し、そのような要因としては、疾患もしくは障害の重篤度、以前の処置、被験体の全身の健康および/または年齢、ならびに存在する他の疾患が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、治療上有効な量のタンパク質、ポリペプチド、または抗体を用いる被験体の処置は、単回処置を包含し得、好ましくは、一連の処置を包含し得る。

【0138】

好ましい例において、被験体は、約0.1mg/kg体重~20mg/kg体重の間の範囲にある抗体、タンパク質、またはポリペプチドを用いて、1週間に1回、約1~10週間の間、好ましくは2~8週間の間、より好ましくは約3~7週間の間、なおより好ましくは約4週間、5週間、または6週間の間、処置される。処置に使用される抗体、タンパク質、またはポリペプチドの有効投与量は、特定の処置経過にわたって増加または減少し得ることもまた、認識される。投与量の変化は、本明細書中に記載される診断アッセイの結果から生じ得、そしてその結果から明らかになり得る。

【0139】

本発明は、発現または活性を調節する薬剤を包含する。薬剤は、例えば、低分子であり得る。例えば、そのような低分子としては、ペプチド、ペプチド模倣物、アミノ酸、アミノ酸アナログ、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドアナログ、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、約10,000グラム/モル未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物（すなわち、ヘテロ有機化合物および有機金属化合物を含む）、約5,000グラム/モル未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物、約1,000グラム/モル未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物、約500グラム/モル未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物、ならびにそのような化合物の塩、エステル、および他の薬学的に受容可能な形態が挙げられるが、これらに限定されない。低分子薬

10

20

30

40

50

剤の適切な用量は、当業者である医師、獣医師、または研究者の知識内にある多数の要因に依存することが理解される。この低分子の用量は、例えば、処置される被験体またはサンプルの身元、サイズおよび状態に依存して変化し、さらに、該当する場合は、その組成物が投与される経路、ならびに本発明の核酸もしくはポリペプチドに対してその低分子が有することを実施者が望む効果に依存して変化する。

【0140】

例示的な用量としては、被験体またはサンプルの重量 1 kg あたり、ミリグラム量またはマイクログラム量の低分子（例えば、約 1 $\mu\text{g} / \text{kg}$ ~ 約 500 mg / kg 、約 100 $\mu\text{g} / \text{kg}$ ~ 約 5 mg / kg 、または約 1 $\mu\text{g} / \text{kg}$ ~ 約 50 $\mu\text{g} / \text{kg}$ ）が挙げられる。低分子の適切な用量は、調節されるべき発現または活性に関するその低分子の能力に依存することが、さらに理解される。そのような適切な用量は、本明細書中に記載されるアッセイを使用して決定され得る。これらの低分子のうちの一つ以上が、本発明のポリペプチドまたは核酸の発現もしくは活性を調節するために動物（例えば、ヒト）に投与される場合、医師、獣医師、または研究者は、例えば、最初に比較的低用量を処方し、その後、適切な応答が得られるまでその用量を増加させ得る。さらに、特定の任意の動物被験体についての特定の用量レベルは、種々の要因（使用される特定の化合物の活性、被験体の年齢、被験体の体重、被験体の全身の健康、被験体の性別、および被験体の食餌、投与時期、投与経路、排出速度、任意の薬物組み合わせ、ならびに調節されるべき発現または活性の程度を含む）に依存することが、理解される。

【0141】

さらに、抗体（またはそのフラグメント）は、治療部分（例えば、サイトトキシン）、治療剤、または放射性金属イオンに結合体化され得る。サイトトキシンまたは細胞傷害性薬剤は、細胞に対して有害な任意の薬剤を包含する。例としては、タキソール、サイトカラシン B、グラミシジン D、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトボシド、テノボシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロパロノール、およびピューロマイシン、ならびにそれらのアナログまたはホモログが挙げられる。治療剤としては、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フルオロウラシル、ダカルバジン（decarbazine）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C、および cis-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルピシン（前名ダウノマイシン）およびドキシソルピシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（前名アクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、ならびに抗有糸分裂薬（例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0142】

本発明の結合体は、所定の生物学的応答を改変するために使用され得、その薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定するように解釈されるべきではない。例えば、その薬物部分は、所望の生物学的活性を保有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。そのようなタンパク質としては、例えば、トキシン（例えば、アブリン、リシン A、シュードモナス外毒素、またはジフテリアトキシン）；タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子）；または生物学的応答改変因子（例えば、リンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、あるいは他の増殖因子が挙げられ得る

。

【0143】

そのような治療部分を抗体に結合体化するための技術は、周知である。例えば、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら編 (Alan R. Liss, Inc., 1985)、pp. 243~56のArnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」; Controlled Drug Delivery (第2版)、Robinsonら編 (Marcel Dekker, Inc., 1987) pp. 623~53のHellstromら「Antibodies For Drug Delivery」; Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pincheraら編, pp. 475~506 (1985)のThorpe, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら編 (Academic Press 1985) pp. 303~16の「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」; ならびにThorpeら「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」 Immunol. Rev. 62: 119~58 (1982)を参照のこと。あるいは、抗体は、Segalによって米国特許第4,676,980号中に記載されるように、抗体ヘテロ結合体を形成するために二次抗体と結合され得る。

【0144】

本発明の方法において使用される核酸分子は、ベクター中に挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与 (米国特許第5,328,470号を参照のこと) または定位注射 (例えば、Chenら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054~3057を参照のこと) によって、被験体に送達され得る。その遺伝子治療ベクターの薬学的調製物は、受容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含み得るか、または遺伝子送達ビヒクルが組み込まれた徐放マトリクスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクター (例えば、レトロウイルスベクター) が組換え細胞からインタクトで産生され得る場合、その薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1つ以上の細胞を含み得る。

【0145】

(D. 薬理ゲノム学 (pharmacogenomics))

本発明の治療法と組み合わせて、薬理ゲノム学 (すなわち、被験体の遺伝子型と、外来化合物または外来薬物に対するその被験体の応答との間の関連性の研究) が、考慮され得る。治療剤の代謝における差異は、薬理学的に活性な薬物の用量と血液濃度との間の関係を変更することによって、重篤な毒性または治療の失敗をもたらし得る。従って、医師または臨床医は、313活性、333活性、5464活性、18817活性または33524活性を調節する薬剤を投与するか否か、ならびに313活性、333活性、5464活性、18817活性、または33524活性を調節する薬剤を用いる処置の投与量および/もしくは治療レジメンを変更するか否かを決定する際に、適切な薬理ゲノム学研究において得られる知識を適用することを考慮し得る。

【0146】

薬理ゲノム学は、罹患した個人における変化した薬物の性質および異常な作用に起因する、薬物に対する応答における臨床学的に有意な遺伝的変動を取り扱う。例えば、Eichelbaum, M.ら、(1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23 (10~11): 983~985およびLinder, M. W.ら、(19 50

97) Clin. Chem. 43(2): 254~266を参照のこと。一般に、2つの型の薬理ゲノム学的条件は、区別され得る。遺伝的条件は、薬物が身体に作用する様式を変更する(変化した薬物作用)単一因子として伝達したか、または遺伝的条件は、身体が薬物に作用する様式を変更する(変化した薬物代謝)単一因子として伝達した。これらの薬理ゲノム学的条件は、稀な遺伝子欠損または天然に存在する多型のいずれかとして、存在し得る。例えば、グルコース-6-リン酸アミノペプチダーゼ欠損(G6PD)は、一般的な遺伝性酵素病であり、ここで、主な臨床学的合併症は、酸化剤薬物(抗マラリア薬、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン)の摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

【0147】

「ゲノムワイド相関解析(genome-wide association)」として知られている、薬物応答を予測する遺伝子を同定するための1つの薬理ゲノム学的アプローチは、すでに知られている遺伝子関連マーカー(例えば、「二座対立遺伝子」マーカーマップ(これは、ヒトゲノム上の60,000~100,000の多型部位または変動部位からなり、その部位の各々は、2つの改変体を有する))からなるヒトゲノムの高分離度マップに、主に依存する。このような高分離度ゲノムマップは、特定の観察された薬物応答または副作用に関連したマーカーを同定するために、フェーズII/フェーズIIIの薬物試験に参加した統計学的に有意な数の患者の各々のゲノムのマップと比較され得る。あるいは、このような高分離度マップは、ヒトゲノムにおいて、数千万個の公知の一塩基多型(SNP)の組み合わせから生じ得る。本明細書中で使用される場合、「SNP」とは、DNAストレッチにおいて、単一のヌクレオチド塩基において生じる共通の変化である。例えば、SNPは、1000塩基のDNAごとに1回生じ得る。SNPは、疾患プロセスに関与し得るが、大部分は、疾患に関連していないかもしれない。このようなSNPの発生に基づく遺伝地図を考慮すると、個体は、個々のゲノムにおける特定のSNPパターンに依存して、複数の遺伝カテゴリーへと分類され得る。このような様式において、処置レジメンは、遺伝的に類似する個体間で共通であり得る特性を考慮して、そのような遺伝的に類似する個体の群に合わせて変更され得る。

【0148】

あるいは、「候補遺伝子アプローチ」と呼ばれる方法が、薬物応答を予測する遺伝子を同定するために用いられ得る。この方法に従って、薬物標的をコードする遺伝子が既知である場合(例えば、本発明の方法において使用される313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質、または33524タンパク質)、その遺伝子の共通のすべての改変体は、その集団においてかなり容易に同定され得、そして別の遺伝子バージョンに対する1つの遺伝子バージョンを有することが特定の薬物応答に関連するか否かが決定され得る。

【0149】

例示的实施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および持続時間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素(例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)およびシトクロムP450酵素であるCYP2D6およびCYP2C19)の遺伝子多型の発見は、標準的かつ安全な用量の薬物を摂取した後に、予測される薬物効果を得ることも過大な薬物応答および重篤な毒性を示すこともない患者が存在する理由に関する説明を提供した。これらの多型は、その集団中で2つの表現型(代謝が速い者(EM)および代謝が遅い者(PM))の状態で発現される。PMの普及率は、種々の集団間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は、非常に多型性であり、いくつかの変異が、PMにおいて同定されており、そのすべてが、機能的CYP2D6の不在をもたらす。CYP2D6およびCYP2C19の代謝速度が遅い者は、標準的用量を受けたときに、過大な薬物応答および副作用を非常に頻繁に経験する。代謝物が活性な治療部分である場合、PMは、CYP2D6が形成した代謝物であるモルヒネにより媒介されるコデインの鎮痛効果について示されるような、治療応答を示さない。その他の極端な者は、標準的用量に対して応答しない、いわゆる代謝が著しく速い者である。最近、著しく速い代謝

10

20

30

40

50

の分子的基礎が、CYP2D6 遺伝子増幅に起因することが同定された。

【0150】

あるいは、「遺伝子発現プロファイリング」と呼ばれる方法が、薬物応答を予測する遺伝子を同定するために用いられ得る。例えば、薬物（例えば、本発明の方法において使用される313分子、333分子、5464分子、18817分子もしくは33524分子、または313モジュレーター、333モジュレーター、5464モジュレーター、18817モジュレーター、もしくは33524モジュレーター）を投薬された動物の遺伝子発現は、毒性に関連する遺伝子経路が作動するかの指標を与え得る。

【0151】

上記薬理ゲノム学的アプローチのうちの1つより多くから得られる情報が、被験体の予防的処置または治療的処置のための、適切な投薬量および処置レジメンを決定するために使用され得る。この知識は、投薬または薬物選択に適用される場合、有害な反応または治療の失敗を回避し得、それによって、313活性、333活性、5464活性、18817活性もしくは33524活性を調節する薬剤で、心血管疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症）に罹患している被験体を処置する場合、治療効果または予防効果を増強し得る。

【0152】

（V. 本発明の方法において使用される、組換え発現ベクターおよび宿主細胞）
本発明の方法（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイ）は、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質もしくは33524タンパク質（またはその一部）をコードする核酸を含むベクター（好ましくは発現ベクター）の使用を包含する。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」とは、連結された別の核酸を輸送可能である、核酸分子を指す。1つの型のベクターは、「プラスミド」であり、「プラスミド」とは、さらなるDNAセグメントが連結され得る、環状の二本鎖DNAの輪を指す。別の型のベクターは、ウイルスベクターであり、そのベクターにおいて、さらなるDNAセグメントが、ウイルスゲノム中に連結され得る。特定のベクターは、導入される宿主細胞中で自律複製可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中に導入された際に、宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それによって、その宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、作動可能に連結された遺伝子の発現を指向可能である。そのようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」と「ベクター」とは、互換可能に使用され得る。なぜなら、プラスミドは、ベクターの最も一般的に使用される形態であるからである。しかし、本発明は、等価な機能を提供する、そのような他の形態の発現ベクター（例えば、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス））を包含することが意図される。

【0153】

本発明の方法において使用される組換え発現ベクターは、宿主細胞中での核酸の発現に適切な形態にある本発明の核酸を含む。このことは、その組換え発現ベクターが、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結された1つ以上の調節配列（発現のために使用される宿主細胞に基いて選択される）を含むことを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結された」とは、目的のヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロでの転写/翻訳系において、またはそのベクターが宿主細胞中に導入される場合は、その宿主細胞において）そのヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節配列に連結されていることを意味することが意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。そのような調節配列は、例えば、Goeddel (1990) Methods Enzymol. 185: 3~7に記載される。調節配列とは、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞においてのみそのヌクレオチド配列の発現を指向する配列（例えば、組織特異的調節配列）を包含する。発

10

20

30

40

50

現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望されるタンパク質発現レベルなどのような因子に依存し得ることが、当業者により認識される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞内に導入され得、それにより本明細書中に記載されるような核酸によってコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質または融合ペプチドを含む）（例えば、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質もしくは33524タンパク質、313タンパク質の変異体形態、333タンパク質の変異体形態、5464タンパク質の変異体形態、18817タンパク質の変異体形態もしくは33524タンパク質の変異体形態、融合タンパク質など）を産生し得る。

【0154】

本発明の方法において使用される組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞における313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の発現のために設計され得る。例えば、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質は、E. coliのような細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用する）、酵母細胞、または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Goeddel（1990）前出においてさらに記載される。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを使用して、インピトロで転写および翻訳され得る。

【0155】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成性プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを使用して、E. coliにおいて最も頻繁に行われる。融合ベクターは、ベクター中にコードされるタンパク質に、通常は、組換えタンパク質のアミノ末端に、多くのアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、3つの目的を果たす：1）組換えタンパク質の発現を増大させること；2）組換えタンパク質の可溶性を増大させること；および3）アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することにより、組換えタンパク質の精製を補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解性切断部位は、融合部分と組換えタンパク質の接合部に導入され、融合タンパク質の精製に続いて、組換えタンパク質を融合部分から分離することが可能になる。このような酵素、およびそれらのコグネイト認識配列は、第Xa因子、トロンピンおよびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、それぞれ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを、標的組換えタンパク質に融合させる、pGEX（Pharmacia Biotech Inc；Smith, D. B. およびJohnson, K. S.（1988）Gene 67：31-40）、pMAL（New England Biolabs, Beverly, MA）およびpRIT5（Pharmacia, Piscataway, NJ）が挙げられる。

【0156】

精製融合タンパク質は、313活性アッセイ、333活性アッセイ、5464活性アッセイ、18817活性アッセイまたは33524活性アッセイ（例えば、以下に詳細に記載される直接的アッセイまたは競合アッセイ）において、または313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質に特異的な抗体を生成するために利用され得る。好ましい実施形態において、本発明のレトロウイルス発現ベクターにおいて発現される313融合タンパク質、333融合タンパク質、5464融合タンパク質、18817融合タンパク質または33524融合タンパク質は、骨髄細胞に感染させるために利用され得る。続いて、この骨髄細胞は、照射されたレシピエントに移植される。次いで、被験体レシピエントの病態は、十分な時間（例えば、6週間）が経過した後に試験される。

【0157】

別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞において発現される。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8（Seed, B

10

20

30

40

50

．(1987) Nature 329:840) および pMT2PC (Kaufmanら (1987) EMBO J. 6:187-195) が挙げられる。哺乳動物細胞において使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルス調節エレメントにより提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマウイルス、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞両方について適切な他の発現系については、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989の第16章および第17章を参照のこと。

10

【0158】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型においてこの核酸の発現を優先的に指向し得る(例えば、組織特異的調節エレメントがこの核酸を発現させるために使用される)。

【0159】

本発明の方法は、本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクター(このDNA分子は、この発現ベクターにアンチセンス方向にてクローニングされる)をさらに使用し得る。すなわち、このDNA分子は、(このDNA分子の転写による)313mRNA、333mRNA、5464mRNA、18817mRNAまたは33524mRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の発現を可能にする様式にて、調節配列に作動可能に連結される。種々の細胞型(例えば、ウイルスプロモーターおよび/またはエンハンサー)におけるアンチセンスRNA分子の連続的発現を指向する、アンチセンス方向にクローニングされる核酸に作動可能に連結される調節配列が選択され得るか、またはアンチセンスRNAの構成的発現、組織特異的発現、または細胞型特異的発現を指向する調節配列が、選択され得る。このアンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化ウイルスの形態にあり得、この中でアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で生成され、その活性は、ベクターが導入される細胞型により決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の議論については、Weintraub, H. ら, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1)1986を参照のこと。

20

30

【0160】

本発明の別の局面は、本発明の313核酸分子、333核酸分子、5464核酸分子、18817核酸分子または33524核酸分子(例えば、組換え発現ベクター内の313核酸分子、333核酸分子、5464核酸分子、18817核酸分子または33524核酸分子、あるいは宿主細胞ゲノムの特定の部位への相同組換えを可能にする配列を含む、313核酸分子、333核酸分子、5464核酸分子、18817核酸分子または33524核酸分子)が導入される宿主細胞の使用に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で交換可能に使用される。このような用語は、特定の被験体細胞のみならず、このような細胞の子孫または潜在的子孫もまた言及することが理解される。特定の改変が、変異または環境的影響のいずれかに起因して、次の世代に生じ得るので、このような子孫は、実際に、親細胞と同一でなくてもよいが、本明細書中で使用される用語の範囲内になお含まれる。

40

【0161】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質は、細菌細胞(例えば、E. coli)、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)またはCOS細胞)で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0162】

50

ベクターDNAは、従来の形質転換技術またはトランスフェクション技術を介して、原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞中に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらとしては、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウムの共沈殿、DEAEデキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが挙げられる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、Sambrookら（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989）および他の実験室マニュアルに見出され得る。 10

【0163】

本発明の方法において使用される宿主細胞（例えば、培養物中の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞）を使用して、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質を生成（すなわち、発現）し得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質を生成するための方法を提供する。1つの実施形態において、本方法は、本発明の宿主細胞（この細胞中に313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質をコードする組換え発現ベクターが導入されている）を適切な培地中で培養する工程、その結果313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質を生成する工程を、 20
包含する。別の実施形態において、本方法はさらに、培地または宿主細胞から313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質を単離する工程を包含する。

【0164】

（VI. 本発明の方法において使用される、単離された核酸分子）

本発明の方法は、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質もしくは33524タンパク質、またはその生物学的に活性な部分をコードする、単離された核酸分子、ならびに、313をコードする核酸分子、333をコードする核酸分子、5464をコードする核酸分子、18817をコードする核酸分子または33524をコードする核酸分子（例えば、313 mRNA、333 mRNA、5464 mRNA、18817 mRNAまたは33524 mRNA）を同定するための、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用に足りる核酸フラグメント、および313核酸分子、333核酸分子、5464核酸分子、18817核酸分子または33524核酸分子を増幅または変異誘発するためのPCRプライマーとしての使用のためのフラグメントの使用を、包含する。本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）およびRNA分子（例えば、mRNA）、ならびにヌクレオチドアナログを使用して調製されたDNAアナログまたはRNAアナログを含むことを意図される。この核酸分子は一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは 40
二本鎖DNAである。

【0165】

本発明の方法において使用される核酸分子（例えば、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10もしくは配列番号13、またはその部分のヌクレオチド配列を有する核酸分子）を、標準的な分子生物学的技術および本明細書中に提供される配列情報を使用して単離し得る。ハイブリダイゼーションプローブとして、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10もしくは配列番号13の核酸配列の全部または一部を使用して、313核酸分子、333核酸分子、5464核酸分子、18817核酸分子または33524核酸分子を、（例えば、Sambrook, J. Fritsch, E. F., および Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory 50

Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されるような)標準的なハイブリダイゼーション技術およびクローニング技術を使用して単離し得る。

【0166】

さらに、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10もしくは配列番号13の全部または一部を含有する核酸分子を、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10または配列番号13の配列に基づいて設計した合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、単離し得る。

【0167】

本発明の方法において使用される核酸を、標準的なPCR増幅技術に従って、テンプレートとしてのcDNA、mRNAあるいはゲノムDNA、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、増幅し得る。さらに、313ヌクレオチド配列、333ヌクレオチド配列、5464ヌクレオチド配列、18817ヌクレオチド配列または33524ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドを、標準的な合成技術(例えば、自動DNA合成機を使用すること)によって、調製し得る。

【0168】

好ましい実施形態において、本発明の方法において使用される単離された核酸分子は、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10もしくは配列番号13に示される核酸配列、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10もしくは配列番号13に示される核酸配列の相補体、またはこれらのヌクレオチド配列の任意の部分を含む。配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10または配列番号13に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子とは、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10または配列番号13に示されるヌクレオチド配列に十分に相補的である核酸分子であり、その結果、この核酸分子は配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10または配列番号13に示されるヌクレオチド配列にハイブリダイズし得、それによって安定な二重鎖を形成する。

【0169】

なお別の好ましい実施形態において、本発明の方法において使用される単離された核酸分子は、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10もしくは配列番号13に示されるヌクレオチド配列の全長、またはこの核酸配列の任意の部分に、少なくとも約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%以上同一であるヌクレオチド配列を含有する。

【0170】

さらに、本発明の方法において使用される核酸分子は、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10または配列番号13の核酸配列の部分(例えば、プローブもしくはプライマーとして使用され得るフラグメント)、または313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の部分(例えば、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の生物学的に活性な部分)をコードするフラグメント)のみを含み得る。代表的に、プローブ/プライマーは、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。代表的に、オリゴヌクレオチドは、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10または配列番号13のセンス配列、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10または配列番号13のアンチセンス配列、あるいは配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10または配列番号13の天然に存在する対立遺伝子の改変体または変異体の少なくとも約12または15、好ましくは約20または25、より好ましくは約30、35、40、45、50、55、60、65または75個連続したヌクレオチドにストリンジентな条件下で、ハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。1つの実施形態において、本発明の方法において使用される核酸分子は、100、100

10

20

30

40

50

~ 200、200~300、300~400、400~500、500~600、600~700、700~800、800~900、900~1000、1000~1100、1100~1200、1200~1300以上のヌクレオチド長よりも長く、かつストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10または配列番号13の核酸分子にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。

【0171】

本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする」は、お互いに有意に同一または相同であるヌクレオチド配列が、お互いにハイブリダイズされたままである状態でハイブリダイゼーションおよび洗浄するための条件を記載することを意図する。好ましくは、この条件は、少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、なおより好ましくは少なくとも約85%または90%で、互いに同一な配列が、互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。このようなストリンジエントな条件は、当業者に公知であり、そしてCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編、John Wiley & Sons, Inc. (1995), 2節, 4節および6節に見出され得る。さらなストリンジエントな条件は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), 7節、9節および11節に見出され得る。好ましい、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、約65~70での、4x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でハイブリダイゼーション(または約42~50での、4xSSC+50%ホルムアミド中でハイブリダイゼーション)、次いで約65~70での、1xSSCで1回以上の洗浄が挙げられる。好ましい、高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、約65~70での、1xSSC中でハイブリダイゼーション(または約42~50での、1xSSC+50%ホルムアミド中でハイブリダイゼーション)、次いで約65~70での、0.3xSSCで1回以上の洗浄が挙げられる。好ましい、低いストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、約50~60での、4xSSC中でハイブリダイゼーション(または約40~45での、6xSSC+50%ホルムアミド中でハイブリダイゼーション)、次いで約50~60での、2xSSCで1回以上の洗浄が挙げられる。上記の値の中間の範囲(例えば、65~70または42~50)もまた、本発明に含まれることが意図される。SSPE(1xSSPEは、0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄および1.25mM EDTA、pH 7.4である)は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液中でSSC(1xSSCは、0.15M NaClおよび15mMクエン酸ナトリウムである)に置き換わり得る;洗浄は、各ハイブリダイゼーションが終了した後で、15分間実行される。50塩基対長未満であることが予測されるハイブリッドのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度(T_m)より5~10低くあるべきであり、ここでT_mが以下の式に従って決定される。18塩基対長未満であるハイブリッドについて、T_m() = 2(A+T塩基の数) + 4(G+C塩基の数)。18塩基対長と49塩基対長の間であるハイブリッドについて、T_m() = 81.5 + 16.6(log₁₀[Na⁺]) + 0.41(%G+C) - (600/N)、ここで、Nはハイブリッド中の塩基の数であり、そして[Na⁺]は、ハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度である(1xSSCに対する[Na⁺] = 0.165M)。膜(例えば、ニトロセルロース膜、またはナイロン膜)への核酸分子の非特異的ハイブリダイゼーションを減少させるために、さらなる試薬が、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄緩衝液に添加されることが当業者によってまた認識され、この試薬としては、限定されないが以下が挙げられる:ブロッキング剤(例えば、BSA、もしくはサケまたはニシンの精子キャリアDNA)、界面活性剤(例えば、SDS)、キレート剤(例えば、EDTA)、Ficoll、PVPなど。ナイロン膜が使用される場合、特にさらなる好

ましい、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、65 での、0.25 ~ 0.5 M NaH_2PO_4 、7% SDS 中でハイブリダイゼーション、次いで65 での、0.02 M NaH_2PO_4 、1% SDS で1回以上の洗浄である（例えば、Church および Gilbert (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1991 - 1995, (または代替的に0.2 x SSC、1% SDS)。

【0172】

好ましい実施形態において、プローブは、プローブに結合した標識基をさらに含む（例えば、標識基は、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素または酵素補因子であり得る）。このようなプローブは、313 タンパク質、333 タンパク質、5464 タンパク質、18817 タンパク質または33524 タンパク質を誤発現する (misexpress) 細胞または組織を同定するための診断的試験キットの一部として使用され得る（例えば、被験体由来の細胞サンプル中の313 コード核酸、333 コード核酸、5464 コード核酸、18817 コード核酸または33524 コード核酸のレベルを測定すること、例えば、313 mRNA レベル、333 mRNA レベル、5464 mRNA レベル、18817 mRNA レベルまたは33524 mRNA レベルを検出するか、またはゲノムの313 遺伝子、333 遺伝子、5464 遺伝子、18817 遺伝子または33524 遺伝子に変異されているか除去されているかを測定することによって）。

【0173】

本発明の方法は、遺伝暗号の縮重に起因して、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10または配列番号13に示されるヌクレオチド配列とは異なり従って、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10または配列番号13に示されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質と同じ313 タンパク質、333 タンパク質、5464 タンパク質、18817 タンパク質または33524 タンパク質をコードする核酸分子の使用をさらに含む。別の実施形態において、本発明の方法に含まれる単離された核酸分子は、配列番号3、配列番号6、配列番号9、配列番号12または配列番号15に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【0174】

本発明の方法は、ヒト313、ヒト333、ヒト5464、ヒト18817、またはヒト33524 の対立遺伝子改変体（例えば、機能的対立遺伝子改変体および非機能的対立遺伝子改変体）の使用をさらに含む。機能的対立遺伝子改変体は、ヒト313 タンパク質、ヒト333 タンパク質、ヒト5464 タンパク質、ヒト18817 タンパク質またはヒト33524 タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体であって、313、333、5464、18817 または33524 の活性を維持するアミノ酸配列改変体である。機能的対立遺伝子改変体は、代表的に、配列番号3、配列番号6、配列番号9、配列番号12または配列番号15の1つ以上のアミノ酸の保存的置換、またはそのタンパク質の非必須領域における非必須残基の置換、欠失、もしくは挿入のみを含む。非機能的対立遺伝子改変体は、ヒト313 タンパク質、ヒト333 タンパク質、ヒト5464 タンパク質、ヒト18817 タンパク質、またはヒト33524 タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体であって、313、333、5464、18817 または33524 の活性を有さないアミノ酸配列改変体である。非機能的対立遺伝子改変体は、代表的には、配列番号3、配列番号6、配列番号9、配列番号12、または配列番号15のアミノ酸配列の非保存的な置換、欠失、もしくは挿入または未成熟短縮化 (premature truncation)、あるいはこのタンパク質の必須残基または必須領域の置換、挿入、または欠失を含む。

【0175】

本発明の方法は、ヒト313 タンパク質、ヒト333 タンパク質、ヒト5464 タンパク質、ヒト18817 タンパク質、またはヒト33524 タンパク質の非ヒトオルソログをさらに使用し得る。ヒト313 タンパク質、ヒト333 タンパク質、ヒト5464 タンパク質、ヒト18817 タンパク質、またはヒト33524 タンパク質のオルソログは、非

10

20

30

40

50

ヒト生物から単離され、そして同じ313、333、5464、18817または33524の活性を有するタンパク質である。

【0176】

本発明の方法は、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、もしくは配列番号13のヌクレオチド配列またはそれらの一部を含む核酸分子であって、変異が導入されている核酸分子の使用をさらに包含する。変異は、「非必須」アミノ酸残基または「必須」アミノ酸残基でのアミノ酸置換を導き得る。「非必須」アミノ酸残基とは、その生物学的活性を変化することなく313、333、5464、18817または33524の野生型配列（例えば、配列番号3、配列番号6、配列番号9、配列番号12、または配列番号15の配列）から変化され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性のために必要とされる。例えば、本発明の313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質、または33524タンパク質の間で保存されたアミノ酸残基は、変化を受容する可能性は低い。

10

【0177】

変異は、標準技術（例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発）により配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、または配列番号13に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1つ以上の予想される非必須アミノ酸残基でなされる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるアミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当該分野において規定されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 γ -分枝鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。従って、好ましくは、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質、または33524タンパク質において予想される非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリーからの別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態において、変異は、例えば、飽和変異誘発（saturation mutagenesis）によって、313、333、5464、18817または33524のコード配列の全てまたは一部に沿って、ランダムに導入され得、そして得られた変異体は、活性を保持する変異体を同定するために、313、333、5464、18817または33524の生物学的活性についてスクリーニングされ得る。配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、または配列番号13の変異誘発の後、コードされたタンパク質が、組換え発現され得、そしてそのタンパク質の活性が、本明細書中に規定されたアッセイを用いて決定され得る。

20

30

【0178】

本発明の別の局面は、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、または配列番号13のヌクレオチド配列に対するアンチセンスである単離された核酸分子の使用に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である（例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的であるかまたはmRNA配列に相補的である）ヌクレオチド配列を含む。従って、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合し得る。アンチセンス核酸は、全長313コード鎖、全長333コード鎖、全長5464コード鎖、全長18817コード鎖、もしくは全長33524コード鎖または、それらの一部のみ相補的であり得る。1実施形態において、アンチセンス核酸分子は、313、333、5464、18817または33524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。用語「コード領域」とは、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いう。別の実施形態において、こ

40

50

のアンチセンス核酸分子は、313、333、5464、18817または33524をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対するアンチセンスである。用語「非コード領域」とは、コード領域に隣接する5'配列および3'配列であって、アミノ酸に翻訳されない配列をいう(5'および3'の非翻訳領域ともいう)。

【0179】

本明細書中に開示される313、333、5464、18817または33524をコードするコード鎖配列を考慮して、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickの塩基対形成の法則に従って、設計され得る。アンチセンス核酸分子は、313mRNA、333mRNA、5464mRNA、18817mRNAまたは33524mRNAの全コード領域に相補的であり得るが、より好ましくは、313mRNA、333mRNA、5464mRNA、18817mRNAもしくは33524mRNAのコード領域または非コード領域の一部のみに対して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、313mRNA、333mRNA、5464mRNA、18817mRNAまたは33524mRNAの翻訳開始部位の周辺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、当該分野で公知の手順を使用して、化学的合成および酵素的連結反応を使用して構築され得る。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、種々に改変されたヌクレオチドを使用して、化学的に合成され得る。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が使用され得る。アンチセンス核酸を生成するために使用され得る改変ヌクレオチドの例としては、以下が挙げられる：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ルメチル)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、-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、-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(wybutoxosine)、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-N-2-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。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクローニングされた発現ベクターを使用して、生物学的に生成され得る(すなわち、挿入された核酸から転写されるRNAは、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向のRNAである)。本発明の方法において使用されるアンチセンス核酸分子は、さらに、上記の第IV節において記載される。

【0180】

なお別の実施形態において、本発明の方法において使用される313核酸分子、333核酸分子、5464核酸分子、18817核酸分子または33524核酸分子は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格において改変されて、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは可溶性を改善し得る。例えば、核酸分子のデオキシリボースリン酸骨格は、ペプチド核酸を生成するために改変され得る(Hyrup B.ら、(1996)Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1):5-23を参

10

20

30

40

50

照のこと)。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」すなわち「PNA」は、核酸模倣物（例えば、DNA模倣物）をいい、ここで、デオキシリボースリン酸骨格は、偽ペプチド骨格によって置換され、そして4種の天然の核酸塩基だけが維持される。PNAの天然の骨格は、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示されている。PNAオリゴマーの合成は、標準的な固相ペプチド合成プロトコルを使用して、Hyrup B.ら、(1996)前出；Perry-O'Keefeら、(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. 93:14670-675に記載されるように実施され得る。

【0181】

313核酸分子、333核酸分子、5464核酸分子、18817核酸分子または33524核酸分子のPNAは、本明細書中に記載される治療適用および診断適用において使用され得る。例えば、PNAは、例えば、転写もしくは翻訳の停止を誘導するか、または複製を阻害することによって、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンス因子またはアンチ遺伝子(antigene)因子として使用され得る。313核酸分子、333核酸分子、5464核酸分子、18817核酸分子または33524核酸分子のPNAはまた、遺伝子中の単一塩基対の変異の分析において(例えば、PNA指向性のPCRクラッピングによって)；他の酵素と組み合わせて使用する場合には、「人工制限酵素」として(例えば、S1ヌクレアーゼ(Hyrup B.ら、(1996)前出))；またはDNA配列決定もしくはハイブリダイゼーションのためのプローブもしくはプライマーとして(Hyrup B.ら、(1996)前出；Perry-O'Keefeら、(1996)前出)、使用され得る。

【0182】

別の実施形態において、313、333、5464、18817または33524のPNAは、(例えば、PNAの安定性または細胞取り込みを増強するために)、PNAに新油性もしくは他のヘルパー基を結合させることによってか、PNA-DNAキメラの形成によってか、またはリボソームもしくは当該分野で公知の他の薬物送達技術の使用によって、改変され得る。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組み合わせ得る313核酸分子、333核酸分子、5464核酸分子、18817核酸分子または33524核酸分子のPNA-DNAキメラが、生成され得る。このようなキメラは、DNA認識酵素(例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼ)に、DNA部分と相互作用させ、一方、PNA部分は、高い結合親和性および結合特異性を提供する。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、核酸塩基間の結合の数および方向に関して選択される、適切な長さのリンカーを使用して、連結され得る(Hyrup B.ら、(1996)前出)。PNA-DNAキメラの合成は、Hyru P. J.ら、(1996)Nucleic Acids Res. 24(17):3357-63に記載されるように実施され得る。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホロアミダイトカップリング化学および改変ヌクレオシドアナログを使用して、固体支持体上で合成され得る。例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホラミダイトが、PNAとDNAの5'末端との間として使用され得る(Mag、M.ら、(1989)Nucleic Acid Res. 17:5973-88)。次いで、PNAモノマーは、段階的な様式でカップリングされて、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成する(Finn P. J.ら、(1996)前出)。あるいは、キメラ分子は、5'DNAセグメントおよび3'PNAセグメントを用いて合成され得る(Peterser、K. H.ら、(1975)Bioorganic Med. Chem. Lett. 5:1119-11124)。

【0183】

他の実施形態において、本発明の方法において使用されるオリゴヌクレオチドは、他の付随的な基(例えば、(例えば、インピボで宿主細胞レセプターを標的化するための)ペプチド、または細胞膜(例えば、Letsingerら、(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556；Lemaitreら、(19

87) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652; PCT 公開番号W088/09810を参照のこと)もしくは血液-脳関門(例えば、PCT 公開番号W089/10134を参照のこと)を横切る輸送を促進するための因子を含み得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションが引き金を引く切断因子(例えば、Krolら、(1988) Bio-Techniques 6:958-976を参照のこと)またはインターカレート因子を用いて改変され得る(例えば、Zon(1988) Pharm. Res. 5:539-549を参照のこと)。最後に、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が引き金を引く架橋剤、輸送因子またはハイブリダイゼーションが引き金を引く切断因子)に結合体化され得る。

10

【0184】

(VII. 本発明の方法において使用される、単離された313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質、および抗313抗体、抗333抗体、抗5464抗体、抗18817抗体または抗33524抗体)

本発明の方法は、単離された313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質およびこれらの生物学的に活性な部分、ならびに抗313抗体、抗333抗体、抗5464抗体、抗18817抗体または抗33524抗体を惹起するための免疫原として使用されるのに適切なポリペプチドフラグメントの使用を包含する。1つの実施形態において、ネイティブの313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用する、適切な精製スキームによって、細胞供給源または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質は、組換えDNA技術によって生成される。組換え発現と代替的に、313、333、5464、18817または33524のタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を使用して、化学的に合成され得る。

20

【0185】

本明細書中で使用する場合、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の「生物学的に活性な部分」は、313活性、333活性、5464活性、18817活性または33524活性を有する、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質のフラグメントを含む。313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の生物学的に活性な部分は、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質のアミノ酸配列に十分に同一であるか、あるいはこれらに由来するアミノ酸配列(例えば、全長の313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質より少ないアミノ酸を含み、かつ313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の少なくとも1つの活性を示す、配列番号3、6、9、12、または15に示されるアミノ酸配列)を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフ(例えば、アポトーシス活性の調節に関与すると考えられている、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質のN末端領域)を含む。313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、25、50、75、100、125、150、175、200、250、300以上のアミノ酸長である、ポリペプチドであり得る。313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質

30

40

50

の生物学的に活性な部分は、313活性、333活性、5464活性、18817活性または33524活性を調節する薬剤を開発するための標的として使用され得る。

【0186】

好ましい実施形態において、本発明の方法において使用される313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質は、配列番号3、6、9、12または15に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質は、配列番号3、6、9、12または15に対して実質的に同一であり、そして配列番号3、6、9、12または15のタンパク質の機能的活性を保持するが、上記第V節において詳細に記載されるように、天然の対立遺伝子改変体または変異誘発に起因して、アミノ酸配列が異なる。従って、別の実施形態において、本発明の方法において使用される313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質は、配列番号3、6、9に対して少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一なアミノ酸配列を含むタンパク質である。

10

【0187】

2つのアミノ酸配列、または2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するために、これらの配列は、最適な比較目的で整列される（例えば、ギャップは、最適な整列のために、第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方に導入され得、そして非相同配列は、比較目的で無視され得る）。好ましい実施形態において、比較目的で整列される参照配列の長さは、参照配列の少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、なおより好ましくは少なくとも60%、およびさらにより好ましくは、少なくとも70%、80%または90%の長さである（例えば、500アミノ酸残基を有する、配列番号3、6、9、12または15の313、333、5464、18817または33524の第二の配列を整列させる場合、少なくとも75、好ましくは少なくとも150、より好ましくは少なくとも225、なおより好ましくは少なくとも300およびなおより好ましくは少なくとも400またはそれ以上のアミノ酸残基が整列される）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが、比較される。第1の配列における位置が、第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、これらの分子は、その位置で同一である（本明細書中で使用される場合、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」と等しい）。2つの配列間のパーセント同一性は、それらの配列により共有される同一の位置の数の関数である（ギャップの数、および、2つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要のある各ギャップの長さが考慮される）。

20

30

【0188】

配列の比較および2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成され得る。好ましい実施形態において、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>から入手可能）中のGAPプログラムに組み込まれたNeedlemanおよびWunsch（J. Mol. Biol. 48:444-453（1970））のアルゴリズムを用い、Blossum 62マトリクスまたはPAM250マトリクスのいずれか、ならびにギャップウェイト16、14、12、10、8、6、または4およびレングスウェイト（length weight）1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。さらに別の好ましい実施形態において、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>から入手可能）中のGAPプログラムを用い、NWsgapdna.CMPマトリクスならびにギャップウェイト40、50、60、70、または80およびレングスウェイト1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。別の実施形態において、2つのアミノ酸配列間または2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム（バージョン2.0または2

40

50

. 0 U) に組みこまれた E. Meyers および W. Miller (Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17 (1988)) のアルゴリズムを使用し、のアルゴリズムを用い、PAM120 ウェイトレジデュートーブル (weight residue table)、ギャップペナルティ-12、およびギャップペナルティ-4 を用いて決定され得る。

【0189】

本発明の方法はまた、313、333、5464、18817 または 33524 のキメラタンパク質または融合タンパク質を使用し得る。本明細書中で使用される場合、313、333、5464、18817 または 33524 の「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非313ポリペプチド、非333ポリペプチド、非5464ポリペプチド、非18817ポリペプチドまたは非33524ポリペプチドに作動可能に連結された、313ポリペプチド、333ポリペプチド、5464ポリペプチド、18817ポリペプチドまたは33524ポリペプチドを含む。「313ポリペプチド、333ポリペプチド、5464ポリペプチド、18817ポリペプチドまたは33524ポリペプチド」は、313分子、333分子、5464分子、18817分子または33524分子に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいうが、一方、「非313ポリペプチド、非333ポリペプチド、非5464ポリペプチド、非18817ポリペプチドまたは非33524ポリペプチド」は、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質に実質的に相同でないタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチド（例えば、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質とは異なり、かつ同じ生物または異なる生物由来のタンパク質）をいう。313融合タンパク質、333融合タンパク質、5464融合タンパク質、18817融合タンパク質または33524融合タンパク質において、313ポリペプチド、333ポリペプチド、5464ポリペプチド、18817ポリペプチドまたは33524ポリペプチドは、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の全てまたは一部に対応し得る。好ましい実施形態において、313融合タンパク質、333融合タンパク質、5464融合タンパク質、18817融合タンパク質または33524融合タンパク質は、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の生物学的に活性な部分のうち少なくとも1つを含む。別の好ましい実施形態において、313融合タンパク質、333融合タンパク質、5464融合タンパク質、18817融合タンパク質または33524融合タンパク質は、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の生物学的に活性な部分のうち少なくとも2つを含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結した」は、313ポリペプチド、333ポリペプチド、5464ポリペプチド、18817ポリペプチドまたは33524ポリペプチドおよび非313ポリペプチド、非333ポリペプチド、非5464ポリペプチド、非18817ポリペプチドまたは非33524ポリペプチドは、互いにインフレームで融合される。非313ポリペプチド、非333ポリペプチド、非5464ポリペプチド、非18817ポリペプチドまたは非33524ポリペプチドは、313ポリペプチド、333ポリペプチド、5464ポリペプチド、18817ポリペプチドまたは33524ポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

【0190】

例えば、1つの実施形態において、融合タンパク質は、GST-313融合タンパク質、GST-333融合タンパク質、GST-5464融合タンパク質、GST-18817融合タンパク質またはGST-33524融合タンパク質であり、ここで、313配列、333配列、5464配列、18817配列または33524配列は、GST配列のC末端に融合されている。このような融合タンパク質は、組換え313、組換え333、組換え5464、組換え18817または組換え33524の精製を容易にし得る。

【0191】

別の実施形態において、この融合タンパク質は、そのN末端において異種シグナル配列を含む313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質である。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、313、333、5464、18817もしくは33524の発現および/または分泌は、異種シグナル配列の使用によって増大され得る。

【0192】

本発明の方法において使用される313融合タンパク質、333融合タンパク質、5464融合タンパク質、18817融合タンパク質または33524融合タンパク質は、薬学的組成物中に組み込まれ得、そして被験体にインピボで投与され得る。313融合タンパク質、333融合タンパク質、5464融合タンパク質、18817融合タンパク質または33524融合タンパク質は、313基質、333基質、5464基質、18817基質または33524基質のバイオアベイラビリティに影響を与えるために使用され得る。313融合タンパク質、333融合タンパク質、5464融合タンパク質、18817融合タンパク質または33524融合タンパク質の使用は、例えば、以下によって引き起こされる障害の処置のために治療的に有用であり得る：(i)313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質をコードする遺伝子の異常な改変または変異；(ii)313遺伝子、333遺伝子、5464遺伝子、18817遺伝子または33524遺伝子の誤調節；ならびに(iii)313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の異常な翻訳後修飾。

10

20

【0193】

さらに、本発明の方法において使用される313融合タンパク質、333融合タンパク質、5464融合タンパク質、18817融合タンパク質または33524融合タンパク質は、被験体において抗313抗体、抗333抗体、抗5464抗体、抗18817抗体または抗33524抗体を産生するための免疫原として、313リガンド、333リガンド、5464リガンド、18817リガンドまたは33524リガンドを精製するために、そして313、333、5464、18817または33524の、313基質、333基質、5464基質、18817基質または33524基質との相互作用を阻害する分子を同定するためのスクリーニングアッセイにおいて、使用され得る。

【0194】

好ましくは、本発明の方法において使用される313、333、5464、18817または33524の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技術によって産生される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントは、従来技術に従って、例えば、連結のために平滑末端または付着末端を使用し、適切な末端を提供するための制限酵素消化を使用し、適切な場合粘着末端をフィルインし、所望で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を使用し、そして酵素的連結を使用することによって一緒にインフレームで連結される。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動化DNA合成機を含む従来技術によって合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅は、引き続いてアニーリングおよび再増幅されてキメラ遺伝子配列を生成し得る2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバーハングを生じるアンカ

30

40

【0195】

本発明はまた、313アゴニスト、333アゴニスト、5464アゴニスト、18817

50

アゴニストもしくは3 3 5 2 4アゴニスト(模倣物)、または3 1 3アンタゴニスト、3 3 3アンタゴニスト、5 4 6 4アンタゴニスト、1 8 8 1 7アンタゴニストもしくは3 3 5 2 4アンタゴニストのいずれかとして機能する、3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質の改変体の使用に関する。3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質の改変体は、変異誘発(例えば、3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質の別個の点変異または短縮)によって生成され得る。3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質のアゴニストは、3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性と実質的に同じ生物学的活性またはそのサブセットを保持し得る。3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質のアゴニストは、例えば、3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質の、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7または3 3 5 2 4媒介性の活性を拮抗的に調節することによって、3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質の天然に存在する形態の活性の1以上を阻害し得る。従って、特定の生物学的効果は、機能が限定された改変体を用いる処置によって排除され得る。1つの実施形態において、タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを有する改変体を用いる被験体の処置は、3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質の天然に存在する形態を用いた処置と比較して、被験体における副作用がより小さい。

【0196】

1つの実施形態において、3 1 3アゴニスト、3 3 3アゴニスト、5 4 6 4アゴニスト、1 8 8 1 7アゴニストもしくは3 3 5 2 4アゴニスト(模倣物)、または3 1 3アンタゴニスト、3 3 3アンタゴニスト、5 4 6 4アンタゴニスト、1 8 8 1 7アンタゴニストもしくは3 3 5 2 4アンタゴニストのいずれかとして機能する、3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質の改変体は、3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質のアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性について、3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質の変異体(例えば、短縮変異体)のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって、同定され得る。1つの実施形態において、3 1 3改変体、3 3 3改変体、5 4 6 4改変体、1 8 8 1 7改変体または3 3 5 2 4改変体の多様なライブラリーは、核酸レベルでのコンビナトリアル変異誘発によって生成され、そして多様な遺伝子ライブラリーによってコードされる。3 1 3改変体、3 3 3改変体、5 4 6 4改変体、1 8 8 1 7改変体または3 3 5 2 4改変体の多様なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的に連結することによって生成され得、その結果、潜在的な3 1 3配列、3 3 3配列、5 4 6 4配列、1 8 8 1 7配列または3 3 5 2 4配列の縮重セットは、個々のポリペプチドとしてか、あるいはその中に3 1 3配列、3 3 3配列、5 4 6 4配列、1 8 8 1 7配列または3 3 5 2 4配列のセットを含むより大きい融合タンパク質のセットとして(例えば、ファージディスプレイについて)発現可能である。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的な3 1 3改変体、3 3 3改変体、5 4 6 4改変体、1 8 8 1 7改変体または3 3 5 2 4改変体のライブラリーを生成するために、種々の方法が使用され得る。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化DNA合成機において実施され得、次いで、この合成遺伝子は、適切な発現ベクター中に連結され得る。遺伝子の縮重セットの使用は、潜在的な3 1 3配列、3 3 3配列、5 4 6 4配列、1 8 8 1 7配列または3 3 5 2 4配列の所望のセットをコードする全ての配列を1つの混合物中で準備することを可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は、

当該分野で公知である(例えば、Narang, S. A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakuraら、(1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakuraら、(1984) *Science* 198:1056; Ikeら、(1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477を参照のこと)。

【0197】

さらに、313、333、5464、18817または33524のタンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーは、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の改変体のスクリーニングおよび引き続く選択のために、313フラグメント、333フラグメント、5464フラグメント、18817フラグメントまたは33524フラグメントの多様な集団を生成するために使用され得る。1つの実施形態において、コード配列フラグメントのライブラリーは、313コード配列、333コード配列、5464コード配列、18817コード配列または33524コード配列の二本差PCRフラグメントを、ニック形成が1分子当たりほぼ1回だけ生じるような条件下でヌクレアーゼで処理し、二重鎖DNAを変性し、異なるニック形成産物由来のセンス/アンチセンス対を含み得る二重鎖DNAを形成するためにDNAを再生し、S1ヌクレアーゼでの処理によって、再形成された二重鎖から一本鎖部分を除去し、そして得られたフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することによって、生成され得る。この方法によって、種々のサイズの313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質のN末端フラグメント、C末端フラグメントおよび内部フラグメントをコードする、発現ライブラリーが誘導され得る。

【0198】

点変異または短縮によって作成されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするためのいくつかの技術、および選択された特性を有する遺伝子産物についてのcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技術が、当該分野で公知である。このような技術は、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質のコンビナトリアル変異誘発によって生成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングのために適合可能である。大きい遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための高スループットの分析に使用されやすい、最も広く使用される技術は、代表的に、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングする工程、ベクターの得られたライブラリーで適切な細胞を形質転換する工程、および所望の活性の検出が、産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にするような条件下でコンビナトリアル遺伝子を発現する工程を包含する。再帰的アンサンブル変異誘発(*recursive ensemble mutagenesis* (REM)) (これは、ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増強する新たな技術である)は、313改変体、333改変体、5464改変体、18817改変体または33524改変体を同定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせて使用され得る(ArkinおよびYourvan(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgraveら、(1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331)。

【0199】

本発明の方法はさらに、抗313抗体、抗333抗体、抗5464抗体、抗18817抗体または抗33524抗体の使用を包含する。単離された313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質、またはそれらの一部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製のための標準的な技術を用いて、313、333、5464、18817または33524に結合する抗体を生成するための抗原として使用され得る。全長の313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質が使用され得るか、あるいは313、333、5464、18817または

10

20

30

40

50

3 3 5 2 4の抗原性ペプチドフラグメントが免疫原として使用され得る。3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7または3 3 5 2 4の抗原性ペプチドは、配列番号3、6、9、1 2または1 5に示されるアミノ酸配列の少なくとも8アミノ酸残基を含み、そしてこのペプチドに対して惹起された抗体が、3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質と特異的に免疫複合体を形成するように、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7または3 3 5 2 4のエピトープを含む。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基、より好ましくは、少なくとも15アミノ酸残基、さらにより好ましくは、少なくとも20アミノ酸残基、そして最も好ましくは、少なくとも30アミノ酸残基を含む。

【0200】

抗原性ペプチドにより含まれる、好ましいエピトープは、タンパク質の表面に局在される3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7または3 3 5 2 4の領域（例えば、親水性領域）、および高抗原性を有する領域である。

【0201】

3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7または3 3 5 2 4の免疫原は、代表的に、適切な被験体（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物）を、免疫原を用いて免疫することにより抗体を調製するために使用される。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換え的に発現された3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質、あるいは化学的に合成された3 1 3ポリペプチド、3 3 3ポリペプチド、5 4 6 4ポリペプチド、1 8 8 1 7ポリペプチドまたは3 3 5 2 4ポリペプチドを含み得る。この調製物はさらに、アジュバント（例えば、フロイントのアジュバントもしくは不完全なアジュバント）、あるいは類似の免疫刺激剤を含み得る。免疫原性の3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7または3 3 5 2 4の調製物を用いる、適切な被験体の免疫は、ポリクローナルの抗3 1 3抗体、抗3 3 3抗体、抗5 4 6 4抗体、抗1 8 8 1 7抗体または抗3 3 5 2 4抗体の応答を誘導する。

【0202】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原（例えば、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7または3 3 5 2 4）に、（免疫反応を伴って）特異的に結合する抗原結合部位を含む分子をいう。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、ペプシンのような酵素で抗体を処理することによって生成され得るF(a b)フラグメントおよびF(a b')₂フラグメントが挙げられる。本発明は、3 1 3分子、3 3 3分子、5 4 6 4分子、1 8 8 1 7分子または3 3 5 2 4分子に結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7または3 3 5 2 4の特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位の1つの種のみを含む抗体分子の集団をいう。従って、モノクローナル抗体組成物は、代表的に、その抗体が免疫反応する、特定の3 1 3タンパク質、3 3 3タンパク質、5 4 6 4タンパク質、1 8 8 1 7タンパク質または3 3 5 2 4タンパク質に対して単一結合親和性を示す。

【0203】

ポリクローナル抗3 1 3抗体、抗3 3 3抗体、抗5 4 6 4抗体、抗1 8 8 1 7抗体または抗3 3 5 2 4抗体は、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7または3 3 5 2 4の免疫原を用いて適切な被験体を免疫することによって、上記のように調製され得る。免疫された被験体における、抗3 1 3抗体、抗3 3 3抗体、抗5 4 6 4抗体、抗1 8 8 1 7抗体または抗3 3 5 2 4抗体の力価は、標準的な技術（例えば、免疫した3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7または3 3 5 2 4を用いる、固相酵素免疫検出法（ELISA））によって、経時的にモニターされ得る。所望の場合、3 1 3、3 3 3、5 4 6 4、1 8 8 1 7または3 3 5 2 4に対する抗体分子は、哺乳動物（例えば、血液）から単離され得、そしてさらに、周知の技術（例えば、IgG画分を得るためのプロテインAクロマトグラフィー）によって精製され得る。免疫後の適切なとき（例えば、抗3 1 3抗体、抗3 3 3抗体、

10

20

30

40

50

抗5464抗体、抗18817抗体または抗33524抗体の力価が最も高いとき)に、抗体産生細胞は被験体から入手され得、そして標準的な技術(例えば、KohlerおよびMilstein(1975)Nature 256:495-497)(Brownら(1981)J. Immunol. 127:539-46; Brownら(1980)J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yehら(1976)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:2927-31; ならびにYehら(1982)Int. J. Cancer 29:269-75もまた参照のこと)によってもともと記載されるハイブリドーマ技術、最近のヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら(1983)Immunol Today 4:72)、EBV-ハイブリドーマ技術(Coleら(1985)Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)またはトリマ技術)によってモノクローナル抗体を調製するために使用され得る。モノクローナル抗体ハイブリドーマを生成するための技術は周知である(一般的に、Kenneth, R. H. in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York(1980); Lerner, E. A. (1981)Yale J. Biol. Med. 54:387-402; Gefter, M. L.ら(1977)Somatic Cell Genet. 3:231-36を参照のこと)。簡単に言えば、不死化した細胞株(代表的に黒色腫)は、上記のような313、333、5464、18817または33524の免疫原で免疫した哺乳動物に由来するリンパ球(代表的に脾細胞)と融合され、そして得られたハイブリドーマ細胞の、細胞培養上清は、313、333、5464、18817または33524に結合するモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを同定するためにスクリーニングされる。

【0204】

リンパ球と不死化細胞株との融合のために使用される、任意の多くの周知のプロトコルが、抗313モノクローナル抗体、抗333モノクローナル抗体、抗5464モノクローナル抗体、抗18817モノクローナル抗体または抗33524モノクローナル抗体を生成する目的のために適用され得る(例えば、G. Galfreら(1977)Nature 266:550-52; Gefterら(1977)前出; Lerner(1981)前出; およびKenneth(1980)前出を参照のこと)。さらに、当業者は、このような方法の多くのバリエーションもまた有用であることを理解する。代表的に、不死化細胞株(例えば、黒色腫細胞株)は、リンパ球のような同一の哺乳動物由来である。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物で免疫したマウスに由来するリンパ球を、不死化マウス細胞株とを融合することによって作製され得る。好ましい不死化細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(「HAT培地」)を含む培養培地に感受性である、マウス黒色腫細胞株である。任意の多くの黒色腫細胞株が、標準的な技術に従う融合パートナー(例えば、P3-NS1/1-Ag4-1黒色種細胞株、P3-x63-Ag8.653黒色種細胞株またはSp2/O-Ag14黒色種細胞株)として使用され得る。これらの黒色種細胞株は、ATCCから入手可能である。代表的に、HAT感受性マウス黒色種細胞株は、ポリエチレングリコール(「PEG」)を用いてマウス脾細胞に融合される。次いで、融合によって得られたハイブリドーマ細胞は、HAT培地を用いて選択される(これは、融合していない黒色腫細胞および非生産性融合黒色腫細胞を殺傷する(融合していない脾細胞は形質転換されないので、数日後に死滅する))。本発明のモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準的なELISAアッセイを用いて、313、333、5464、18817または33524に結合する抗体について、ハイブリドーマ培養物の上清をスクリーニングすることによって検出される。

【0205】

あるいは、モノクローナル抗体スクリーニングハイブリドーマを調製するために、モノク

ローナル抗313抗体、抗333抗体、抗5464抗体、抗18817抗体または抗33524抗体は、313、333、5464、18817または33524を用いて、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）をスクリーニングすることによって同定および単離され得、それによって、313、333、5464、18817または33524に結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離する。ファージディスプレイライブラリーを生成およびスクリーニングするためのキットは、市販されている（例えば、the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01；およびthe Stratagene SurfZAPTM Phage Display Kit、カタログ番号240612）。さらに、抗体ディスプレイライブラリーの生成およびスクリーニングにおける使用のために特に適切な方法および試薬の例は、以下において見出され得る：例えば、Ladnerら、米国特許第5,223,409号；Kangら、PCT国際出願番号WO92/18619；Dowerら、PCT国際出願番号WO91/17271；Winterら、PCT国際出願WO92/20791；Marklandら、PCT国際出願番号WO92/15679；Breitlingら、PCT国際出願WO93/01288；McCaffertyら、PCT国際出願番号WO92/01047；Garrardら、PCT国際出願番号WO92/09690；LadnerらPCT国際出願番号WO90/02809；Fuchsら（1991）Bio/Technology 9:1370-1372；Hayら（1992）Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85；Huseら（1989）Science 246:1275-1281；Griffithsら（1993）EMBO J 12:725-734；Hawkinsら（1992）J. Mol. Biol. 226:889-896；Clarksonら（1991）Nature 352:624-628；Gramら（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580；Garradら（1991）Bio/Technology 9:1373-1377；Hoogenboomら（1991）Nuc. Acid Res. 19:4133-4137；Barbasら（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982；およびMcCaffertyら（1990）Nature 348:552-554。

【0206】

さらに、標準的な組換えDNA技術を用いて作製され得る、組換え抗313抗体、組換え抗333抗体、組換え抗5464抗体、組換え抗18817抗体または組換え抗33524抗体（例えば、ヒトおよび非ヒトの両方の部分を含むキメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体）は、本発明の方法の範囲内にある。このようなキメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、例えば、以下に記載される方法を用いて、当該分野に公知の組換えDNA技術によって作製され得る：Robinsonら国際出願番号PCT/US86/02269；Akiraら、欧州特許出願第184,187号；Taniguchi, M., 欧州特許出願第171,496号；Morrissonら、欧州特許出願第173,494号；Neubergerら、PCT国際出願番号WO86/01533；Cabillyら、米国特許第4,816,567号；Cabillyら、欧州特許出願第125,023号；Betterら（1988）Science 240:1041-1043；Liuら（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443；Liuら（1987）J. Immunol. 139:3521-3526；Sunら（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218；Nishimuraら（1987）Canc. Res. 47:999-1005；Woodら（1985）Nature 314:446-449；Shawら（1988）J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559；Morrisson, S. L.（1985）Science 229:1202-1207；Oiら（1986）BioTechniques 4:214；Winter、米国特許第5,225,539号；Jonesら（1986）Nature 3

21:552-525; Verhoeyan *B* (1988) *Science* 239:1534; および Beidler *B* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060。

【0207】

抗313抗体、抗333抗体、抗5464抗体、抗18817抗体または抗33524抗体は、313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質の存在量および発現パターンを評価するために、(例えば、細胞溶解物または細胞上清において)313タンパク質、333タンパク質、5464タンパク質、18817タンパク質または33524タンパク質を検出するために使用され得る。抗313抗体、抗333抗体、抗5464抗体、抗18817抗体または抗33524抗体は、臨床試験手順(例えば、所定の処置レジメンの効率を決定するために)の一部として、組織においてタンパク質のレベルをモニタリングするために診断的に使用され得る。検出は、検出可能な物質に抗体を結合させる(すなわち、物理的連結)ことによって促進され得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射活性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ;適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ;適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ;発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ;生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ;そして適切な放射活性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられる。

10

20

【0208】

本発明はさらに、限定と解釈されるべきではない以下の実施例によって例示される。本出願、ならびに図面および配列表を通して引用される全ての参考文献、特許および公開された特許出願の内容は、本明細書中に参考として援用される。

【実施例】

【0209】

(実施例1 TaqMan^{T M}分析を用いた組織の配置)

本実施例は、TaqMan^{T M}手順を記載する。Taqman^{T M}手順は、mRNAを検出するための、定量的な逆転写PCRベースのアプローチである。このRT-PCR反応は、PCRの間に、TaqMan^{T M}プローブを切断するために、AmpliTaq Gold^{T M} DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性を活用する。簡単に言えば、cDNAを目的のサンプル(例えば、心臓、腎臓、肝臓、骨格筋、および種々の管)から生成し、そしてPCR増幅のための出発物質として使用した。5'遺伝子特異的プライマーおよび3'遺伝子特異的プライマーに加えて、遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ(増幅されている領域に相補的である)を、この反応物(すなわち、Taqman^{T M}プローブ)に含めた。Taqman^{T M}プローブは、プローブの5'末端に共有結合した蛍光レポーター色素(例えば、FAM(6-カルボキシフルオレセイン)、TET(6-カルボキシ-4,7,2',7'-テトラクロロフルオレセイン)、JOE(6-カルボキシ-4,5-ジクロロ-2,7-ジメチルオキシフルオレセイン)、もしくはVIC)、およびこのプローブの3'末端にクエンチャー色素(TAMRA(6-カルボキシ-N,N,N'-テトラメチルローダミン))を有するオリゴヌクレオチドを含む。

30

40

【0210】

PCR反応の間、プローブの切断は、レポーター色素およびクエンチャー色素を分離し、結果としてレポーターの蛍光を増強する。PCR産物の蓄積は、レポーター色素の蛍光増強をモニタリングすることによって検出する。プローブがインタクトな場合、クエンチャー色素に対してレポーター色素の近位にレポーター蛍光の抑制が生じる。PCRの間、目的の標的が存在する場合、このプローブは順方向プライマーと逆方向プライマーとの間の

50

部位に特異的にアニールする。Ampli TaqTM Gold DNAポリメラーゼの5' - 3'ヌクレオチド分解性(nucleolytic)活性は、プローブが標的にハイブリダイズする場合のみ、レポーターとクエンチャーとの間でプローブを切断する。次いで、プローブフラグメントを、標的と置換し、そして鎖の重合を続ける。PCRの間、プローブの伸長を防ぐように、このプローブの3'末端をブロックする。このプロセスは全てのサイクルで生じ、そして産物の指数関数的な蓄積を妨害しない。RNAを、トリゾール方法を使用して調製し、そして汚染したゲノムDNAを除去するためにDNaseで処理した。標準的な方法を使用してcDNAを合成した。逆転写酵素の非存在下において、コントロール遺伝子の検出可能なPCR増幅を有さないサンプルに生じるMock cDNA合成は、ゲノムDNA汚染の有効な除去を確証する。

10

(等価物)

当業者は、本明細書中に記載される本発明の特定の実施形態の多くの等価物を認識するか、または慣用的にすぎない実験法を使用してこれらの等価物を確認し得る。このような等価物は、添付の特許請求の範囲に含まれるべきであることが意図される。

【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
15 May 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/039475 A2

- (51) International Patent Classification: A61K (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), 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, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/35824
- (22) International Filing Date: 7 November 2002 (07.11.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/344,552 7 November 2001 (07.11.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): SILOS-SANTIAGO, Inmaculada [ES/US]; 2123 De Mayo Road, Del Mar, CA 92014 (US).
- (74) Agent: BOSSONE, Steven, A.; Millennium Pharmaceuticals, Inc., 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- 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 03/039475 A2

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING UROLOGICAL DISORDERS USING 313, 333, 5464, 18817 OR 33524

(57) Abstract: The present invention relates to methods for the diagnosis and treatment of a urological disorder or urological disorders. Specifically, the present invention identifies the differential expression of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 genes in tissues relating to urological disorder, relative to their expression in normal, or non-urological disorder disease states, and/or in response to manipulations relevant to a urological disorder. The present invention describes methods for the diagnostic evaluation and prognosis of various urological diseases, and for the identification of subjects exhibiting a predisposition to such conditions. The invention also provides methods for identifying a compound capable of modulating a urological disorder or urological disorders. The present invention also provides methods for the identification and therapeutic use of compounds as treatments of urological disorders.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

**METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING UROLOGICAL
DISORDERS USING 313, 333, 5464, 18817 OR 33524**

This application claims priority to U.S. provisional application number 60/344,552,
5 filed November 7, 2001, the entire contents of which are incorporated herein by reference.

There are several types of urinary incontinence (UI), the two most common ones
being stress urinary incontinence (SUI) and urge urinary incontinence (UUI). SUI can co-
exist with UUI and is then referred to as mixed urinary incontinence. UUI is part of a
10 complex known as overactive or oversensitive bladder, which include symptoms of
frequency and/or urgency with or without UUI. 75% of patients with incontinence are
elderly females.

Bladder overactivity may result from detrusor instability or hyperreflexia. Triggers
may include increased activity of afferent peripheral nerve terminals in the bladder or
decreased inhibitory control in the central nervous system and/or in peripheral ganglia.
15 Changes in detrusor muscle structure or function, such as increased muscle cell excitability
due to denervation, may also play a role in the pathogenesis of this filling disorder.

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is a common age-related pathological
condition that affects men worldwide. At 60 years of age, at least 25% have symptoms of
BPH. The symptoms of BPH are currently referred to as lower urinary tract symptoms
20 (LUTS). LUTS are traditionally divided into obstructive (weak stream, intermittency,
straining, etc.) and irritative (frequency, nocturia, urgency, etc.) symptoms. They are
caused by at least three pathophysiological components, *i.e.*, static, dynamic and bladder
detrusor-related. Prostate enlargement, or more specifically benign prostatic nodular
enlargement, accounts for much of the static obstructive element and in the elderly male is
25 mainly confined to the transition zone and periurethral glandular tissue. By contrast the
dynamic component is a reflection of smooth muscle tone in the prostate and the bladder
neck. Variations in muscle tone cause corresponding changes in the degree of outlet
obstruction. Bladder and detrusor-related components are believed to predominate in those
with principally irritative symptoms. They reflect an increase in the incidence of
30 uninhibited detrusor contractions and at the same time a loss of contractile ability of the
bladder, both of which are a response to existing obstruction.

There is an unmet medical need for therapeutics useful for UI and BPH.

The present invention provides methods and compositions for the diagnosis and
treatment of urological disorders, including but not limited to UI and BPH. Urological

WO 03/039475

PCT/US02/35824

disorders as used herein can be diseases of the bladder including but not limited to urinary incontinence including overactive/oversensitive bladder, overflow urinary incontinence, stress urinary incontinence caused by dysfunction of the bladder, urethra or central/peripheral nervous system.

5 As used herein a urological disorder can be a disorder of the prostate including but not limited to "a prostate disorder" which refers to an abnormal condition occurring in the male pelvic region characterized by, e.g., male sexual dysfunction and/or urinary symptoms. This disorder may be manifested in the form of genitourinary inflammation (e.g., inflammation of smooth muscle cells) as in several common diseases of the prostate
10 including prostatitis, benign prostatic hyperplasia and cancer, e.g., adenocarcinoma or carcinoma, of the prostate.

As used herein a urological disorder can be a disorder of the kidney including but not limited to congenital anomalies including, but not limited to, cystic diseases of the kidney, that include but are not limited to, cystic renal dysplasia, autosomal dominant (adult)
15 polycystic kidney disease, autosomal recessive (childhood) polycystic kidney disease, and cystic diseases of renal medulla, which include, but are not limited to, medullary sponge kidney, and nephronophthisis-uremic medullary cystic disease complex, acquired (dialysis-associated) cystic disease, such as simple cysts; glomerular diseases including pathologies of glomerular injury that include, but are not limited to, in situ immune complex deposition, that
20 includes, but is not limited to, anti-GBM nephritis, Heymann nephritis, and antibodies against planted antigens, circulating immune complex nephritis, antibodies to glomerular cells, cell-mediated immunity in glomerulonephritis, activation of alternative complement pathway, epithelial cell injury, and pathologies involving mediators of glomerular injury including cellular and soluble mediators, acute glomerulonephritis, such as acute proliferative
25 (poststreptococcal, postinfectious) glomerulonephritis, including but not limited to, poststreptococcal glomerulonephritis and nonstreptococcal acute glomerulonephritis, rapidly progressive (crescentic) glomerulonephritis, nephrotic syndrome, membranous glomerulonephritis (membranous nephropathy), minimal change disease (lipoid nephrosis), focal segmental glomerulosclerosis, membranoproliferative glomerulonephritis, IgA
30 nephropathy (Berger disease), focal proliferative and necrotizing glomerulonephritis (focal glomerulonephritis), hereditary nephritis, including but not limited to, Alport syndrome and thin membrane disease (benign familial hematuria), chronic glomerulonephritis, glomerular lesions associated with systemic disease, including but not limited to, systemic lupus erythematosus, Henoch-Schönlein purpura, bacterial endocarditis, diabetic

WO 03/039475

PCT/US02/35824

glomerulosclerosis, amyloidosis, fibrillary and immunotactoid glomerulonephritis, and other systemic disorders; diseases affecting tubules and interstitium, including acute tubular necrosis and tubulointerstitial nephritis, including but not limited to, pyelonephritis and urinary tract infection, acute pyelonephritis, chronic pyelonephritis and reflux nephropathy, and tubulointerstitial nephritis induced by drugs and toxins, including but not limited to, acute drug-induced interstitial nephritis, analgesic abuse nephropathy, nephropathy associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and other tubulointerstitial diseases including, but not limited to, urate nephropathy, hypercalcemia and nephrocalcinosis, and multiple myeloma; diseases of blood vessels including benign nephrosclerosis, malignant hypertension and accelerated nephrosclerosis, renal artery stenosis, and thrombotic microangiopathies including, but not limited to, classic (childhood) hemolytic-uremic syndrome, adult hemolytic-uremic syndrome/thrombotic thrombocytopenic purpura, idiopathic HUS/TTP, and other vascular disorders including, but not limited to, atherosclerotic ischemic renal disease, atheroembolic renal disease, sickle cell disease nephropathy, diffuse cortical necrosis, and renal infarcts; urinary tract obstruction (obstructive uropathy); urolithiasis (renal calculi, stones); and tumors of the kidney including, but not limited to, benign tumors, such as renal papillary adenoma, renal fibroma or hamartoma (renomedullary interstitial cell tumor), angiomyolipoma, and oncocytoma, and malignant tumors, including renal cell carcinoma (hypemephroma, adenocarcinoma of kidney), which includes urothelial carcinomas of renal pelvis.

“Treatment”, as used herein, is defined as the application or administration of a therapeutic agent to a patient, or application or administration of a therapeutic agent to an isolated tissue or cell line from a patient, who has a disease or disorder, a symptom of disease or disorder or a predisposition toward a disease or disorder, with the purpose of curing, healing, alleviating, relieving, altering, remedying, ameliorating, improving or affecting the disease or disorder, at least one symptom of disease or disorder or the predisposition toward a disease or disorder. A therapeutic agent includes, but is not limited to, small molecules, peptides, antibodies, ribozymes and antisense oligonucleotides. Representative molecules are described herein.

The present invention is based, at least in part, on the discovery that nucleic acid and protein molecules, (described infra), are differentially expressed in disease states relative to their expression in normal, or non- disease states. The modulators of the molecules of the present invention, identified according to the methods of the invention

WO 03/039475

PCT/US02/35824

can be used to modulate (*e.g.*, inhibit, treat, or prevent) or diagnose a disease, including, but not limited to, UI and BPH.

"Differential expression", as used herein, includes both quantitative as well as qualitative differences in the temporal and/or tissue expression pattern of a gene. Thus, a differentially expressed gene may have its expression activated or inactivated in normal versus disease conditions. The degree to which expression differs in normal versus disease or control versus experimental states need only be large enough to be visualized via standard characterization techniques, *e.g.*, quantitative PCR, Northern analysis, subtractive hybridization. The expression pattern of a differentially expressed gene may be used as part of a prognostic or diagnostic a disease, *e.g.*, UI and BPH, evaluation, or may be used in methods for identifying compounds useful for the treatment of a disease, *e.g.*, UI or BPH. In addition, a differentially expressed gene involved in a disease may represent a target gene such that modulation of the level of target gene expression or of target gene product activity will act to cure, heal, alleviate, relieve, alter, remedy, ameliorate, improve or affect a disease condition, *e.g.*, UI and/or BPH. Compounds that modulate target gene expression or activity of the target gene product can be used in the treatment of a disease. Although the genes described herein may be differentially expressed with respect to a disease, and/or their products may interact with gene products important to a disease, the genes may also be involved in mechanisms important to additional disease cell processes.

The molecules of the present invention include but are not limited to the following classifications: G protein coupled receptors (GPCRs). GPCRs of lipid mediators and ligand-gated ion channels have been implicated in increased afferent nerve activity, especially in c-fibers. Enzymes catabolizing/ metabolizing neurotransmitters, neurotransmitter/peptide hormone GPCRs, proteases/ peptidases and transporters have been shown to participate in a) decreased inhibitory control in CNS/peripheral ganglia, b) increased excitatory neurotransmission in CNS/peripheral ganglia, and c) increased sensitivity to efferent stimulation in the detrusor. Enzymes catabolizing/metabolizing cAMP/cGMP, ligand-gated ion channels, Ca^{2+}/K^{+} channels, Ser/Thr-kinases and ATPases have been implicated in myogenic regulation of bladder smooth muscle contraction. Involvement of neurotransmitter GPCRs and enzymes catabolizing/metabolizing cAMP/cGMP has been demonstrated in neurological and myogenic regulation of the storage reflex of the bladder.

Peptide hormone GPCRs, proteinases/peptidases, enzymes catabolizing/metabolizing steroids and nuclear hormone receptors have been shown to be

WO 03/039475

PCT/US02/35824

involved in the endocrine regulation of testosterone production. Receptor tyrosine kinases and Ser/Thr-kinases have been implicated in mediating the initial epithelial growth in BPH through stromal cell-derived growth factors and local factors. Peptide hormone/neurotransmitter GPCRs and transporters have been demonstrated to mediate the neurological regulation of the smooth muscle tone. Enzymes catabolizing/metabolizing cAMP/cGMP, ligand-gated ion channels, Ca²⁺/K⁺ channels, ATPases have been implicated in myogenic regulation of smooth muscle tone in the prostate.

Gene ID 313

10

The human 313 sequence (SEQ ID NO:1), (GI:665580, known also as fractalkine receptor, V28) which is approximately 3100 nucleotides long including untranslated regions, contains a predicted methionine-initiated coding sequence of about 1068 nucleotides, including the termination codon (nucleotides indicated as coding of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2). The coding sequence encodes a 355 amino acid protein (SEQ ID NO:3) (GI:407807).

As assessed by TaqMan analysis 313 mRNA shows highest expression in brain samples. 313 mRNA is also moderately expressed in BPH prostate, breast and mononuclear cells of the bone marrow. Further TaqMan data indicate that 313 mRNA is upregulated in 3 out of BPH samples versus normal human prostate samples. Expression of 313 mRNA was seen in both epithelia and stroma of the prostate, but at a relatively higher level in the stroma. Immuno histochemical data reveal expression in stromal cells surrounding glandular regions of the prostate.

The ligand for 313 is fractalkine, which is known to be expressed in epithelial and endothelial cells. In addition to its major role in leukocyte migration and adhesion, the ligand of 313, fractalkine, inhibits apoptosis in some cells in the Fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. The expression pattern of 313, the receptor for fractalkine, indicates that fractalkine acting through the 313 molecule is playing a similar role in the prostate. Agents which antagonize 313 activity would inhibit prostatic hyperplasia and be useful as therapeutics for BPH.

30

Gene ID 333

The human 333 sequence (SEQ ID NO:4), (GI: 14102645, known C-C chemokine receptor type 5 (CCR5)) which is approximately 1376 nucleotides long including

WO 03/039475

PCT/US02/35824

untranslated regions, contains a predicted methionine-initiated coding sequence of about 1059 nucleotides, including the termination codon (nucleotides indicated as coding of SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5). The coding sequence encodes a 352 amino acid protein (SEQ ID NO:6) (GI: 14102646).

5 As assessed by TaqMan analysis, 333 mRNA was upregulated in three out of four BPH samples compared to a pooled normal human prostate sample. It was also highly expressed in smooth muscle cells as well as ureter. Considering its expression pattern, agents which modulate 333 activity would be useful as therapeutics for BPH and/or UI.

10 **Gene ID 5464**

The human 5464 sequence (SEQ ID NO:7), (GI:190443), known also as prostaglandin D synthase(PGD2)) which is approximately 647 nucleotides long including untranslated regions, contains a predicted methionine-initiated coding sequence of about 573 nucleotides, including the termination codon (nucleotides indicated as coding of SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8). The coding sequence encodes a 190 amino acid protein (SEQ ID NO:9) (GI:190444).

15 As assessed by TaqMan analysis, 5464 mRNA was expressed in a majority of tissues tested with the highest levels in prostate and nervous system tissues. Further TaqMan studies have shown that 5464 mRNA is up-regulated in three out of four BPH samples compared to a pooled normal human prostate sample. Expression of 5464 mRNA in prostate stromal cells was three-fold higher than 5464 mRNA expression in the epithelial cells of the prostate.

20 Prostaglandins (PGs) in general and 5464 in particular are known molecules involved in muscle contraction. 5464 has been shown to induce contraction in different models and systems. For example, in guinea-pig lung parenchymal strips, in guinea-pig tracheal preparations, in bladder detrusor muscle and in cardiac myocytes, 5464 induces contraction. The earliest change in BPH is a stromal proliferation. This proliferation contains more smooth muscle and less elastic tissue than normal stroma. Blocking the contractile capabilities of these cellular component will improve the symptomatology of BPH. Considering the expression pattern of 5464 and its ability to induce contraction in a number of different tissues, agents that block 5464 activity would be useful therapeutics for BPH and/or UI.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

Gene ID 18817

The human 18817 sequence (SEQ ID NO:10), (GI:6166248, known also as kallikrein-like protein 5 (KLK-L5)) which is approximately 747 nucleotides long including untranslated regions, contains a predicted methionine-initiated coding sequence of about
5 747 nucleotides, including the termination codon (nucleotides indicated as coding of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11). The coding sequence encodes a 248 amino acid protein (SEQ ID NO:12) (GI:6166249).

As assessed by TaqMan analysis, 18817 mRNA was upregulated in BPH samples as compared to expression in normal human prostate. In addition it was also highly
10 expressed in salivary gland as well as prostate tumor. Considering its expression pattern, agents which modulate 18817 expression would be useful as therapeutics for BPH and/or UI.

Gene ID 33524

The human 33524 sequence (SEQ ID NO:13), (GI:15391600, known also as a phospholipase) which is approximately 840 nucleotides long including untranslated regions, contains a predicted methionine-initiated coding sequence of about 459
15 nucleotides, including the termination codon (nucleotides indicated as coding of SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14). The coding sequence encodes a 152 amino acid protein (SEQ ID NO:15) (GI:15391601).

As assessed by TaqMan analysis, 33524 mRNA was upregulated in BPH samples as compared to expression in normal human prostate. In addition 33524 mRNA was highly expressed in bladder smooth muscle, testes and ureter. Considering its expression
20 pattern, agents which modulate 18817 expression would be useful as therapeutics for BPH and/or UI.

Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections:

I. Screening Assays:

The invention provides a method (also referred to herein as a "screening assay") for
30 identifying modulators, *i.e.*, candidate or test compounds or agents (*e.g.*, peptides, peptidomimetics, small molecules (organic or inorganic) or other drugs) which bind to 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins, have a stimulatory or inhibitory effect on, for example, 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or 313, 333, 5464, 18817 or 33524

WO 03/039475

PCT/US02/35824

activity, or have a stimulatory or inhibitory effect on, for example, the expression or activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 substrate. Compounds identified using the assays described herein may be useful for treating a urological disorder.

5 These assays are designed to identify compounds that bind to a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, bind to other intracellular or extracellular proteins that interact with a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, and interfere with the interaction of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein with other intercellular or extracellular proteins. For example, in the case of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, which is a transmembrane receptor-type protein, such techniques can identify ligands for such a
10 receptor. A 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein ligand or substrate can, for example, be used to ameliorate at least one symptom of a urological disorder. Such compounds may include, but are not limited to peptides, antibodies, or small organic or inorganic compounds. Such compounds may also include other cellular proteins.

Compounds identified via assays such as those described herein may be useful, for
15 example, for treating a urological disorder. In instances whereby a urological disorder condition results from an overall lower level of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression and/or 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein in a cell or tissue, compounds that interact with the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein may include compounds which accentuate or amplify the activity of the bound 313, 333, 5464, 18817 or 33524
20 protein. Such compounds would bring about an effective increase in the level of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein activity, thus ameliorating symptoms.

In other instances, mutations within the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene may cause aberrant types or excessive amounts of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins to be made which have a deleterious effect that leads to a urological disorder. Similarly,
25 physiological conditions may cause an excessive increase in 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression leading to a urological disorder. In such cases, compounds that bind to a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein may be identified that inhibit the activity of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. Assays for testing the effectiveness of compounds identified by techniques such as those described in this section are discussed
30 herein.

In one embodiment, the invention provides assays for screening candidate or test compounds which are substrates of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or polypeptide or biologically active portion thereof. In another embodiment, the invention provides assays for screening candidate or test compounds which bind to or modulate the

WO 03/039475

PCT/US02/35824

activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or polypeptide or biologically active portion thereof. The test compounds of the present invention can be obtained using any of the numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; 5 synthetic library methods requiring deconvolution; the 'one-bead one-compound' library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to peptide libraries, while the other four approaches are applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

10 Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; and in Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

15 Libraries of compounds may be presented in solution (*e.g.*, Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), or on beads (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacteria (Ladner USP 5,223,409), spores (Ladner USP 409), plasmids (Cull *et al.* (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) or on phage (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390); (Devlin (1990) *Science* 249:404-406); (Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310); (Ladner *supra.*).

In one embodiment, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or biologically active portion thereof is 25 contacted with a test compound and the ability of the test compound to modulate 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity is determined. Determining the ability of the test compound to modulate 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity can be accomplished by monitoring, for example, intracellular calcium, IP₃, cAMP, or diacylglycerol concentration, the phosphorylation profile of intracellular proteins, cell proliferation and/or migration, gene 30 expression of, for example, cell surface adhesion molecules or genes associated with UI and/r BPH, or the activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -regulated transcription factor. The cell can be of mammalian origin, *e.g.*, a neural cell. In one embodiment, compounds that interact with a receptor domain can be screened for their ability to function as ligands, *i.e.*, to bind to the receptor and modulate a signal transduction

WO 03/039475

PCT/US02/35824

pathway. Identification of ligands, and measuring the activity of the ligand-receptor complex, leads to the identification of modulators (*e.g.*, antagonists) of this interaction. Such modulators may be useful in the treatment of a urological disorder.

The ability of the test compound to modulate 313, 333, 5464, 18817 or 33524 binding to a substrate or to bind to 313, 333, 5464, 18817 or 33524 can also be determined. Determining the ability of the test compound to modulate 313, 333, 5464, 18817 or 33524 binding to a substrate can be accomplished, for example, by coupling the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 substrate with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 substrate to 313, 333, 5464, 18817 or 33524 can be determined by detecting the labeled 313, 333, 5464, 18817 or 33524 substrate in a complex. 313, 333, 5464, 18817 or 33524 could also be coupled with a radioisotope or enzymatic label to monitor the ability of a test compound to modulate 313, 333, 5464, 18817 or 33524 binding to a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 substrate in a complex. Determining the ability of the test compound to bind 313, 333, 5464, 18817 or 33524 can be accomplished, for example, by coupling the compound with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the compound to 313, 333, 5464, 18817 or 33524 can be determined by detecting the labeled 313, 333, 5464, 18817 or 33524 compound in a complex. For example, compounds (*e.g.*, 313, 333, 5464, 18817 or 33524 ligands or substrates) can be labeled with ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , or ^3H , either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemmission or by scintillation counting. Compounds can further be enzymatically labeled with, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase, and the enzymatic label detected by determination of conversion of an appropriate substrate to product.

It is also within the scope of this invention to determine the ability of a compound (*e.g.*, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 ligand or substrate) to interact with 313, 333, 5464, 18817 or 33524 without the labeling of any of the interactants. For example, a microphysiometer can be used to detect the interaction of a compound with 313, 333, 5464, 18817 or 33524 without the labeling of either the compound or the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 (McConnell, H. M. *et al.* (1992) *Science* 257:1906-1912. As used herein, a "microphysiometer" (*e.g.*, Cytosensor) is an analytical instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a compound and 313, 333, 5464, 18817 or 33524.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

In another embodiment, an assay is a cell-based assay comprising contacting a cell expressing a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 target molecule (*e.g.*, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 substrate) with a test compound and determining the ability of the test compound to modulate (*e.g.*, stimulate or inhibit) the activity of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 target molecule. Determining the ability of the test compound to modulate the activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 target molecule can be accomplished, for example, by determining the ability of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein to bind to or interact with the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 target molecule.

Determining the ability of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or a biologically active fragment thereof, to bind to or interact with a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 target molecule can be accomplished by one of the methods described above for determining direct binding. In a preferred embodiment, determining the ability of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein to bind to or interact with a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 target molecule can be accomplished by determining the activity of the target molecule. For example, the activity of the target molecule can be determined by detecting induction of a cellular second messenger of the target (*i.e.*, intracellular Ca^{2+} , diacylglycerol, IP_3 , cAMP), detecting catalytic/enzymatic activity of the target on an appropriate substrate, detecting the induction of a reporter gene (comprising a target-responsive regulatory element operatively linked to a nucleic acid encoding a detectable marker, *e.g.*, luciferase), or detecting a target-regulated cellular response (*e.g.*, gene expression).

In yet another embodiment, an assay of the present invention is a cell-free assay in which a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or biologically active portion thereof, is contacted with a test compound and the ability of the test compound to bind to the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or biologically active portion thereof is determined. Preferred biologically active portions of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins to be used in assays of the present invention include fragments which participate in interactions with non-313, 333, 5464, 18817 or 33524 molecules, *e.g.*, fragments with high surface probability scores. Binding of the test compound to the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein can be determined either directly or indirectly as described above. In a preferred embodiment, the assay includes contacting the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or biologically active portion thereof with a known compound which binds 313, 333, 5464, 18817 or 33524 to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with a 313, 333,

WO 03/039475

PCT/US02/35824

5464, 18817 or 33524 protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein comprises determining the ability of the test compound to preferentially bind to 313, 333, 5464, 18817 or 33524 or biologically active portion thereof as compared to the known compound. Compounds that
5 modulate the interaction of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 with a known target protein may be useful in regulating the activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, especially a mutant 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein.

In another embodiment, the assay is a cell-free assay in which a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or biologically active portion thereof is contacted with a test
10 compound and the ability of the test compound to modulate (*e.g.*, stimulate or inhibit) the activity of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or biologically active portion thereof is determined. Determining the ability of the test compound to modulate the activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein can be accomplished, for example, by determining the ability of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein to bind to a 313,
15 333, 5464, 18817 or 33524 target molecule by one of the methods described above for determining direct binding. Determining the ability of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein to bind to a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 target molecule can also be accomplished using a technology such as real-time Biomolecular Interaction Analysis (BIA) (Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345 and Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). As used herein, "BIA" is a technology for
20 studying biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants (*e.g.*, BIAcore). Changes in the optical phenomenon of surface plasmon resonance (SPR) can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

In another embodiment, determining the ability of the test compound to modulate
25 the activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein can be accomplished by determining the ability of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein to further modulate the activity of a downstream effector of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 target molecule. For example, the activity of the effector molecule on an appropriate target can be determined or the binding of the effector to an appropriate target can be determined as
30 previously described.

In yet another embodiment, the cell-free assay involves contacting a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or biologically active portion thereof with a known compound which binds the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of

WO 03/039475

PCT/US02/35824

the test compound to interact with the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein comprises determining the ability of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein to preferentially bind to or modulate the activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 target molecule.

In more than one embodiment of the above assay methods of the present invention, it may be desirable to immobilize either 313, 333, 5464, 18817 or 33524 or its target molecule to facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of one or both of the proteins, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of a test compound to a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, or interaction of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein with a target molecule in the presence and absence of a candidate compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtitre plates, test tubes, and micro-centrifuge tubes. In one embodiment, a fusion protein can be provided which adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, glutathione-S-transferase/313, 333, 5464, 18817 or 33524 fusion proteins or glutathione-S-transferase/target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione derivatized microtitre plates, which are then combined with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed target protein or 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, and the mixture incubated under conditions conducive to complex formation (*e.g.*, at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtitre plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix immobilized in the case of beads, complex determined either directly or indirectly, for example, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 binding or activity determined using standard techniques.

Other techniques for immobilizing proteins on matrices can also be used in the screening assays of the invention. For example, either a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 target molecule can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or target molecules can be prepared from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques known in the art (*e.g.*, biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, IL), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies reactive with 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or target

WO 03/039475

PCT/US02/35824

molecules but which do not interfere with binding of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein to its target molecule can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above
5 for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or target molecule, as well as enzyme-linked assays which rely on detecting an enzymatic activity associated with the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or target molecule.

In another embodiment, modulators of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression
10 are identified in a method wherein a cell is contacted with a candidate compound and the expression of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA or protein in the cell is determined. The level of expression of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA or protein in the presence of the candidate compound is compared to the level of expression of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA or protein in the absence of the candidate compound. The
15 candidate compound can then be identified as a modulator of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression based on this comparison. For example, when expression of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA or protein is greater (statistically significantly greater) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as a stimulator of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA or protein expression.
20 Alternatively, when expression of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA or protein is less (statistically significantly less) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as an inhibitor of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA or protein expression. The level of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA or protein expression in the cells can be determined by methods described herein for
25 detecting 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA or protein.

In yet another aspect of the invention, the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, e.g., U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos *et al.* (1993) *Cell* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchi *et al.*
30 (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; and Brent WO94/10300), to identify other proteins, which bind to or interact with 313, 333, 5464, 18817 or 33524 ("313, 333, 5464, 18817 or 33524-binding proteins" or "313, 333, 5464, 18817 or 33524-bp") and are involved in 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity. Such 313, 333, 5464, 18817 or 33524-binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the 313, 333, 5464, 18817 or

WO 03/039475

PCT/US02/35824

33524 proteins or 313, 333, 5464, 18817 or 33524 targets as, for example, downstream elements of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -mediated signaling pathway. Alternatively, such 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -binding proteins are likely to be 313, 333, 5464, 18817 or 33524 inhibitors.

5 The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. In one construct, the gene that codes for a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (*e.g.*, GAL-4). In the other construct, a DNA
10 sequence, from a library of DNA sequences, that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") is fused to a gene that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact, *in vivo*, forming a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This
15 proximity allows transcription of a reporter gene (*e.g.*, LacZ) which is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the cloned gene which encodes the protein which interacts with the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein.

20 In another aspect, the invention pertains to a combination of two or more of the assays described herein. For example, a modulating agent can be identified using a cell-based or a cell free assay, and the ability of the agent to modulate the activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein can be confirmed *in vivo*, *e.g.*, in an animal such as an animal model for a urological disorder, as described herein.

25 This invention further pertains to novel agents identified by the above-described screening assays. Accordingly, it is within the scope of this invention to further use an agent identified as described herein in an appropriate animal model. For example, an agent identified as described herein (*e.g.*, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulating agent, an antisense 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid molecule, a 313, 333,
30 5464, 18817 or 33524 -specific antibody, or a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -binding partner) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such an agent. Alternatively, an agent identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of action of such an agent.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

Furthermore, this invention pertains to uses of novel agents identified by the above-described screening assays for treatments as described herein.

Any of the compounds, including but not limited to compounds such as those identified in the foregoing assay systems, may be tested for the ability to ameliorate at least one symptom of a urological disorder. Cell-based and animal model-based assays for the identification of compounds exhibiting such an ability to ameliorate at least one symptom of a urological disorder are described herein.

In addition, animal-based models of a urological disorder, such as those described herein, may be used to identify compounds capable of treating a urological disorder. Such animal models may be used as test substrates for the identification of drugs, pharmaceuticals, therapies, and interventions which may be effective in treating a urological disorder. For example, animal models may be exposed to a compound, suspected of exhibiting an ability to treat a urological disorder, at a sufficient concentration and for a time sufficient to elicit such an amelioration of at least one symptom of a urological disorder in the exposed animals. The response of the animals to the exposure may be monitored by assessing the reversal of the symptoms of a urological disorder before and after treatment.

With regard to intervention, any treatments which reverse any aspect of aurological disorder (i.e. have an effect on UI and/or BPH) should be considered as candidates for a human urological disorder therapeutic intervention. Dosages of test agents may be determined by deriving dose-response curves.

Additionally, gene expression patterns may be utilized to assess the ability of a compound to ameliorate at least one symptom of a urological disorder. For example, the expression pattern of one or more genes may form part of a "gene expression profile" or "transcriptional profile" which may be then be used in such an assessment. "Gene expression profile" or "transcriptional profile", as used herein, includes the pattern of mRNA expression obtained for a given tissue or cell type under a given set of conditions. Gene expression profiles may be generated, for example, by utilizing a differential display procedure, Northern analysis and/or RT-PCR. In one embodiment, 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene sequences may be used as probes and/or PCR primers for the generation and corroboration of such gene expression profiles.

Gene expression profiles may be characterized for known states, either cardiovascular disease or normal, within the cell- and/or animal-based model systems. Subsequently, these known gene expression profiles may be compared to ascertain the

WO 03/039475

PCT/US02/35824

effect a test compound has to modify such gene expression profiles, and to cause the profile to more closely resemble that of a more desirable profile.

For example, administration of a compound may cause the gene expression profile of a urological disorder disease model system to more closely resemble the control system.

- 5 Administration of a compound may, alternatively, cause the gene expression profile of a control system to begin to mimic a urological disorder or a urological disorder disease state. Such a compound may, for example, be used in further characterizing the compound of interest, or may be used in the generation of additional animal models.

10 II. Cell- and Animal-Based Model Systems

- Described herein are cell- and animal-based systems which act as models for urological disorder. These systems may be used in a variety of applications. For example, the cell- and animal-based model systems may be used to further characterize differentially expressed genes associated with a urological disorder, *e.g.*, 313, 333, 5464, 18817 or
15 33524. In addition, animal- and cell-based assays may be used as part of screening strategies designed to identify compounds which are capable of ameliorating at least one symptom of a urological disorder, as described, below. Thus, the animal- and cell-based models may be used to identify drugs, pharmaceuticals, therapies and interventions which may be effective in treating a urological disorder. Furthermore, such animal models may
20 be used to determine the LD50 and the ED50 in animal subjects, and such data can be used to determine the *in vivo* efficacy of potential urological disorder treatments.

A. Animal-Based Systems

- Animal-based model systems of urological disorder may include, but are not
25 limited to, non-recombinant and engineered transgenic animals.

Non-recombinant animal models for urological disorder may include, for example, genetic models.

- Additionally, animal models exhibiting a urological disorder may be engineered by using, for example, 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene sequences described above, in
30 conjunction with techniques for producing transgenic animals that are well known to those of skill in the art. For example, 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene sequences may be introduced into, and overexpressed in, the genome of the animal of interest, or, if endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene sequences are present, they may either

WO 03/039475

PCT/US02/35824

be overexpressed or, alternatively, be disrupted in order to underexpress or inactivate 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression.

The host cells of the invention can also be used to produce non-human transgenic animals. For example, in one embodiment, a host cell of the invention is a fertilized oocyte or an embryonic stem cell into which 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -coding sequences have been introduced. Such host cells can then be used to create non-human transgenic animals in which exogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 sequences have been introduced into their genome or homologous recombinant animals in which endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 sequences have been altered. Such animals are useful for studying the function and/or activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 and for identifying and/or evaluating modulators of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity. As used herein, a "transgenic animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a rodent such as a rat or mouse, in which one or more of the cells of the animal includes a transgene. Other examples of transgenic animals include non-human primates, sheep, dogs, cows, goats, chickens, amphibians, and the like. A transgene is exogenous DNA which is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops and which remains in the genome of the mature animal, thereby directing the expression of an encoded gene product in one or more cell types or tissues of the transgenic animal. As used herein, a "homologous recombinant animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a mouse, in which an endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene has been altered by homologous recombination between the endogenous gene and an exogenous DNA molecule introduced into a cell of the animal, *e.g.*, an embryonic cell of the animal, prior to development of the animal.

A transgenic animal used in the methods of the invention can be created by introducing a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -encoding nucleic acid into the male pronuclei of a fertilized oocyte, *e.g.*, by microinjection, retroviral infection, and allowing the oocyte to develop in a pseudopregnant female foster animal. The 313, 333, 5464, 18817 or 33524 cDNA sequence can be introduced as a transgene into the genome of a non-human animal. Alternatively, a nonhuman homologue of a human 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene, such as a mouse or rat 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene, can be used as a transgene. Alternatively, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene homologue, such as another 313, 333, 5464, 18817 or 33524 family member, can be isolated based on hybridization to the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 cDNA sequences and used as a

WO 03/039475

PCT/US02/35824

transgene. Intronic sequences and polyadenylation signals can also be included in the transgene to increase the efficiency of expression of the transgene. A tissue-specific regulatory sequence(s) can be operably linked to a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 transgene to direct expression of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein to particular
5 cells. Methods for generating transgenic animals via embryo manipulation and microinjection, particularly animals such as mice, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866 and 4,870,009, both by Leder *et al.*, U.S. Patent No. 4,873,191 by Wagner *et al.* and in Hogan, B., *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Similar
10 methods are used for production of other transgenic animals. A transgenic founder animal can be identified based upon the presence of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 transgene in its genome and/or expression of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA in tissues or cells of the animals. A transgenic founder animal can then be used to breed additional animals carrying the transgene. Moreover, transgenic animals carrying a transgene
15 encoding a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein can further be bred to other transgenic animals carrying other transgenes.

To create a homologous recombinant animal, a vector is prepared which contains at least a portion of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene into which a deletion, addition or substitution has been introduced to thereby alter, *e.g.*, functionally disrupt, the 313, 333,
20 5464, 18817 or 33524 gene. The 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene can be a human gene but more preferably, is a non-human homologue of a human 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene. For example, a rat 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene can be used to construct a homologous recombination nucleic acid molecule, *e.g.*, a vector, suitable for altering an endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene in the mouse genome. In a
25 preferred embodiment, the homologous recombination nucleic acid molecule is designed such that, upon homologous recombination, the endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene is functionally disrupted (*i.e.*, no longer encodes a functional protein; also referred to as a "knock out" vector). Alternatively, the homologous recombination nucleic acid molecule can be designed such that, upon homologous recombination, the endogenous
30 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene is mutated or otherwise altered but still encodes functional protein (*e.g.*, the upstream regulatory region can be altered to thereby alter the expression of the endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein). In the homologous recombination nucleic acid molecule, the altered portion of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene is flanked at its 5' and 3' ends by additional nucleic acid

WO 03/039475

PCT/US02/35824

sequence of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene to allow for homologous recombination to occur between the exogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene carried by the homologous recombination nucleic acid molecule and an endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene in a cell. *e.g.*, an embryonic stem cell. The additional
5 flanking 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid sequence is of sufficient length for successful homologous recombination with the endogenous gene. Typically, several kilobases of flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the homologous recombination nucleic acid molecule (see, *e.g.*, Thomas, K.R. and Capecchi, M. R. (1987) *Cell* 51:503 for a description of homologous recombination vectors). The homologous
10 recombination nucleic acid molecule is introduced into a cell, *e.g.*, an embryonic stem cell line (*e.g.*, by electroporation) and cells in which the introduced 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene has homologously recombined with the endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene are selected (see *e.g.*, Li, E. *et al.* (1992) *Cell* 69:915). The selected cells can then be injected into a blastocyst of an animal (*e.g.*, a mouse) to form aggregation chimeras
15 (see *e.g.*, Bradley, A. in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152). A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be used to breed animals in which all cells of the animal contain the
20 homologously recombined DNA by germline transmission of the transgene. Methods for constructing homologous recombination nucleic acid molecules, *e.g.*, vectors, or homologous recombinant animals are described further in Bradley, A. (1991) *Current Opinion in Biotechnology* 2:823-829 and in PCT International Publication Nos.: WO 90/11354 by Le Mouellec *et al.*; WO 91/01140 by Smithies *et al.*; WO 92/0968 by Zijlstra
25 *et al.*; and WO 93/04169 by Berns *et al.*

In another embodiment, transgenic non-human animals for use in the methods of the invention can be produced which contain selected systems which allow for regulated expression of the transgene. One example of such a system is the *cre/loxP* recombinase system of bacteriophage P1. For a description of the *cre/loxP* recombinase system, see,
30 *e.g.*, Lakso *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6232-6236. Another example of a recombinase system is the FLP recombinase system of *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman *et al.* (1991) *Science* 251:1351-1355. If a *cre/loxP* recombinase system is used to regulate expression of the transgene, animals containing transgenes encoding both the *Cre* recombinase and a selected protein are required. Such animals can be provided

WO 03/039475

PCT/US02/35824

through the construction of "double" transgenic animals, *e.g.*, by mating two transgenic animals, one containing a transgene encoding a selected protein and the other containing a transgene encoding a recombinase.

Clones of the non-human transgenic animals described herein can also be produced according to the methods described in Wilmut, I. *et al.* (1997) *Nature* 385:810-813 and PCT International Publication Nos. WO 97/07668 and WO 97/07669. In brief, a cell, *e.g.*, a somatic cell, from the transgenic animal can be isolated and induced to exit the growth cycle and enter G₀ phase. The quiescent cell can then be fused, *e.g.*, through the use of electrical pulses, to an enucleated oocyte from an animal of the same species from which the quiescent cell is isolated. The reconstructed oocyte is then cultured such that it develops to morula or blastocyte and then transferred to pseudopregnant female foster animal. The offspring borne of this female foster animal will be a clone of the animal from which the cell, *e.g.*, the somatic cell, is isolated.

The 313, 333, 5464, 18817 or 33524 transgenic animals that express 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA or a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 peptide (detected immunocytochemically, using antibodies directed against 313, 333, 5464, 18817 or 33524 epitopes) at easily detectable levels should then be further evaluated to identify those animals which display a characteristic urological disorder.

20 B. Cell-Based Systems

Cells that contain and express 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene sequences which encode a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, and, further, exhibit cellular phenotypes associated with BPH and/or UI, may be used to identify compounds that exhibit an effect on a urological disorder. Such cells may include non-recombinant monocyte cell lines, such as U937 (ATCC# CRL-1593), THP-1 (ATCC# TIB-202), and P388D1 (ATCC# TIB-63); endothelial cells such as human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), human microvascular endothelial cells (HMVEC), and bovine aortic endothelial cells (BAECs); as well as generic mammalian cell lines such as HeLa cells and COS cells, *e.g.*, COS-7 (ATCC# CRL-1651), prostate and bladder cell lines. Further, such cells may include recombinant, transgenic cell lines. For example, the urological disorder animal models of the invention, discussed above, may be used to generate cell lines, containing one or more cell types involved in BPH and/or UI, that can be used as cell culture models for this disorder. While primary cultures derived from the urological disorder model transgenic animals of the invention may be utilized, the generation of

WO 03/039475

PCT/US02/35824

continuous cell lines is preferred. For examples of techniques which may be used to derive a continuous cell line from the transgenic animals, see Small *et al.*, (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:642-648.

Alternatively, cells of a cell type known to be involved in BPH and/or UI may be transfected with sequences capable of increasing or decreasing the amount of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression within the cell. For example, 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene sequences may be introduced into, and overexpressed in, the genome of the cell of interest, or, if endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene sequences are present, they may be either overexpressed or, alternatively disrupted in order to underexpress or inactivate 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression.

In order to overexpress a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene, the coding portion of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene may be ligated to a regulatory sequence which is capable of driving gene expression in the cell type of interest, *e.g.*, an endothelial cell. Such regulatory regions will be well known to those of skill in the art, and may be utilized in the absence of undue experimentation. Recombinant methods for expressing target genes are described above.

For underexpression of an endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene sequence, such a sequence may be isolated and engineered such that when reintroduced into the genome of the cell type of interest, the endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 alleles will be inactivated. Preferably, the engineered 313, 333, 5464, 18817 or 33524 sequence is introduced via gene targeting such that the endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 sequence is disrupted upon integration of the engineered 313, 333, 5464, 18817 or 33524 sequence into the cell's genome. Transfection of host cells with 313, 333, 5464, 18817 or 33524 genes is discussed, above.

Cells treated with compounds or transfected with 313, 333, 5464, 18817 or 33524 genes can be examined for phenotypes associated with BPH and/or UI.

Transfection of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid may be accomplished by using standard techniques (described in, for example, Ausubel (1989) *supra*). Transfected cells should be evaluated for the presence of the recombinant 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene sequences, for expression and accumulation of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA, and for the presence of recombinant 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein production. In instances wherein a decrease in 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression is desired, standard techniques may be used to demonstrate whether

WO 03/039475

PCT/US02/35824

a decrease in endogenous 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression and/or in 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein production is achieved.

III. Predictive Medicine:

5 The present invention also pertains to the field of predictive medicine in which diagnostic assays, prognostic assays, and monitoring clinical trials are used for prognostic (predictive) purposes to thereby treat an individual prophylactically. Accordingly, one aspect of the present invention relates to diagnostic assays for determining 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein and/or nucleic acid expression as well as 313, 333, 5464, 18817 or 10 33524 activity, in the context of a biological sample (*e.g.*, blood, serum, cells, *e.g.*, endothelial cells, or tissue, *e.g.*, vascular tissue, bladder tissue or prostate tissue) to thereby determine whether an individual is afflicted with a predisposition or is experiencing a urological disorder. The invention also provides for prognostic (or predictive) assays for determining whether an individual is at risk of developing a urological disorder. For 15 example, mutations in a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene can be assayed for in a biological sample. Such assays can be used for prognostic or predictive purpose to thereby prophylactically treat an individual prior to the onset of a urological disorder.

Another aspect of the invention pertains to monitoring the influence of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulators (*e.g.*, anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibodies or 20 313, 333, 5464, 18817 or 33524 ribozymes) on the expression or activity of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 in clinical trials.

These and other agents are described in further detail in the following sections.

A. Diagnostic Assays

25 To determine whether a subject is afflicted with a disease, a biological sample may be obtained from a subject and the biological sample may be contacted with a compound or an agent capable of detecting a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA or genomic DNA) that encodes a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, in the biological sample. A preferred agent for detecting 313, 333, 5464, 18817 or 33524 30 mRNA or genomic DNA is a labeled nucleic acid probe capable of hybridizing to 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA or genomic DNA. The nucleic acid probe can be, for example, the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid set forth in SEQ ID NO:1, 4, 7, 10 or 13 or a portion thereof, such as an oligonucleotide of at least 15, 20, 25, 30, 25, 40, 45, 50, 100, 250 or 500 nucleotides in length and sufficient to specifically hybridize under

WO 03/039475

PCT/US02/35824

stringent conditions to 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the diagnostic assays of the invention are described herein.

A preferred agent for detecting 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein in a sample is an antibody capable of binding to 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, preferably an antibody with a detectable label. Antibodies can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof (*e.g.*, Fab or F(ab')₂) can be used. The term "labeled", with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (*i.e.*, physically linking) a detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with another reagent that is directly labeled. Examples of indirect labeling include detection of a primary antibody using a fluorescently labeled secondary antibody and end-labeling of a DNA probe with biotin such that it can be detected with fluorescently labeled streptavidin.

The term "biological sample" is intended to include tissues, cells, and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells, and fluids present within a subject. That is, the detection method of the invention can be used to detect 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA include Northern hybridizations and *in situ* hybridizations. *In vitro* techniques for detection of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations and immunofluorescence. *In vitro* techniques for detection of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 genomic DNA include Southern hybridizations. Furthermore, *in vivo* techniques for detection of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein include introducing into a subject a labeled anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.

In another embodiment, the methods further involve obtaining a control biological sample from a control subject, contacting the control sample with a compound or agent capable of detecting 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, mRNA, or genomic DNA, such that the presence of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, mRNA or genomic DNA is detected in the biological sample, and comparing the presence of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, mRNA or genomic DNA in the test sample.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

B. Prognostic Assays

The present invention further pertains to methods for identifying subjects having or at risk of developing a disease associated with aberrant 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or activity.

5 As used herein, the term "aberrant" includes a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or activity which deviates from the wild type 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or activity. Aberrant expression or activity includes increased or decreased expression or activity, as well as expression or activity which does not follow the wild type developmental pattern of expression or the subcellular pattern of expression. For example,
10 aberrant 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or activity is intended to include the cases in which a mutation in the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene causes the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene to be under-expressed or over-expressed and situations in which such mutations result in a non-functional 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or a protein which does not function in a wild-type fashion, e.g., a protein which does not
15 interact with a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 substrate, or one which interacts with a non-313, 333, 5464, 18817 or 33524 substrate.

The assays described herein, such as the preceding diagnostic assays or the following assays, can be used to identify a subject having or at risk of developing a disease. A biological sample may be obtained from a subject and tested for the presence or
20 absence of a genetic alteration. For example, such genetic alterations can be detected by ascertaining the existence of at least one of 1) a deletion of one or more nucleotides from a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene, 2) an addition of one or more nucleotides to a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene, 3) a substitution of one or more nucleotides of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene, 4) a chromosomal rearrangement of a 313, 333, 5464,
25 18817 or 33524 gene, 5) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene, 6) aberrant modification of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene, such as of the methylation pattern of the genomic DNA, 7) the presence of a non-wild type splicing pattern of a messenger RNA transcript of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene, 8) a non-wild type level of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -protein, 9)
30 allelic loss of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene, and 10) inappropriate post-translational modification of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -protein.

As described herein, there are a large number of assays known in the art which can be used for detecting genetic alterations in a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene. For example, a genetic alteration in a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene may be detected

WO 03/039475

PCT/US02/35824

using a probe/primer in a polymerase chain reaction (PCR) (see, e.g., U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202), such as anchor PCR or RACE PCR, or, alternatively, in a ligation chain reaction (LCR) (see, e.g., Landegran *et al.* (1988) *Science* 241:1077-1080; and Nakazawa *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364), the latter of which
5 can be particularly useful for detecting point mutations in a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene (see Abravaya *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675-682). This method includes collecting a biological sample from a subject, isolating nucleic acid (e.g., genomic DNA, mRNA or both) from the sample, contacting the nucleic acid sample with one or
10 more primers which specifically hybridize to a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene under conditions such that hybridization and amplification of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene (if present) occurs, and detecting the presence or absence of an amplification product, or detecting the size of the amplification product and comparing the length to a control sample. It is anticipated that PCR and/or LCR may be desirable to use as a preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations
15 described herein.

Alternative amplification methods include: self sustained sequence replication (Guatelli, J.C. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), transcriptional amplification system (Kwoh, D.Y. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi, P.M. *et al.* (1988) *Bio-Technology* 6:1197), or any other
20 nucleic acid amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art. These detection schemes are especially useful for the detection of nucleic acid molecules if such molecules are present in very low numbers.

In an alternative embodiment, mutations in a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene
25 from a biological sample can be identified by alterations in restriction enzyme cleavage patterns. For example, sample and control DNA is isolated, amplified (optionally), digested with one or more restriction endonucleases, and fragment length sizes are determined by gel electrophoresis and compared. Differences in fragment length sizes between sample and control DNA indicates mutations in the sample DNA. Moreover, the
30 use of sequence specific ribozymes (see, for example, U.S. Patent No. 5,498,531) can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme cleavage site.

In other embodiments, genetic mutations in 313, 333, 5464, 18817 or 33524 can be identified by hybridizing biological sample derived and control nucleic acids, e.g., DNA or

WO 03/039475

PCT/US02/35824

RNA, to high density arrays containing hundreds or thousands of oligonucleotide probes (Cronin, M.T. *et al.* (1996) *Human Mutation* 7:244-255; Kozal, M.J. *et al.* (1996) *Nature Medicine* 2:753-759). For example, genetic mutations in 313, 333, 5464, 18817 or 33524 can be identified in two dimensional arrays containing light-generated DNA probes as described in Cronin, M.T. *et al.* (1996) *supra*. Briefly, a first hybridization array of probes can be used to scan through long stretches of DNA in a sample and control to identify base changes between the sequences by making linear arrays of sequential, overlapping probes. This step allows for the identification of point mutations. This step is followed by a second hybridization array that allows for the characterization of specific mutations by using smaller, specialized probe arrays complementary to all variants or mutations detected. Each mutation array is composed of parallel probe sets, one complementary to the wild-type gene and the other complementary to the mutant gene.

In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene in a biological sample and detect mutations by comparing the sequence of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 in the biological sample with the corresponding wild-type (control) sequence. Examples of sequencing reactions include those based on techniques developed by Maxam and Gilbert (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560 or Sanger (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463). It is also contemplated that any of a variety of automated sequencing procedures can be utilized when performing the diagnostic assays (Naeve, C. W. (1995) *Biotechniques* 19:448-53), including sequencing by mass spectrometry (see, e.g., PCT International Publication No. WO 94/16101; Cohen *et al.* (1996) *Adv. Chromatogr.* 36:127-162; and Griffin *et al.* (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159).

Other methods for detecting mutations in the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene include methods in which protection from cleavage agents is used to detect mismatched bases in RNA/RNA or RNA/DNA heteroduplexes (Myers *et al.* (1985) *Science* 230:1242). In general, the art technique of "mismatch cleavage" starts by providing heteroduplexes formed by hybridizing (labeled) RNA or DNA containing the wild-type 313, 333, 5464, 18817 or 33524 sequence with potentially mutant RNA or DNA obtained from a tissue sample. The double-stranded duplexes are treated with an agent which cleaves single-stranded regions of the duplex such as which will exist due to basepair mismatches between the control and sample strands. For instance, RNA/DNA duplexes can be treated with RNase and DNA/DNA hybrids treated with S1 nuclease to enzymatically digest the

WO 03/039475

PCT/US02/35824

mismatched regions. In other embodiments, either DNA/DNA or RNA/DNA duplexes can be treated with hydroxylamine or osmium tetroxide and with piperidine in order to digest mismatched regions. After digestion of the mismatched regions, the resulting material is then separated by size on denaturing polyacrylamide gels to determine the site of mutation.

5 See, for example, Cotton *et al.* (1988) *Proc. Natl Acad Sci USA* 85:4397 and Saleeba *et al.* (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295. In a preferred embodiment, the control DNA or RNA can be labeled for detection.

In still another embodiment, the mismatch cleavage reaction employs one or more proteins that recognize mismatched base pairs in double-stranded DNA (so called "DNA mismatch repair" enzymes) in defined systems for detecting and mapping point mutations
10 in 313, 333, 5464, 18817 or 33524 cDNAs obtained from samples of cells. For example, the mutY enzyme of *E. coli* cleaves A at G/A mismatches and the thymidine DNA glycosylase from HeLa cells cleaves T at G/T mismatches (Hsu *et al.* (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662). According to an exemplary embodiment, a probe based
15 on a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 sequence, *e.g.*, a wild-type 313, 333, 5464, 18817 or 33524 sequence, is hybridized to a cDNA or other DNA product from a test cell(s). The duplex is treated with a DNA mismatch repair enzyme, and the cleavage products, if any, can be detected from electrophoresis protocols or the like. See, for example, U.S. Patent No. 5,459,039.

20 In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility will be used to identify mutations in 313, 333, 5464, 18817 or 33524 genes. For example, single strand conformation polymorphism (SSCP) may be used to detect differences in electrophoretic mobility between mutant and wild type nucleic acids (Orita *et al.* (1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA*: 86:2766; see also Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144 and Hayashi (1992)
25 *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Single-stranded DNA fragments of sample and control 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acids will be denatured and allowed to renature. The secondary structure of single-stranded nucleic acids varies according to sequence, the resulting alteration in electrophoretic mobility enables the detection of even a single base change. The DNA fragments may be labeled or detected with labeled probes. The
30 sensitivity of the assay may be enhanced by using RNA (rather than DNA), in which the secondary structure is more sensitive to a change in sequence. In a preferred embodiment, the subject method utilizes heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility (Keen *et al.* (1991) *Trends Genet* 7:5).

WO 03/039475

PCT/US02/35824

In yet another embodiment the movement of mutant or wild-type fragments in polyacrylamide gels containing a gradient of denaturant is assayed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495). When DGGE is used as the method of analysis, DNA will be modified to ensure that it does not completely denature, for example by adding a GC clamp of approximately 40 bp of high-melting GC-rich DNA by PCR. In a further embodiment, a temperature gradient is used in place of a denaturing gradient to identify differences in the mobility of control and sample DNA (Rosenbaum and Reissner (1987) *Biophys Chem* 265:12753).

Examples of other techniques for detecting point mutations include, but are not limited to, selective oligonucleotide hybridization, selective amplification, or selective primer extension. For example, oligonucleotide primers may be prepared in which the known mutation is placed centrally and then hybridized to target DNA under conditions which permit hybridization only if a perfect match is found (Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324:163); Saiki *et al.* (1989) *Proc. Natl Acad. Sci USA* 86:6230). Such allele specific oligonucleotides are hybridized to PCR amplified target DNA or a number of different mutations when the oligonucleotides are attached to the hybridizing membrane and hybridized with labeled target DNA.

Alternatively, allele specific amplification technology which depends on selective PCR amplification may be used in conjunction with the instant invention. Oligonucleotides used as primers for specific amplification may carry the mutation of interest in the center of the molecule (so that amplification depends on differential hybridization) (Gibbs *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448) or at the extreme 3' end of one primer where, under appropriate conditions, mismatch can prevent, or reduce polymerase extension (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238). In addition it may be desirable to introduce a novel restriction site in the region of the mutation to create cleavage-based detection (Gasparini *et al.* (1992) *Mol. Cell Probes* 6:1). It is anticipated that in certain embodiments amplification may also be performed using Taq ligase for amplification (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:189). In such cases, ligation will occur only if there is a perfect match at the 3' end of the 5' sequence making it possible to detect the presence of a known mutation at a specific site by looking for the presence or absence of amplification.

Furthermore, the prognostic assays described herein can be used to determine whether a subject can be administered a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator (*e.g.*,

WO 03/039475

PCT/US02/35824

an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, or small molecule) to effectively treat a disease.

C. Monitoring of Effects During Clinical Trials

5 The present invention further provides methods for determining the effectiveness of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator (e.g., a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator identified herein) in treating a disease. For example, the effectiveness of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator in increasing 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression, protein levels, or in upregulating 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression, protein levels, or downregulated 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity. Alternatively, the effectiveness of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator in decreasing 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression, protein levels, or in downregulating 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression, protein levels, or 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity. In such clinical trials, the expression or activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene, and preferably, other genes that have been implicated in nociception can be used as a "read out" or marker of the phenotype of a particular cell.

20 For example, and not by way of limitation, genes, including 313, 333, 5464, 18817 or 33524, that are modulated in cells by treatment with an agent which modulates 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity (e.g., identified in a screening assay as described herein) can be identified. Thus, to study the effect of agents which modulate 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity on subjects suffering from a urological disorder in, for example, a clinical trial, cells can be isolated and RNA prepared and analyzed for the levels of expression of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 and other genes implicated in the urological disorder. The levels of gene expression (e.g., a gene expression pattern) can be quantified by Northern blot analysis or RT-PCR, as described herein, or alternatively by measuring the amount of protein produced, by one of the methods described herein, or by measuring the levels of activity of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 or other genes. In this way, the gene expression pattern can serve as a marker, indicative of the physiological response of the cells to the agent which modulates 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity. This response state may be determined before, and at various points during

WO 03/039475

PCT/US02/35824

treatment of the individual with the agent which modulates 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity.

In a preferred embodiment, the present invention provides a method for monitoring the effectiveness of treatment of a subject with an agent which modulates 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity (*e.g.*, an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, or small molecule identified by the screening assays described herein) including the steps of (i) obtaining a pre-administration sample from a subject prior to administration of the agent; (ii) detecting the level of expression of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample; (iii) obtaining one or more post-administration samples from the subject; (iv) detecting the level of expression or activity of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, mRNA, or genomic DNA in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample with the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, mRNA, or genomic DNA in the post administration sample or samples; and (vi) altering the administration of the agent to the subject accordingly. For example, increased administration of the agent may be desirable to increase the expression or activity of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 to higher levels than detected, *i.e.*, to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent may be desirable to decrease expression or activity of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 to lower levels than detected, *i.e.* to decrease the effectiveness of the agent. According to such an embodiment, 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or activity may be used as an indicator of the effectiveness of an agent, even in the absence of an observable phenotypic response.

25 IV. Methods of Treatment:

The present invention provides for both prophylactic and therapeutic methods of treating a subject, *e.g.*, a human, at risk of (or susceptible to) a disease. With regard to both prophylactic and therapeutic methods of treatment, such treatments may be specifically tailored or modified, based on knowledge obtained from the field of pharmacogenomics. "Pharmacogenomics," as used herein, refers to the application of genomics technologies such as gene sequencing, statistical genetics, and gene expression analysis to drugs in clinical development and on the market. More specifically, the term refers to the study of how a patient's genes determine his or her response to a drug (*e.g.*, a patient's "drug response phenotype", or "drug response genotype").

WO 03/039475

PCT/US02/35824

Thus, another aspect of the invention provides methods for tailoring an subject's prophylactic or therapeutic treatment with either the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 molecules of the present invention or 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulators according to that individual's drug response genotype. Pharmacogenomics allows a clinician or physician to target prophylactic or therapeutic treatments to patients who will most benefit from the treatment and to avoid treatment of patients who will experience toxic drug-related side effects.

A. Prophylactic Methods

In one aspect, the invention provides a method for preventing in a subject, a disease by administering to the subject an agent which modulates 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity. Subjects at risk for a urological disorder, *e.g.*, BPH and/or UI, can be identified by, for example, any or a combination of the diagnostic or prognostic assays described herein. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms characteristic of aberrant 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or activity, such that a disease is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 aberrancy, for example, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524, 313, 333, 5464, 18817 or 33524 agonist or 313, 333, 5464, 18817 or 33524 antagonist agent can be used for treating the subject. The appropriate agent can be determined based on screening assays described herein.

B. Therapeutic Methods

Described herein are methods and compositions whereby a urological disorder may be ameliorated. Certain urological disorders are brought about, at least in part, by an excessive level of a gene product, or by the presence of a gene product exhibiting an abnormal or excessive activity. As such, the reduction in the level and/or activity of such gene products would bring about the amelioration of at least one symptom of a urological disorder. Techniques for the reduction of gene expression levels or the activity of a protein are discussed below.

Alternatively, certain other urological disorders are brought about, at least in part, by the absence or reduction of the level of gene expression, or a reduction in the level of a protein's activity. As such, an increase in the level of gene expression and/or the activity

WO 03/039475

PCT/US02/35824

of such proteins would bring about the amelioration of at least one symptom of a urological disorder.

In some cases, the up-regulation of a gene in a disease state reflects a protective role for that gene product in responding to the disease condition. Enhancement of such a gene's expression, or the activity of the gene product, will reinforce the protective effect it exerts. Some urological disease states may result from an abnormally low level of activity of such a protective gene. In these cases also, an increase in the level of gene expression and/or the activity of such gene products would bring about the amelioration of a least one symptom of a urological disorder. Techniques for increasing target gene expression levels or target gene product activity levels are discussed herein.

Accordingly, another aspect of the invention pertains to methods of modulating 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or activity for therapeutic purposes. Accordingly, in an exemplary embodiment, the modulatory method of the invention involves contacting a cell with a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 or agent that modulates one or more of the activities of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein activity associated with the cell (*e.g.*, an endothelial cell, ovarian cell, bladder cell and prostate cell). An agent that modulates 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein activity can be an agent as described herein, such as a nucleic acid or a protein, a naturally-occurring target molecule of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein (*e.g.*, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 ligand or substrate), a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibody, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 agonist or antagonist, a peptidomimetic of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 agonist or antagonist, or other small molecule. In one embodiment, the agent stimulates one or more 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activities. Examples of such stimulatory agents include active 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein and a nucleic acid molecule encoding 313, 333, 5464, 18817 or 33524 that has been introduced into the cell. In another embodiment, the agent inhibits one or more 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activities. Examples of such inhibitory agents include antisense 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid molecules, anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibodies, and 313, 333, 5464, 18817 or 33524 inhibitors. These modulatory methods can be performed *in vitro* (*e.g.*, by culturing the cell with the agent) or, alternatively, *in vivo* (*e.g.*, by administering the agent to a subject). As such, the present invention provides methods of treating an individual afflicted with a disease or disorder characterized by aberrant or unwanted expression or activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or nucleic acid molecule. In one embodiment, the method involves administering an agent (*e.g.*, an

WO 03/039475

PCT/US02/35824

agent identified by a screening assay described herein), or combination of agents that modulates (*e.g.*, upregulates or downregulates) 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or activity. In another embodiment, the method involves administering a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced, aberrant, or unwanted 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or activity.

Stimulation of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity is desirable in situations in which 313, 333, 5464, 18817 or 33524 is abnormally downregulated and/or in which increased 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity is likely to have a beneficial effect. Likewise, inhibition of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity is desirable in situations in which 313, 333, 5464, 18817 or 33524 is abnormally upregulated and/or in which decreased 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity is likely to have a beneficial effect.

(i) Methods for Inhibiting Target Gene Expression, Synthesis, or Activity

As discussed above, genes involved in cardiovascular disorders may cause such disorders via an increased level of gene activity. In some cases, such up-regulation may have a causative or exacerbating effect on the disease state. A variety of techniques may be used to inhibit the expression, synthesis, or activity of such genes and/or proteins.

For example, compounds such as those identified through assays described above, which exhibit inhibitory activity, may be used in accordance with the invention to ameliorate at least one symptom of a urological disorder. Such molecules may include, but are not limited to, small organic molecules, peptides, antibodies, and the like.

For example, compounds can be administered that compete with endogenous ligand for the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. The resulting reduction in the amount of ligand-bound 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein will modulate endothelial cell physiology. Compounds that can be particularly useful for this purpose include, for example, soluble proteins or peptides, such as peptides comprising one or more of the extracellular domains, or portions and/or analogs thereof, of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, including, for example, soluble fusion proteins such as Ig-tailed fusion proteins. (For a discussion of the production of Ig-tailed fusion proteins, see, for example, U.S. Pat. No. 5,116,964). Alternatively, compounds, such as ligand analogs or antibodies, that bind to the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 receptor site, but do not activate the protein, (*e.g.*, receptor-ligand antagonists) can be effective in inhibiting 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein activity.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

Further, antisense and ribozyme molecules which inhibit expression of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene may also be used in accordance with the invention to inhibit aberrant 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene activity. Still further, triple helix molecules may be utilized in inhibiting aberrant 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene activity.

The antisense nucleic acid molecules used in the methods 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 313, 333, 5464, 18817 or 33524 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 which 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 include 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 which 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 intracellular concentrations of the antisense 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, an antisense nucleic acid molecule used in the methods of the invention is an α -anomeric nucleic acid molecule. An α -anomeric nucleic acid molecule forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual β -units, the strands run parallel to each other (Gaultier *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641). The antisense nucleic acid molecule can also comprise a 2'-*o*-methylribonucleotide (Inoue *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue *et al.* (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

In still another embodiment, an antisense nucleic acid used in the methods of the invention is a ribozyme. Ribozymes are catalytic RNA molecules with ribonuclease activity which are capable of cleaving a single-stranded nucleic acid, such as an mRNA, to

WO 03/039475

PCT/US02/35824

which they have a complementary region. Thus, ribozymes (*e.g.*, hammerhead ribozymes (described in Haselhoff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) can be used to catalytically cleave 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA transcripts to thereby inhibit translation of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA. A ribozyme having specificity for a
5 313, 333, 5464, 18817 or 33524-encoding nucleic acid can be designed based upon the nucleotide sequence of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 cDNA disclosed herein (*i.e.*, SEQ ID NO:1 or 3). 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 313, 333, 5464, 18817 or 33524-encoding mRNA
10 (see, for example, Cech *et al.* U.S. Patent No. 4,987,071; and Cech *et al.* U.S. Patent No. 5,116,742). Alternatively, 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules (see, for example, Bartel, D. and Szostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418).

313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression can also be inhibited by targeting
15 nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 (*e.g.*, the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene in target cells (see, for example, Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene, C. *et al.* (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; and Maher, L.J. (1992)
20 *Bioassays* 14(12):807-15).

Antibodies that are both specific for the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein and interfere with its activity may also be used to modulate or inhibit 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein function. Such antibodies may be generated using standard techniques described herein, against the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein itself or
25 against peptides corresponding to portions of the protein. Such antibodies include but are not limited to polyclonal, monoclonal, Fab fragments, single chain antibodies, or chimeric antibodies.

In instances where the target gene protein is intracellular and whole antibodies are used, internalizing antibodies may be preferred. Lipofectin liposomes may be used to
30 deliver the antibody or a fragment of the Fab region which binds to the target epitope into cells. Where fragments of the antibody are used, the smallest inhibitory fragment which binds to the target protein's binding domain is preferred. For example, peptides having an amino acid sequence corresponding to the domain of the variable

WO 03/039475

PCT/US02/35824

region of the antibody that binds to the target gene protein may be used. Such peptides may be synthesized chemically or produced via recombinant DNA technology using methods well known in the art (described in, for example, Creighton (1983), *supra*; and Sambrook *et al.* (1989) *supra*). Single chain neutralizing antibodies which bind to intracellular target gene epitopes may also be administered. Such single chain antibodies may be administered, for example, by expressing nucleotide sequences encoding single-chain antibodies within the target cell population by utilizing, for example, techniques such as those described in Marasco *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7889-7893).

In some instances, the target gene protein is extracellular, or is a transmembrane protein, such as the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. Antibodies that are specific for one or more extracellular domains of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, for example, and that interfere with its activity, are particularly useful in treating urological disorder or a urological disorder. Such antibodies are especially efficient because they can access the target domains directly from the bloodstream. Any of the administration techniques described below which are appropriate for peptide administration may be utilized to effectively administer inhibitory target gene antibodies to their site of action.

(ii) Methods for Restoring or Enhancing Target Gene Activity

Genes that cause a urological disorder may be underexpressed within BPH and/or UI. Alternatively, the activity of the protein products of such genes may be decreased, leading to the development of urological disorder. Such down-regulation of gene expression or decrease of protein activity might have a causative or exacerbating effect on the disease state.

In some cases, genes that are up-regulated in the disease state might be exerting a protective effect. A variety of techniques may be used to increase the expression, synthesis, or activity of genes and/or proteins that exert a protective effect in response to a urological disorder.

Described in this section are methods whereby the level of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity may be increased to levels wherein the symptoms of the urological disorder are ameliorated. The level of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity may be increased, for example, by either increasing the level of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene expression or by increasing the level of active 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein which is present.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

For example, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, at a level sufficient to ameliorate at least one symptom of a urological disorder may be administered to a patient exhibiting such symptoms. Any of the techniques discussed below may be used for such administration. One of skill in the art will readily know how to determine the
5 concentration of effective, non-toxic doses of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, utilizing techniques such as those described below.

Additionally, RNA sequences encoding a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein may be directly administered to a patient exhibiting a urological disorder, at a concentration sufficient to produce a level of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein such
10 that a urological disorder are ameliorated. Any of the techniques discussed below, which achieve intracellular administration of compounds, such as, for example, liposome administration, may be used for the administration of such RNA molecules. The RNA molecules may be produced, for example, by recombinant techniques such as those described herein.

Further, subjects may be treated by gene replacement therapy. One or more copies
15 of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene, or a portion thereof, that directs the production of a normal 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein with 313, 333, 5464, 18817 or 33524 function, may be inserted into cells using vectors which include, but are not limited to adenovirus, adeno-associated virus, and retrovirus vectors, in addition to other particles
20 that introduce DNA into cells, such as liposomes. Additionally, techniques such as those described above may be used for the introduction of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene sequences into human cells.

Cells, preferably, autologous cells, containing 313, 333, 5464, 18817 or 33524
25 expressing gene sequences may then be introduced or reintroduced into the subject at positions which allow for the amelioration of at least one symptom of a urological disorder. Such cell replacement techniques may be preferred, for example, when the gene product is a secreted, extracellular gene product.

C. Pharmaceutical Compositions

Another aspect of the invention pertains to methods for treating a subject suffering
30 from a disease. These methods involve administering to a subject an agent which modulates 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or activity (*e.g.*, an agent identified by a screening assay described herein), or a combination of such agents. In another embodiment, the method involves administering to a subject a 313, 333, 5464, 18817 or

WO 03/039475

PCT/US02/35824

33524 protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced, aberrant, or unwanted 313, 333, 5464, 18817 or 33524 expression or activity.

Stimulation of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity is desirable in situations in which 313, 333, 5464, 18817 or 33524 is abnormally downregulated and/or in which
5 increased 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity is likely to have a beneficial effect. Likewise, inhibition of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity is desirable in situations in which 313, 333, 5464, 18817 or 33524 is abnormally upregulated and/or in which
15 decreased 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity is likely to have a beneficial effect.

The agents which modulate 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity can be
10 administered to a subject using pharmaceutical compositions suitable for such administration. Such compositions typically comprise the agent (*e.g.*, nucleic acid molecule, protein, or antibody) and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein the language "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all
15 solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

20 A pharmaceutical composition used in the therapeutic methods of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, *e.g.*, intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (*e.g.*, inhalation), transdermal (topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include
25 the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity
30 such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous

WO 03/039475

PCT/US02/35824

preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as manitol, sorbitol, and sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the agent that modulates 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity (e.g., a fragment of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or an anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibody) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle which contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying which yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the compound in the fluid carrier is applied orally and swished and expectorated or swallowed. Pharmaceutically compatible

WO 03/039475

PCT/US02/35824

binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.

For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant, e.g., a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer.

Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art.

The agents that modulate 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity can also be prepared in the form of suppositories (e.g., with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

In one embodiment, the agents that modulate 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity are prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent No. 4,522,811.

It is especially advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used

WO 03/039475

PCT/US02/35824

herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and
5 directly dependent on the unique characteristics of the agent that modulates 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an agent for the treatment of subjects.

Toxicity and therapeutic efficacy of such agents can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, *e.g.*, for determining
10 the LD50 (the dose lethal to 50% of the population) and the ED50 (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and can be expressed as the ratio LD50/ED50. Agents which exhibit large therapeutic indices are preferred. While agents that exhibit toxic side effects may be used, care should be taken to design a delivery system that targets such agents to the site of
15 affected tissue in order to minimize potential damage to uninfected cells and, thereby, reduce side effects.

The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulating agents lies preferably within a range of circulating
20 concentrations that include the ED50 with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any agent used in the therapeutic methods of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range
25 that includes the IC50 (*i.e.*, the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma may be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

As defined herein, a therapeutically effective amount of protein or polypeptide (*i.e.*,
30 an effective dosage) ranges from about 0.001 to 30 mg/kg body weight, preferably about 0.01 to 25 mg/kg body weight, more preferably about 0.1 to 20 mg/kg body weight, and even more preferably about 1 to 10 mg/kg, 2 to 9 mg/kg, 3 to 8 mg/kg, 4 to 7 mg/kg, or 5 to 6 mg/kg body weight. The skilled artisan will appreciate that certain factors may influence the dosage required to effectively treat a subject, including but not limited to the

WO 03/039475

PCT/US02/35824

severity of the disease or disorder, previous treatments, the general health and/or age of the subject, and other diseases present. Moreover, treatment of a subject with a therapeutically effective amount of a protein, polypeptide, or antibody can include a single treatment or, preferably, can include a series of treatments.

5 In a preferred example, a subject is treated with antibody, protein, or polypeptide in the range of between about 0.1 to 20 mg/kg body weight, one time per week for between about 1 to 10 weeks, preferably between 2 to 8 weeks, more preferably between about 3 to 7 weeks, and even more preferably for about 4, 5, or 6 weeks. It will also be appreciated
10 that the effective dosage of antibody, protein, or polypeptide used for treatment may increase or decrease over the course of a particular treatment. Changes in dosage may result and become apparent from the results of diagnostic assays as described herein.

The present invention encompasses agents which modulate expression or activity. An agent may, for example, be a small molecule. For example, such small molecules include, but are not limited to, peptides, peptidomimetics, amino acids, amino acid
15 analogs, polynucleotides, polynucleotide analogs, nucleotides, nucleotide analogs, organic or inorganic compounds (*i.e.*, including heteroorganic and organometallic compounds) having a molecular weight less than about 10,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 5,000 grams per mole, organic or
20 inorganic compounds having a molecular weight less than about 1,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 500 grams per mole, and salts, esters, and other pharmaceutically acceptable forms of such compounds. It is understood that appropriate doses of small molecule agents depends upon a number of factors within the ken of the ordinarily skilled physician, veterinarian, or researcher. The
25 dose(s) of the small molecule will vary, for example, depending upon the identity, size, and condition of the subject or sample being treated, further depending upon the route by which the composition is to be administered, if applicable, and the effect which the practitioner desires the small molecule to have upon the nucleic acid or polypeptide of the invention.

Exemplary doses include milligram or microgram amounts of the small molecule per
30 kilogram of subject or sample weight (*e.g.*, about 1 microgram per kilogram to about 500 milligrams per kilogram, about 100 micrograms per kilogram to about 5 milligrams per kilogram, or about 1 microgram per kilogram to about 50 micrograms per kilogram). It is furthermore understood that appropriate doses of a small molecule depend upon the potency of the small molecule with respect to the expression or activity to be modulated.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

Such appropriate doses may be determined using the assays described herein. When one or more of these small molecules is to be administered to an animal (*e.g.*, a human) in order to modulate expression or activity of a polypeptide or nucleic acid of the invention, a physician, veterinarian, or researcher may, for example, prescribe a relatively low dose at first, subsequently increasing the dose until an appropriate response is obtained. In addition, it is understood that the specific dose level for any particular animal subject will depend upon a variety of factors including the activity of the specific compound employed, the age, body weight, general health, gender, and diet of the subject, the time of administration, the route of administration, the rate of excretion, any drug combination, and the degree of expression or activity to be modulated.

Further, an antibody (or fragment thereof) may be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin, a therapeutic agent or a radioactive metal ion. A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to cells. Examples include taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof. Therapeutic agents include, but are not limited to, antimetabolites (*e.g.*, methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), alkylating agents (*e.g.*, mechlorethamine, thioepa chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU), cyclophosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, and cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines (*e.g.*, daunorubicin (formerly daunomycin) and doxorubicin), antibiotics (*e.g.*, dactinomycin (formerly actinomycin), bleomycin, mithramycin, and anthramycin (AMC)), and anti-mitotic agents (*e.g.*, vincristine and vinblastine).

The conjugates of the invention can be used for modifying a given biological response, the drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor, alpha-interferon, beta-interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator; or biological response modifiers such as, for example, lymphokines, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"),

WO 03/039475

PCT/US02/35824

granulocyte macrophage colony stimulating factor ("GM-CSF"), granulocyte colony stimulating factor ("G-CSF"), or other growth factors.

Techniques for conjugating such therapeutic moiety to antibodies are well known, see, e.g., Amon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described by Segal in U.S. Patent No. 4,676,980.

The nucleic acid molecules used in the methods of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (see U.S. Patent 5,328,470) or by stereotactic injection (see, e.g., Chen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057). The pharmaceutical preparation of the gene therapy vector can include the gene therapy vector in an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, e.g., retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can include one or more cells which produce the gene delivery system.

D. Pharmacogenomics

In conjunction with the therapeutic methods of the invention, pharmacogenomics (*i.e.*, the study of the relationship between a subject's genotype and that subject's response to a foreign compound or drug) may be considered. Differences in metabolism of therapeutics can lead to severe toxicity or therapeutic failure by altering the relation between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug. Thus, a physician or clinician may consider applying knowledge obtained in relevant

WO 03/039475

PCT/US02/35824

pharmacogenomics studies in determining whether to administer an agent which modulates 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity, as well as tailoring the dosage and/or therapeutic regimen of treatment with an agent which modulates 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity.

5 Pharmacogenomics deals with clinically significant hereditary variations in the response to drugs due to altered drug disposition and abnormal action in affected persons. See, for example, Eichelbaum, M. *et al.* (1996) *Clin. Exp.Pharmacol. Physiol.* 23(10-11): 983-985 and Linder, M.W. *et al.* (1997) *Clin. Chem.* 43(2):254-266. In general, two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions transmitted as a
10 single factor altering the way drugs act on the body (altered drug action) or genetic conditions transmitted as single factors altering the way the body acts on drugs (altered drug metabolism). These pharmacogenetic conditions can occur either as rare genetic defects or as naturally-occurring polymorphisms. For example, glucose-6-phosphate aminopeptidase deficiency (G6PD) is a common inherited enzymopathy in which the main
15 clinical complication is haemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

One pharmacogenomics approach to identifying genes that predict drug response, known as "a genome-wide association", relies primarily on a high-resolution map of the human genome consisting of already known gene-related markers (*e.g.*, a "bi-allelic" gene
20 marker map which consists of 60,000-100,000 polymorphic or variable sites on the human genome, each of which has two variants). Such a high-resolution genetic map can be compared to a map of the genome of each of a statistically significant number of patients taking part in a Phase II/III drug trial to identify markers associated with a particular observed drug response or side effect. Alternatively, such a high resolution map can be
25 generated from a combination of some ten million known single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human genome. As used herein, a "SNP" is a common alteration that occurs in a single nucleotide base in a stretch of DNA. For example, a SNP may occur once per every 1000 bases of DNA. A SNP may be involved in a disease process, however, the vast majority may not be disease-associated. Given a genetic map
30 based on the occurrence of such SNPs, individuals can be grouped into genetic categories depending on a particular pattern of SNPs in their individual genome. In such a manner, treatment regimens can be tailored to groups of genetically similar individuals, taking into account traits that may be common among such genetically similar individuals.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

Alternatively, a method termed the "candidate gene approach" can be utilized to identify genes that predict drug response. According to this method, if a gene that encodes a drug target is known (*e.g.*, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein used in the methods of the present invention), all common variants of that gene can be fairly easily identified in the population and it can be determined if having one version of the gene versus another is associated with a particular drug response.

As an illustrative embodiment, the activity of drug metabolizing enzymes is a major determinant of both the intensity and duration of drug action. The discovery of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes (*e.g.*, N-acetyltransferase 2 (NAT 2) and the cytochrome P450 enzymes CYP2D6 and CYP2C19) has provided an explanation as to why some patients do not obtain the expected drug effects or show exaggerated drug response and serious toxicity after taking the standard and safe dose of a drug. These polymorphisms are expressed in two phenotypes in the population, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The prevalence of PM is different among different populations. For example, the gene coding for CYP2D6 is highly polymorphic and several mutations have been identified in PM, which all lead to the absence of functional CYP2D6. Poor metabolizers of CYP2D6 and CYP2C19 quite frequently experience exaggerated drug response and side effects when they receive standard doses. If a metabolite is the active therapeutic moiety, PM show no therapeutic response, as demonstrated for the analgesic effect of codeine mediated by its CYP2D6-formed metabolite morphine. The other extreme are the so called ultra-rapid metabolizers who do not respond to standard doses. Recently, the molecular basis of ultra-rapid metabolism has been identified to be due to CYP2D6 gene amplification.

Alternatively, a method termed the "gene expression profiling" can be utilized to identify genes that predict drug response. For example, the gene expression of an animal dosed with a drug (*e.g.*, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 molecule or 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator used in the methods of the present invention) can give an indication whether gene pathways related to toxicity have been turned on.

Information generated from more than one of the above pharmacogenomics approaches can be used to determine appropriate dosage and treatment regimens for prophylactic or therapeutic treatment of a subject. This knowledge, when applied to dosing or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and, thus, enhance therapeutic or prophylactic efficiency when treating a subject suffering from a

WO 03/039475

PCT/US02/35824

cardiovascular disease, *e.g.*, atherosclerosis, with an agent which modulates 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity.

V. Recombinant Expression Vectors and Host Cells Used in the Methods of the Invention

5 The methods of the invention (*e.g.*, the screening assays described herein) include the use of vectors, preferably expression vectors, containing a nucleic acid encoding a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein (or a portion thereof). As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to
10 which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments can be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments can be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (*e.g.*, bacterial vectors having a bacterial origin of replication
15 and episomal mammalian vectors). Other vectors (*e.g.*, non-episomal mammalian vectors) are integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "expression vectors". In general, expression vectors of utility in
20 recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" can be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (*e.g.*, replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent
25 functions.

The recombinant expression vectors to be used in the methods of the invention comprise a nucleic acid of the invention in a form suitable for expression of the nucleic acid in a host cell, which means that the recombinant expression vectors include one or more regulatory sequences, selected on the basis of the host cells to be used for expression,
30 which is operatively linked to the nucleic acid sequence to be expressed. Within a recombinant expression vector, "operably linked" is intended to mean that the nucleotide sequence of interest is linked to the regulatory sequence(s) in a manner which allows for expression of the nucleotide sequence (*e.g.*, in an *in vitro* transcription/translation system or in a host cell when the vector is introduced into the host cell). The term "regulatory

WO 03/039475

PCT/US02/35824

sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (e.g., polyadenylation signals). Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel (1990) *Methods Enzymol.* 185:3-7. Regulatory sequences include those which direct constitutive expression of a nucleotide sequence in many types of host cells and those which direct expression of the nucleotide sequence only in certain host cells (e.g., tissue-specific regulatory sequences). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector can depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, and the like. The expression vectors of the invention can be introduced into host cells to thereby produce proteins or peptides, including fusion proteins or peptides, encoded by nucleic acids as described herein (e.g., 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins, mutant forms of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins, fusion proteins, and the like).

The recombinant expression vectors to be used in the methods of the invention can be designed for expression of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells (using baculovirus expression vectors), yeast cells, or mammalian cells. Suitable host cells are discussed further in Goeddel (1990) *supra*. Alternatively, the recombinant expression vector can be transcribed and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

Expression of proteins in prokaryotes is most often carried out in *E. coli* with vectors containing constitutive or inducible promoters directing the expression of either fusion or non-fusion proteins. Fusion vectors add a number of amino acids to a protein encoded therein, usually to the amino terminus of the recombinant protein. Such fusion vectors typically serve three purposes: 1) to increase expression of recombinant protein; 2) to increase the solubility of the recombinant protein; and 3) to aid in the purification of the recombinant protein by acting as a ligand in affinity purification. Often, in fusion expression vectors, a proteolytic cleavage site is introduced at the junction of the fusion moiety and the recombinant protein to enable separation of the recombinant protein from the fusion moiety subsequent to purification of the fusion protein. Such enzymes, and their cognate recognition sequences, include Factor Xa, thrombin and enterokinase. Typical fusion expression vectors include pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) which fuse glutathione S-transferase (GST), maltose B binding protein, or protein A, respectively, to the target recombinant protein.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

Purified fusion proteins can be utilized in 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity assays, (e.g., direct assays or competitive assays described in detail below), or to generate antibodies specific for 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins. In a preferred embodiment, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 fusion protein expressed in a retroviral expression vector of the present invention can be utilized to infect bone marrow cells which are subsequently transplanted into irradiated recipients. The pathology of the subject recipient is then examined after sufficient time has passed (e.g., six weeks).

In another embodiment, a nucleic acid of the invention is expressed in mammalian cells using a mammalian expression vector. Examples of mammalian expression vectors include pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) and pMT2PC (Kaufman *et al.* (1987) *EMBO J.* 6:187-195). When used in mammalian cells, the expression vector's control functions are often provided by viral regulatory elements. For example, commonly used promoters are derived from polyoma, Adenovirus 2, cytomegalovirus and Simian Virus 40. For other suitable expression systems for both prokaryotic and eukaryotic cells see chapters 16 and 17 of Sambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

In another embodiment, the recombinant mammalian expression vector is capable of directing expression of the nucleic acid preferentially in a particular cell type (e.g., tissue-specific regulatory elements are used to express the nucleic acid).

The methods of the invention may further use a recombinant expression vector comprising a DNA molecule of the invention cloned into the expression vector in an antisense orientation. That is, the DNA molecule is operatively linked to a regulatory sequence in a manner which allows for expression (by transcription of the DNA molecule) of an RNA molecule which is antisense to 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA. Regulatory sequences operatively linked to a nucleic acid cloned in the antisense orientation can be chosen which direct the continuous expression of the antisense RNA molecule in a variety of cell types, for instance viral promoters and/or enhancers, or regulatory sequences can be chosen which direct constitutive, tissue specific, or cell type specific expression of antisense RNA. The antisense expression vector can be in the form of a recombinant plasmid, phagemid, or attenuated virus in which antisense nucleic acids are produced under the control of a high efficiency regulatory region, the activity of which can be determined by the cell type into which the vector is introduced. For a discussion of the regulation of gene expression using antisense genes, see Weintraub, H. *et al.*,

WO 03/039475

PCT/US02/35824

Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, *Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986.

Another aspect of the invention pertains to the use of host cells into which a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid molecule of the invention is introduced, *e.g.*, a 5 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid molecule within a recombinant expression vector or a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid molecule containing sequences which allow it to homologously recombine into a specific site of the host cell's genome. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably herein. It is understood that such terms refer not only to the particular subject cell but to the progeny or 10 potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term as used herein.

A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, a 313, 333, 15 5464, 18817 or 33524 protein can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells, yeast or mammalian cells (such as Chinese hamster ovary cells (CHO) or COS cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

Vector DNA can be introduced into prokaryotic or eukaryotic cells via conventional transformation or transfection techniques. As used herein, the terms 20 "transformation" and "transfection" are intended to refer to a variety of art-recognized techniques for introducing foreign nucleic acid (*e.g.*, DNA) into a host cell, including calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAB-dextran-mediated transfection, lipofection, or electroporation. Suitable methods for transforming or transfecting host cells can be found in Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory* 25 *Manual*, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), and other laboratory manuals.

A host cell used in the methods of the invention, such as a prokaryotic or eukaryotic host cell in culture, can be used to produce (*i.e.*, express) a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. Accordingly, the invention further provides methods for 30 producing a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein using the host cells of the invention. In one embodiment, the method comprises culturing the host cell of the invention (into which a recombinant expression vector encoding a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein has been introduced) in a suitable medium such that a 313, 333, 5464, 18817 or 33524

WO 03/039475

PCT/US02/35824

protein is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein from the medium or the host cell.

VI. Isolated Nucleic Acid Molecules Used in the Methods of the Invention

5 The methods of the invention include the use of isolated nucleic acid molecules that encode 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins or biologically active portions thereof, as well as nucleic acid fragments sufficient for use as hybridization probes to identify 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -encoding nucleic acid molecules (e.g., 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA) and fragments for use as PCR primers for the amplification
10 or mutation of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid molecules. As used herein, the term "nucleic acid molecule" is intended to include DNA molecules (e.g., cDNA or genomic DNA) and RNA molecules (e.g., mRNA) and analogs of the DNA or RNA generated using nucleotide analogs. The nucleic acid molecule can be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA.

15 A nucleic acid molecule used in the methods of the present invention, e.g., a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 4, 7, 10 or 13, or a portion thereof, can be isolated using standard molecular biology techniques and the sequence information provided herein. Using all or portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13, as a hybridization probe, 313, 333, 5464, 18817 or 33524
20 nucleic acid molecules can be isolated using standard hybridization and cloning techniques (e.g., as described in Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Moreover, a nucleic acid molecule encompassing all or a portion of SEQ ID 1, 4, 7,
25 10 or 13 can be isolated by the polymerase chain reaction (PCR) using synthetic oligonucleotide primers designed based upon the sequence of SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13.

A nucleic acid used in the methods of the invention can be amplified using cDNA, mRNA or, alternatively, genomic DNA as a template and appropriate oligonucleotide
30 primers according to standard PCR amplification techniques. Furthermore, oligonucleotides corresponding to 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleotide sequences can be prepared by standard synthetic techniques, e.g., using an automated DNA synthesizer.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

In a preferred embodiment, the isolated nucleic acid molecules used in the methods of the invention comprise the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13, a complement of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13, or a portion of any of these nucleotide sequences. A nucleic acid molecule which is
5 complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13, is one which is sufficiently complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13 such that it can hybridize to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13 thereby forming a stable duplex.

In still another preferred embodiment, an isolated nucleic acid molecule used in the
10 methods of the present invention comprises a nucleotide sequence which is at least about 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to the entire length of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13, or a portion of any of this nucleotide sequence.

Moreover, the nucleic acid molecules used in the methods of the invention can
15 comprise only a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13, for example, a fragment which can be used as a probe or primer or a fragment encoding a portion of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, *e.g.*, a biologically active portion of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. The probe/primer typically comprises substantially purified oligonucleotide. The oligonucleotide typically comprises a region of
20 nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least about 12 or 15, preferably about 20 or 25, more preferably about 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, or 75 consecutive nucleotides of a sense sequence of SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13, of an anti-sense sequence of SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13, or of a naturally occurring allelic variant or mutant of SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13. In one embodiment, a nucleic acid molecule
25 used in the methods of the present invention comprises a nucleotide sequence which is greater than 100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, or more nucleotides in length and hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule of SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13.

As used herein, the term "hybridizes under stringent conditions" is intended to describe conditions for hybridization and washing under which nucleotide sequences that are significantly identical or homologous to each other remain hybridized to each other. Preferably, the conditions are such that sequences at least about 70%, more preferably at least about 80%, even more preferably at least about 85% or 90% identical to each other

WO 03/039475

PCT/US02/35824

remain hybridized to each other. Such stringent conditions are known to those skilled in the art and can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc. (1995), sections 2, 4 and 6. Additional stringent conditions can be found in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), chapters 7, 9 and 11. A preferred, non-limiting example of stringent hybridization conditions includes hybridization in 4X sodium chloride/sodium citrate (SSC), at about 65-70°C (or hybridization in 4X SSC plus 50% formamide at about 42-50°C) followed by one or more washes in 1X SSC, at about 65-70°C. A preferred, non-limiting example of highly stringent hybridization conditions includes hybridization in 1X SSC, at about 65-70°C (or hybridization in 1X SSC plus 50% formamide at about 42-50°C) followed by one or more washes in 0.3X SSC, at about 65-70°C. A preferred, non-limiting example of reduced stringency hybridization conditions includes hybridization in 4X SSC, at about 50-60°C (or alternatively hybridization in 6X SSC plus 50% formamide at about 40-45°C) followed by one or more washes in 2X SSC, at about 50-60°C. Ranges intermediate to the above-recited values, *e.g.*, at 65-70°C or at 42-50°C are also intended to be encompassed by the present invention. SSPE (1xSSPE is 0.15M NaCl, 10mM NaH₂PO₄, and 1.25mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC (1xSSC is 0.15M NaCl and 15mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; washes are performed for 15 minutes each after hybridization is complete. The hybridization temperature for hybrids anticipated to be less than 50 base pairs in length should be 5-10°C less than the melting temperature (T_m) of the hybrid, where T_m is determined according to the following equations. For hybrids less than 18 base pairs in length, T_m(°C) = 2(# of A + T bases) + 4(# of G + C bases). For hybrids between 18 and 49 base pairs in length, T_m(°C) = 81.5 + 16.6(log₁₀[Na⁺]) + 0.41(%G+C) - (600/N), where N is the number of bases in the hybrid, and [Na⁺] is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer ([Na⁺] for 1xSSC = 0.165 M). It will also be recognized by the skilled practitioner that additional reagents may be added to hybridization and/or wash buffers to decrease non-specific hybridization of nucleic acid molecules to membranes, for example, nitrocellulose or nylon membranes, including but not limited to blocking agents (*e.g.*, BSA or salmon or herring sperm carrier DNA), detergents (*e.g.*, SDS), chelating agents (*e.g.*, EDTA), Ficoll, PVP and the like. When using nylon membranes, in particular, an additional preferred, non-limiting example of stringent hybridization conditions is hybridization in 0.25-0.5M NaH₂PO₄, 7% SDS at about 65°C, followed by

WO 03/039475

PCT/US02/35824

one or more washes at 0.02M NaH₂PO₄, 1% SDS at 65°C, see *e.g.*, Church and Gilbert (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995, (or alternatively 0.2X SSC, 1% SDS).

In preferred embodiments, the probe further comprises a label group attached thereto, *e.g.*, the label group can be a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Such probes can be used as a part of a diagnostic test kit for identifying cells or tissue which misexpress a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, such as by measuring a level of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -encoding nucleic acid in a sample of cells from a subject *e.g.*, detecting 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA levels or determining whether a genomic 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene has been mutated or deleted.

The methods of the invention further encompass the use of nucleic acid molecules that differ from the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13, due to degeneracy of the genetic code and thus encode the same 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins as those encoded by the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10 or 13. . In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule included in the methods of the invention has a nucleotide sequence encoding a protein having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:3, 6, 9, 12 or 15.

The methods of the invention further include the use of allelic variants of human 313, 333, 5464, 18817 or 33524, *e.g.*, functional and non-functional allelic variants. Functional allelic variants are naturally occurring amino acid sequence variants of the human 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein that maintain a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity. Functional allelic variants will typically contain only conservative substitution of one or more amino acids of SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12 or 15, or substitution, deletion or insertion of non-critical residues in non-critical regions of the protein. Non-functional allelic variants are naturally occurring amino acid sequence variants of the human 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein that do not have a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity. Non-functional allelic variants will typically contain a non-conservative substitution, deletion, or insertion or premature truncation of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12 or 15, or a substitution, insertion or deletion in critical residues or critical regions of the protein.

The methods of the present invention may further use non-human orthologues of the human 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. Orthologues of the human 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein are proteins that are isolated from non-human organisms and possess the same 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

The methods of the present invention further include the use of nucleic acid molecules comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 4, 7,10 or 13 or a portion thereof, in which a mutation has been introduced. The mutation may lead to amino acid substitutions at "non-essential" amino acid residues or at "essential" amino acid residues.

5 A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 (*e.g.*, the sequence of SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12 or 15) without altering the biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. For example, amino acid residues that are conserved among the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins of the present invention are not likely
10 to be amenable to alteration.

Mutations can be introduced into SEQ ID NO: 1, 4, 7,10 or 13, by standard techniques, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative amino acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino
15 acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (*e.g.*,
20 glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, a predicted nonessential amino acid residue in a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein is preferably replaced with another amino acid residue from the same side chain family. Alternatively,
25 in another embodiment, mutations can be introduced randomly along all or part of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for 313, 333, 5464, 18817 or 33524 biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis of SEQ ID NO: 1, 4, 7,10 or
30 13, the encoded protein can be expressed recombinantly and the activity of the protein can be determined using the assay described herein.

Another aspect of the invention pertains to the use of isolated nucleic acid molecules which are antisense to the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, 4, 7,10 or 13, . An "antisense" nucleic acid comprises a nucleotide sequence which is complementary to a "sense" nucleic acid encoding a protein, *e.g.*, complementary to the coding strand of a

WO 03/039475

PCT/US02/35824

double-stranded cDNA molecule or complementary to an mRNA sequence. Accordingly, an antisense nucleic acid can hydrogen bond to a sense nucleic acid. The antisense nucleic acid can be complementary to an entire 313, 333, 5464, 18817 or 33524 coding strand, or to only a portion thereof. In one embodiment, an antisense nucleic acid molecule is
5 antisense to a "coding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding a 313, 333, 5464, 18817 or 33524. 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 "noncoding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding 313, 333, 5464, 18817 or
10 33524. The term "noncoding region" refers to 5' and 3' sequences which flank the coding region that are not translated into amino acids (also referred to as 5' and 3' untranslated regions).

Given the coding strand sequences encoding 313, 333, 5464, 18817 or 33524 disclosed herein, antisense nucleic acids of the invention can be designed according to the
15 rules of Watson and Crick base pairing. The antisense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA, but more preferably is an oligonucleotide which is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site
20 of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 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 and 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
25 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 which can be used to generate the antisense nucleic acid include 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil,
30 5-iodouracil, hypoxanthine, xantine, 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-

WO 03/039475

PCT/US02/35824

methyaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonylmethyluracil, 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).

10 Antisense nucleic acid molecules used in the methods of the invention are further described above, in section IV.

In yet another embodiment, the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid molecules used in the methods of the present invention 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 acid molecules can be modified to generate peptide nucleic acids (see Hyrup B. *et al.* (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4 (1): 5-23). 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 B. *et al.* (1996) *supra*; Perry-O'Keefe *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:14670-675.

25 PNAs of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid molecules can be used in the therapeutic and diagnostic applications described herein. For example, PNAs can be used as antisense or antigene agents for sequence-specific modulation of gene expression by, for example, inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid molecules can also be used in the analysis of single base pair mutations in a gene, (*e.g.*, by PNA-directed PCR clamping); as 'artificial restriction enzymes' when used in combination with other enzymes, (*e.g.*, S1 nucleases (Hyrup B. *et al.* (1996) *supra*)); or as probes or primers for DNA sequencing or hybridization (Hyrup B. *et al.* (1996) *supra*; Perry-O'Keefe *et al.* (1996) *supra*).

WO 03/039475

PCT/US02/35824

In another embodiment, PNAs of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 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

5 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid molecules can be generated which 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

10 stacking, number of bonds between the nucleobases, and orientation (Hyrup B. *et al.* (1996) *supra*). The synthesis of PNA-DNA chimeras can be performed as described in Hyrup B. *et al.* (1996) *supra* and Finn P.J. *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* 24 (17): 3357-63. 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-

15 methoxytrityl)amino-5'-deoxy-thymidine phosphoramidite, can be used as a between the PNA and the 5' end of DNA (Mag, M. *et al.* (1989) *Nucleic Acid Res.* 17: 5973-88). PNA monomers are then coupled in a stepwise manner to produce a chimeric molecule with a 5' PNA segment and a 3' DNA segment (Finn P.J. *et al.* (1996) *supra*). Alternatively, chimeric molecules can be synthesized with a 5' DNA segment and a 3' PNA segment

20 (Peterser, K.H. *et al.* (1975) *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5: 1119-11124).

In other embodiments, the oligonucleotide used in the methods of the invention 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.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6553-6556; Lemaitre *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; PCT Publication No. W088/09810) or the blood-brain barrier (see, *e.g.*, PCT Publication No. W089/10134). In addition, oligonucleotides can be modified with hybridization-triggered cleavage agents (See, *e.g.*, Krol *et al.* (1988) *Bio-Techniques* 6:958-976) or intercalating agents. (See, *e.g.*, Zon (1988) *Pharm. Res.* 5:539-549). To this

25 end, the oligonucleotide may be conjugated to another molecule, (*e.g.*, a peptide,

30 hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, or hybridization-triggered cleavage agent).

WO 03/039475

PCT/US02/35824

VII. Isolated 313, 333, 5464, 18817 or 33524 Proteins and Anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 Antibodies Used in the Methods of the Invention

The methods of the invention include the use of isolated 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins, and biologically active portions thereof, as well as polypeptide fragments suitable for use as immunogens to raise anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibodies. In one embodiment, native 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins can be isolated from cells or tissue sources by an appropriate purification scheme using standard protein purification techniques. In another embodiment, 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins are produced by recombinant DNA techniques. Alternative to recombinant expression, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or polypeptide can be synthesized chemically using standard peptide synthesis techniques.

As used herein, a "biologically active portion" of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein includes a fragment of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein having a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity. Biologically active portions of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein include peptides comprising amino acid sequences sufficiently identical to or derived from the amino acid sequence of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, e.g., the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:3, 6, 9,12 or 15, which include fewer amino acids than the full length 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins, and exhibit at least one activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein (e.g., the N-terminal region of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein that is believed to be involved in the regulation of apoptotic activity). A biologically active portion of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein can be a polypeptide which is, for example, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 or more amino acids in length. Biologically active portions of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein can be used as targets for developing agents which modulate a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 activity.

In a preferred embodiment, the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein used in the methods of the invention has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 3, 6, 9,12 or 15. In other embodiments, the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein is substantially identical to SEQ ID NO: 3, 6, 9,12 or 15, and retains the functional activity of the protein of SEQ ID NO: 3, 6, 9,12 or 15, yet differs in amino acid sequence due to natural allelic variation or mutagenesis, as described in detail in subsection V above. Accordingly, in another embodiment, the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein used in the methods of

WO 03/039475

PCT/US02/35824

the invention is a protein which comprises an amino acid sequence at least about 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NO:3, 6, 9 .

To determine the percent identity of two amino acid sequences or of two nucleic acid sequences, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (*e.g.*, gaps can be introduced in one or both of a first and a second amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment and non-identical sequences can be disregarded for comparison purposes). In a preferred embodiment, the length of a reference sequence aligned for comparison purposes is at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and even more preferably at least 70%, 80%, or 90% of the length of the reference sequence (*e.g.*, when aligning a second sequence to the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 amino acid sequence of SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12 or 15 having 500 amino acid residues, at least 75, preferably at least 150, more preferably at least 225, even more preferably at least 300, and even more preferably at least 400 or more amino acid residues are aligned). The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position (as used herein amino acid or nucleic acid "identity" is equivalent to amino acid or nucleic acid "homology"). The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences, taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences.

The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. In a preferred embodiment, the percent identity between two amino acid sequences is determined using the Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at <http://www.gcg.com>), using either a Blosum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. In yet another preferred embodiment, the percent identity between two nucleotide sequences is determined using the GAP program in the GCG software package (available at <http://www.gcg.com>), using a NWSgapdna.CMP matrix and a gap weight of 40, 50, 60, 70, or 80 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. In another embodiment, the percent

WO 03/039475

PCT/US02/35824

identity between two amino acid or nucleotide sequences is determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17 (1988)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0 or 2.0U), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4.

5 The methods of the invention may also use 313, 333, 5464, 18817 or 33524 chimeric or fusion proteins. As used herein, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 "chimeric protein" or "fusion protein" comprises a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide operatively linked to a non-313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide. An "313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence
10 corresponding to a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 molecule, whereas a "non-313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein which is not substantially homologous to the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, *e.g.*, a protein which is different from the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein and which is derived from the same or a different organism. Within a
15 313, 333, 5464, 18817 or 33524 fusion protein the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide can correspond to all or a portion of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. In a preferred embodiment, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 fusion protein comprises at least one biologically active portion of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. In
20 another preferred embodiment, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 fusion protein comprises at least two biologically active portions of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. Within the fusion protein, the term "operatively linked" is intended to indicate that the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide and the non-313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide are fused in-frame to each other. The non-313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the 313, 333, 5464, 18817 or
25 33524 polypeptide.

For example, in one embodiment, the fusion protein is a GST-313, 333, 5464, 18817 or 33524 fusion protein in which the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 sequences are fused to the C-terminus of the GST sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of recombinant 313, 333, 5464, 18817 or 33524.

30 In another embodiment, this fusion protein is a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein containing a heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (*e.g.*, mammalian host cells), expression and/or secretion of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 can be increased through use of a heterologous signal sequence.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

The 313, 333, 5464, 18817 or 33524 fusion proteins used in the methods of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject *in vivo*. The 313, 333, 5464, 18817 or 33524 fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 substrate. Use of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 fusion proteins may be useful therapeutically for the treatment of disorders caused by, for example, (i) aberrant modification or mutation of a gene encoding a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein; (ii) mis-regulation of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 gene; and (iii) aberrant post-translational modification of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein.

Moreover, the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -fusion proteins used in the methods of the invention can be used as immunogens to produce anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibodies in a subject, to purify 313, 333, 5464, 18817 or 33524 ligands and in screening assays to identify molecules which inhibit the interaction of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 with a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 substrate.

Preferably, a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 chimeric or fusion protein used in the methods of the invention is 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, for example 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 which give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments which can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence (see, for example, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons: 1992). Moreover, many expression vectors are commercially available that already encode a fusion moiety (*e.g.*, a GST polypeptide). A 313, 333, 5464, 18817 or 33524 -encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein.

The present invention also pertains to the use of variants of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins which function as either 313, 333, 5464, 18817 or 33524 agonists (mimetics) or as 313, 333, 5464, 18817 or 33524 antagonists. Variants of the 313, 333,

WO 03/039475

PCT/US02/35824

5464, 18817 or 33524 proteins can be generated by mutagenesis, *e.g.*, discrete point mutation or truncation of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. An agonist of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins can retain substantially the same, or a subset, of the biological activities of the naturally occurring form of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. An antagonist of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein by, for example, competitively modulating a 313, 333, 5464, 18817 or 33524-mediated activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. Thus, specific biological effects can be elicited by treatment with a variant of limited function. In one embodiment, treatment of a subject with a variant having a subset of the biological activities of the naturally occurring form of the protein has fewer side effects in a subject relative to treatment with the naturally occurring form of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein.

In one embodiment, variants of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein which function as either 313, 333, 5464, 18817 or 33524 agonists (mimetics) or as 313, 333, 5464, 18817 or 33524 antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, *e.g.*, truncation mutants, of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein for 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein agonist or antagonist activity. In one embodiment, a variegated library of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A variegated library of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential 313, 333, 5464, 18817 or 33524 sequences is expressible as individual polypeptides, or alternatively, as a set of larger fusion proteins (*e.g.*, for phage display) containing the set of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 sequences therein. There are a variety of methods which can be used to produce libraries of potential 313, 333, 5464, 18817 or 33524 variants from a degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be performed in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic gene then ligated into an appropriate expression vector. Use of a degenerate set of genes allows for the provision, in one mixture, of all of the sequences encoding the desired set of potential 313, 333, 5464, 18817 or 33524 sequences. Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are known in the art (see, *e.g.*, Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1984)

WO 03/039475

PCT/US02/35824

Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura *et al.* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

In addition, libraries of fragments of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein coding sequence can be used to generate a variegated population of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 fragments for screening and subsequent selection of variants of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. In one embodiment, a library of coding sequence fragments can be generated by treating a double stranded PCR fragment of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 coding sequence with a nuclease under conditions wherein nicking occurs only about once per molecule, denaturing the double stranded DNA, renaturing the DNA to form double stranded DNA which can include sense/antisense pairs from different nicked products, removing single stranded portions from reformed duplexes by treatment with S1 nuclease, and ligating the resulting fragment library into an expression vector. By this method, an expression library can be derived which encodes N-terminal, C-terminal and internal fragments of various sizes of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein.

Several techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. Such techniques are adaptable for rapid screening of the gene libraries generated by the combinatorial mutagenesis of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 proteins. The most widely used techniques, which are amenable to high through-put analysis, for screening large gene libraries typically include cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting library of vectors, and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a new technique which enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify 313, 333, 5464, 18817 or 33524 variants (Arkin and Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331).

The methods of the present invention further include the use of anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibodies. An isolated 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein, or a portion or fragment thereof, can be used as an immunogen to generate antibodies that bind 313, 333, 5464, 18817 or 33524 using standard techniques for polyclonal and monoclonal antibody preparation. A full-length 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein can be used or, alternatively, antigenic peptide fragments of 313, 333, 5464, 18817 or

WO 03/039475

PCT/US02/35824

33524 can be used as immunogens. The antigenic peptide of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 comprises at least 8 amino acid residues of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12 or 15 and encompasses an epitope of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with the 5 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, more preferably at least 15 amino acid residues, even more preferably at least 20 amino acid residues, and most preferably at least 30 amino acid residues.

Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of 313, 333, 10 5464, 18817 or 33524 that are located on the surface of the protein, *e.g.*, hydrophilic regions, as well as regions with high antigenicity.

A 313, 333, 5464, 18817 or 33524 immunogen is typically used to prepare antibodies by immunizing a suitable subject, (*e.g.*, rabbit, goat, mouse, or other mammal) with the immunogen. An appropriate immunogenic preparation can contain, for example, 15 recombinantly expressed 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein or a chemically synthesized 313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide. The preparation can further include an adjuvant, such as Freund's complete or incomplete adjuvant, or similar immunostimulatory agent. Immunization of a suitable subject with an immunogenic 313, 333, 5464, 18817 or 33524 preparation induces a polyclonal anti-313, 333, 5464, 18817 or 20 33524 antibody response.

The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, *i.e.*, molecules that contain an antigen binding site which specifically binds (immunoreacts with) an antigen, such as a 313, 333, 5464, 18817 or 33524. Examples of immunologically active portions of 25 immunoglobulin molecules include F(ab) and F(ab)₂ fragments which can be generated by treating the antibody with an enzyme such as pepsin. The invention provides polyclonal and monoclonal antibodies that bind 313, 333, 5464, 18817 or 33524 molecules. The term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one species of an antigen binding site 30 capable of immunoreacting with a particular epitope of 313, 333, 5464, 18817 or 33524. A monoclonal antibody composition thus typically displays a single binding affinity for a particular 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein with which it immunoreacts.

Polyclonal anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibodies can be prepared as described above by immunizing a suitable subject with a 313, 333, 5464, 18817 or 33524

WO 03/039475

PCT/US02/35824

immunogen. The anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibody titer in the immunized subject can be monitored over time by standard techniques, such as with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized 313, 333, 5464, 18817 or 33524. If desired, the antibody molecules directed against 313, 333, 5464, 18817 or 33524 can be
5 isolated from the mammal (*e.g.*, from the blood) and further purified by well known techniques, such as protein A chromatography to obtain the IgG fraction. At an appropriate time after immunization, *e.g.*, when the anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibody titers are highest, antibody-producing cells can be obtained from the subject and used to prepare monoclonal antibodies by standard techniques, such as the hybridoma
10 technique originally described by Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (see also, Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31; and Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), the more recent human B cell hybridoma technique (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol Today* 4:72), the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.*
15 (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) or trioma techniques. The technology for producing monoclonal antibody hybridomas is well known (see generally Kenneth, R. H. in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lerner, E. A. (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402; Gefter, M. L. *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.*
20 3:231-36). Briefly, an immortal cell line (typically a myeloma) is fused to lymphocytes (typically splenocytes) from a mammal immunized with a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 immunogen as described above, and the culture supernatants of the resulting hybridoma cells are screened to identify a hybridoma producing a monoclonal antibody that binds 313, 333, 5464, 18817 or 33524.

25 Any of the many well known protocols used for fusing lymphocytes and immortalized cell lines can be applied for the purpose of generating an anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 monoclonal antibody (see, *e.g.*, G. Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Gefter *et al.* (1977) *supra*; Lerner (1981) *supra*; and Kenneth (1980) *supra*). Moreover, the ordinarily skilled worker will appreciate that there are many variations of
30 such methods which also would be useful. Typically, the immortal cell line (*e.g.*, a myeloma cell line) is derived from the same mammalian species as the lymphocytes. For example, murine hybridomas can be made by fusing lymphocytes from a mouse immunized with an immunogenic preparation of the present invention with an immortalized mouse cell line. Preferred immortal cell lines are mouse myeloma cell lines

WO 03/039475

PCT/US02/35824

that are sensitive to culture medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine ("HAT medium"). Any of a number of myeloma cell lines can be used as a fusion partner according to standard techniques, e.g., the P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 or Sp2/O-Ag14 myeloma lines. These myeloma lines are available from ATCC. Typically, HAT-sensitive mouse myeloma cells are fused to mouse splenocytes using polyethylene glycol ("PEG"). Hybridoma cells resulting from the fusion are then selected using HAT medium, which kills unfused and unproductively fused myeloma cells (unfused splenocytes die after several days because they are not transformed). Hybridoma cells producing a monoclonal antibody of the invention are detected by screening the hybridoma culture supernatants for antibodies that bind 313, 333, 5464, 18817 or 33524, e.g., using a standard ELISA assay.

Alternative to preparing monoclonal antibody-secreting hybridomas, a monoclonal anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibody can be identified and isolated by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library (e.g., an antibody phage display library) with 313, 333, 5464, 18817 or 33524 to thereby isolate immunoglobulin library members that bind 313, 333, 5464, 18817 or 33524. Kits for generating and screening phage display libraries are commercially available (e.g., the Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, Catalog No. 27-9400-01; and the Stratagene *SurfZAP™ Phage Display Kit*, Catalog No. 240612). Additionally, examples of methods and reagents particularly amenable for use in generating and screening antibody display library can be found in, for example, Ladner *et al.* U.S. Patent No. 5,223,409; Kang *et al.* PCT International Publication No. WO 92/18619; Dower *et al.* PCT International Publication No. WO 91/17271; Winter *et al.* PCT International Publication WO 92/20791; Markland *et al.* PCT International Publication No. WO 92/15679; Breitling *et al.* PCT International Publication WO 93/01288; McCafferty *et al.* PCT International Publication No. WO 92/01047; Garrard *et al.* PCT International Publication No. WO 92/09690; Ladner *et al.* PCT International Publication No. WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *BioTechnology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *BioTechnology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; and McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554.

Additionally, recombinant anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibodies, such as chimeric and humanized monoclonal antibodies, comprising both human and non-human

WO 03/039475

PCT/US02/35824

portions, which can be made using standard recombinant DNA techniques, are within the scope of the methods of the invention. Such chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA techniques known in the art, for example using methods described in Robinson *et al.* International Application No.

- 5 PCT/US86/02269; Akira, *et al.* European Patent Application 184,187; Taniguchi, M., European Patent Application 171,496; Morrison *et al.* European Patent Application 173,494; Neuberger *et al.* PCT International Publication No. WO 86/01533; Cabilly *et al.* U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly *et al.* European Patent Application 125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-
10 3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter U.S. Patent 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science*
15 239:1534; and Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

- An anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibody can be used to detect 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein (*e.g.*, in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 protein. Anti-313, 333, 5464, 18817 or 33524 antibodies can be used diagnostically to
20 monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, *e.g.*, to, for example, determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling (*i.e.*, physically linking) the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of
25 suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material
30 includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S or ^3H .

This invention is further illustrated by the following examples which should not be construed as limiting. The contents of all references, patents and published patent

WO 03/039475

PCT/US02/35824

applications cited throughout this application, as well as the Figure and the Sequence Listing is incorporated herein by reference.

EXAMPLES

5

EXAMPLE 1: TISSUE DISTRIBUTION OF USING TAQMAN™ ANALYSIS

This example describes the TaqMan™ procedure. The Taqman™ procedure is a quantitative, reverse transcription PCR-based approach for detecting mRNA. The RT-PCR reaction exploits the 5' nuclease activity of AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase to cleave a TaqMan™ probe during PCR. Briefly, cDNA was generated from the samples of interest, *e.g.*, heart, kidney, liver, skeletal muscle, and various vessels, and used as the starting material for PCR amplification. In addition to the 5' and 3' gene-specific primers, a gene-specific oligonucleotide probe (complementary to the region being amplified) was included in the reaction (*i.e.*, the Taqman™ probe). The TaqMan™ probe includes the oligonucleotide with a fluorescent reporter dye covalently linked to the 5' end of the probe (such as FAM (6-carboxyfluorescein), TET (6-carboxy-4,7,2',7'-tetrachlorofluorescein), JOE (6-carboxy-4,5-dichloro-2,7-dimethoxyfluorescein), or VIC) and a quencher dye (TAMRA (6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine) at the 3' end of the probe.

During the PCR reaction, cleavage of the probe separates the reporter dye and the quencher dye, resulting in increased fluorescence of the reporter. Accumulation of PCR products is detected directly by monitoring the increase in fluorescence of the reporter dye. When the probe is intact, the proximity of the reporter dye to the quencher dye results in suppression of the reporter fluorescence. During PCR, if the target of interest is present, the probe specifically anneals between the forward and reverse primer sites. The 5'-3' nucleolytic activity of the AmpliTaq™ Gold DNA Polymerase cleaves the probe between the reporter and the quencher only if the probe hybridizes to the target. The probe fragments are then displaced from the target, and polymerization of the strand continues. The 3' end of the probe is blocked to prevent extension of the probe during PCR. This process occurs in every cycle and does not interfere with the exponential accumulation of product. RNA was prepared using the trizol method and treated with DNase to remove contaminating genomic DNA. cDNA was synthesized using standard techniques. Mock cDNA synthesis in the absence of reverse transcriptase resulted in samples with no

WO 03/039475

PCT/US02/35824

detectable PCR amplification of the control gene confirms efficient removal of genomic DNA contamination.

Equivalents

5 Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

What is claimed:

1. A method for identifying a compound capable of treating a urological disorder, comprising assaying the ability of the compound to modulate 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid expression or 313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide activity, thereby identifying a compound capable of treating a pain disorder.
2. A method for identifying a compound capable of modulating a hyperplasia comprising:
 - a) contacting a cell which expresses 313, 333, 5464, 18817 or 33524 with a test compound; and
 - b) assaying the ability of the test compound to modulate the expression of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid or the activity of a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide, thereby identifying a compound capable of modulating hyperplasia.
3. A method for modulating hyperplasia in a cell comprising contacting a cell with a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator, thereby modulating hyperplasia in the cell.
4. The method of claim 2, wherein the cell is a bladder cell or a prostate cell.
5. The method of claim 3, wherein the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.
6. The method of claim 3, wherein the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator is capable of modulating 313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide activity.
7. The method of claim 6, wherein the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.
8. The method of claim 6, wherein the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator is capable of modulating 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid expression.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

9. A method for treating a subject having a urological disorder characterized by aberrant 313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide activity or aberrant 313, 333, 5464, 18817 or 33524 nucleic acid expression comprising administering to the subject a 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator, thereby treating said subject having a urological disorder.

10. The method of claim 9, wherein said urological disorder includes urinary incontinence including overactive/oversensitive bladder, overflow urinary incontinence, stress urinary incontinence caused by dysfunction of the bladder, urethra or central/peripheral nervous system, prostatitis, benign prostatic hyperplasia, cancer of the prostate, and kidney disorders.

11. The method of claim 9, wherein said 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator is administered in a pharmaceutically acceptable formulation.

12. The method of claim 9, wherein the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.

13. The method of claim 9, wherein the 313, 333, 5464, 18817 or 33524 modulator is capable of modulating 313, 333, 5464, 18817 or 33524 polypeptide activity.

WO 03/039475

PCT/US02/35824

SEQUENCE LISTING

<110> Silos-Santiago, Inmaculada

<120> Methods and Compositions for Treating Urological Disorders 313, 333, 5464, 18817 or 33524

<130> MPI01-289

<160> 15

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 3100

<212> DNA

<213> Homo Sapien

<400> 1

```

actcgtctct ggtaaagtct gaggcaggaca ggggtggctga ctggcagatc cagaggttcc 60
cttggcagtc cagccaggc cttaccatg gatcagttcc ctgaatcagt gacagaaaac 120
ttgagtaacg atgatttggc tgaggcctgt tatattgggg acatcgtggt ctttgggact 180
gtgttcctgt ccatattcta ctccgtcctc ttggccattg gctcgtggg aaatttgggt 240
gtagtgtttg ccctcaccaa cagcaagaag cccaagatg tcaccgacat ttacctcctg 300
aacctggcct tgtctgatct gctgtttgta gccactttgc ccttctggac tcactatttg 360
ataaatgaaa agggctccca caatgccatg tgcaaatca ctaccgctt ctctctcctc 420
ggcttttttg gaagcatatt ctctcacc ccctcagca tggataggta cctggccatc 480
gtcctggcgg ccaactccat gaacaaccgg accgtccagc atggcgtcac catcagccta 540
ggcgtctggg cagcagccat ttgggtggca gcccccagc teatgttcac aaagcagaaa 600
gaaaatgaat gccttggtga ctaccctcag gtccctcagg aaactggccc cgtgctccgc 660
aatgtggaaa caaattttct tggcttccca ctcccctgc tcattatgag ttattgctac 720
ttcagaatca tccagacgct gtttctctgc aagaaccaca agaaagccaa agccattaaa 780
ctgatccttc tgggtggcaat cgtgtttctc ctctctggga caccctacaa cgttatgatt 840
ttcctggaga cgtttaagct ctatgatctc ttcccagtt gtgacatgag gaaggatctg 900
aggctggccc tcagtgtgac tgaagcgggt gcatttagcc attgttgcct gaatcctctc 960
atctatgcat ttgctgggga gaagtccaga agataccctt accacctgta tgggaaatgc 1020
ctggctgtcc tgggtggggg ctcagtcacc gttgatttct cctcatctga atccaaaag 1080
agcagcagtg gaagtgttct gaggcagaat tttacttacc acacagtgta tggagatgca 1140
ttgtctcttc tctgaagggg atcccagaag ctgtgtctca cagagaccct ggaattctctg 1200
aacctgatgc tgactagtga ggaagagatt ttgtgttat ttcttaagg cacaaaatga 1260
tggaccctat gcacacaaaa caacctaga gtgtgttga gaattgtgct caaaatttga 1320
agaatgaaca aattgaactc ttggaatgac aaagagtaga catttctctt actgcaaatg 1380
tcatcagaac ttattgtttt gcsyatgaca aaaatccaac tcagactagt ttatgtaaat 1440
gaaggttggt ccagggcctg agccaaagta gaattccctc tctctgactc tcaaatcttt 1500
tgaagggaaa agatccccc aacttccat gacacagctt tacaaccaga ggggactga 1560
caccactggt tctctggccc caagggaaaa ttcccaggga agtgccttga taggcaaat 1620
ttgtatcagg tgcctatccc tggaggtgct tgttatccat ggggaaggga tatataaat 1740
gggaagctcc agtccaatct catggagaag cagaatata tatttccaa gattgtgatg 1800
ggtgggtact attctgatta caasaacaa atgccacaca tcaaccttac catgtgcctg 1860
atccagctcc tcccctgatt acaccagctc cgtctctatt aagccctctt ccatcatctc 1920
cccnaacctg caagggctcc ccactgcta ctgcatcgag tcaaaactca aatgcttggc 1980
ttctcatacg tcaaccatgg ggtctacca atagattccc caltgctccc tecttcccaa 2040
aggactccac ccaactatcc agcctgtctc ttccatatga cctcatgcat ctccacctgc 2100
tcccaggcca gtaagggaaa tagaaaaacc ctgccccaaa ataaagaagg atggattcca 2160
accocaaact cagttagctg ggacaaatca agcttcagtt tcctggctg tagaagagg 2220
ataaggtacc tttcactatg agatcatcct ttccagatg aggaactagc caccaactc 2280
tgcaggtctc aacccttttg tctgctcttt agactctgc ttccacacc tgcactgctg 2340
tgctgtgccc aagtgtgtgt gctgacaaa gcttgaagag cctgaggtg ccttggccc 2400

```

WO 03/039475

PCT/US02/35824

```

gtgcatagcc cagacacaga agaggctggt tcttacgats gcacccagtg agcactccca 2460
agtctacaga gtgatagcct tccgtaaccc aactctccctg gactgccttg aatccccct 2520
ccccagtcacc ttgtgcaagc cccctgcccat ctgggaaaaat acccccacat tcatgctact 2580
gccaaacctgg gtagccaggg ctatggggagc agctttttttt lccccctag aaagctttgg 2640
aacaatgtaa aactttaaag ctcgaaaaca atbtgtaataa tgctaaagaa aagtcactc 2700
aabctaaacca catcaatatt gtcattccctg taitcaacccg tccaacccct gttcacactc 2760
tcacatgttt agagttgcaa tegttaactga cagatggttt taactctga ttgtttttcc 2820
tcttaacgctt agaccacaaa tagtgctcgc tttctatgta gtttgtaat taccatttta 2880
gaagactccta ccagactgtg tattcattga agtcagatgt ggttaactgtt aaattgctgt 2940
gtatctgata gctctttggc agtctataty ttgtataat gaatgsagaa ataagctatg 3000
ttccttcaag atcatgtacc caatttact tgccattact caattgataa acatttaact 3060
tgtttccaat gtttagcaaa tacatatttt atagaacttc 3100

```

```

<210> 2
<211> 1068
<212> DNA
<213> Homo Sapien

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1068)

```

```

<400> 2
atg gat cag ttc cct gaa tca gtg aca gaa aac ttt gag tac gat gat 48
Met Asp Gln Phe 5 Thr Glu Asn Phe Glu Tyr Asp Asp 15
1 10 15

ttg gct gag gcc tgt tat att ggg gac atc gtg gtc ttt ggg act gtg 96
Leu Ala Glu Ala Cys Tyr Ile Gly Asp Ile Val Val Phe Gly Thr Val 30
20 25 30

ttc ctg tcc ata ttc tac tcc gtc atc ttt gcc att gcc ctg gtc gga 144
Phe Leu Ser Ile Phe Tyr Ser Val Ile Phe Ala Ile Gly Leu Val Gly 45
35 40 45

aat ttg ttg gta gtg ttt gcc ctc acc aac agc aag aag ccc aag agt 192
Asn Leu Leu Val Val Phe Ala Leu Thr Asn Ser Lys Lys Pro Lys Ser 60
50 55 60

gtc acc gac att tac ctc ctg aac ctg gcc ttg tct gat ctg ctg ttt 240
Val Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Phe 75
65 70 75 80

gta gcc act ttg ccc ttc tgg act cac tat ttg ata aat gaa aag gcc 288
Val Ala Thr Leu Pro Phe Trp Thr His Tyr Leu Ile Asn Glu Lys Gly 95
85 90 95

ctc cac aat gcc atg tgc aaa ttc act acc gcc ttc ttc ttc atc gcc 336
Leu His Asn Ala Met Cys Lys Phe Thr Thr Ala Phe Phe Phe Ile Gly 110
100 105 110

ttt ttt gga agc ata ttc ttc atc acc gtc atc agc att gat agg tac 384
Phe Phe Gly Ser Ile Phe Phe Ile Thr Val Ile Ser Ile Asp Arg Tyr 125
115 120 125

ctg gcc atc gtc ctg gcc gcc aac tcc atg aac aac cgg acc gtg cag 432
Leu Ala Ile Val Leu Ala Ala Asn Ser Met Asn Asn Arg Thr Val Gln 140
130 135 140

cat ggc gtc acc atc agc cta gcc gtc tgg gca gca gcc att ttg gtg 480
His Gly Val Thr Ile Ser Leu Gly Val Trp Ala Ala Ala Ile Leu Val

```

WO 03/039475 PCT/US02/35824

145 150 155 160

gca gca ccc cag ttc atg ttc aca aag cag aaa gaa aat gaa tgc ctt 528
Ala Ala Pro Gln Phe Met Phe Thr Lys Gln Lys Glu Asn Glu Cys Leu
165 170 175

ggt gac tac ccc gag gtc ctc cag gaa atc tgg ccc gtg ctc cgc aat 576
Gly Asp Tyr Pro Glu Val Leu Gln Glu Ile Trp Pro Val Leu Arg Asn
180 185 190

gtg gaa sca aat ttt ctt ggc ttc cta ctc ccc ctg ctc att atg agt 624
Val Glu Thr Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Pro Leu Leu Ile Met Ser
195 200 205

tat tgc tac ttc aga atc atc cag acg ctg ttt tcc tgc aag aac cac 672
Tyr Cys Tyr Phe Arg Ile Ile Gln Thr Leu Phe Ser Cys Lys Asn His
210 215 220

aag aaa gcc aaa gcc att asa ctg atc ctt ctg gtg gtc atc gtg ttt 720
Lys Lys Ala Lys Ala Ile Lys Leu Ile Leu Leu Val Val Ile Val Phe
225 230 235 240

ttc ctc ttc tgg aca ccc tac aac gtt atg att ttc ctg gag acg ctt 768
Phe Leu Phe Trp Thr Pro Tyr Asn Val Met Ile Phe Leu Glu Thr Leu
245 250 255

aag ctc tat gac ttc ttt ccc agt tgt gac atg agg aag gat ctg agg 816
Lys Leu Tyr Asp Phe Phe Pro Ser Cys Asp Met Arg Lys Asp Leu Arg
260 265 270

ctg gcc ctc agt gtg act gag acg gtt gca ttt agc cat tgt tgc ctg 864
Leu Ala Leu Ser Val Thr Glu Thr Val Ala Phe Ser His Cys Cys Leu
275 280 285

aat cct ctc atc tat gca ttt gct ggg gag aag ttc aga aga tac ctt 912
Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Glu Lys Phe Arg Arg Tyr Leu
290 295 300

tac cac ctg tat ggg aaa tgc ctg gct gtc ctg tgt ggg cgc tca gtc 960
Tyr His Leu Tyr Gly Lys Cys Leu Ala Val Leu Cys Gly Arg Ser Val
305 310 315 320

cac gtt gat ttc tcc tca tct gaa tca caa agg agc agg cat gga agt 1008
His Val Asp Phe Ser Ser Ser Glu Ser Gln Arg Ser Arg His Gly Ser
325 330 335

ggt ctg agc agc aat ttt act tac cac acg agt gat gga gat gca ttg 1056
Val Leu Ser Ser Asn Phe Thr Tyr His Thr Ser Asp Gly Asp Ala Leu
340 345 350

etc ctt ctc tga 1068
Leu Leu Leu *
355

<210> 3
<211> 355
<212> PRT
<213> Homo Sapien
<400> 3

WO 03/039475

PCT/US02/35824

Met Asp Gln Phe Pro Glu Ser Val Thr Glu Asn Phe Glu Tyr Asp Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Glu Ala Cys Tyr Ile Gly Asp Ile Val Val Phe Gly Thr Val
 20 25 30
 Phe Leu Ser Ile Phe Tyr Ser Val Ile Phe Ala Ile Gly Leu Val Gly
 35 40 45
 Asn Leu Leu Val Val Phe Ala Leu Thr Asn Ser Lys Lys Pro Lys Ser
 50 55 60
 Val Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Phe
 65 70 75 80
 Val Ala Thr Leu Pro Phe Trp Thr His Tyr Leu Ile Asn Glu Lys Gly
 85 90 95
 Leu His Asn Ala Met Cys Lys Phe Thr Thr Ala Phe Phe Ile Gly
 100 105 110
 Phe Phe Gly Ser Ile Phe Phe Ile Thr Val Ile Ser Ile Asp Arg Tyr
 115 120 125
 Leu Ala Ile Val Leu Ala Ala Asn Ser Met Asn Asn Arg Thr Val Gln
 130 135 140
 His Gly Val Thr Ile Ser Leu Gly Val Trp Ala Ala Ala Ile Leu Val
 145 150 155 160
 Ala Ala Pro Gln Phe Met Phe Thr Lys Gln Lys Glu Asn Glu Cys Leu
 165 170 175
 Gly Asp Tyr Pro Glu Val Leu Gln Glu Ile Trp Pro Val Leu Arg Asn
 180 185 190
 Val Glu Thr Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Pro Leu Leu Ile Met Ser
 195 200 205
 Tyr Cys Tyr Phe Arg Ile Ile Gln Thr Leu Phe Ser Cys Lys Asn His
 210 215 220
 Lys Lys Ala Lys Ala Ile Lys Leu Ile Leu Leu Val Val Ile Val Phe
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Trp Thr Pro Tyr Asn Val Met Ile Phe Leu Glu Thr Leu
 245 250 255
 Lys Leu Tyr Asp Phe Phe Pro Ser Cys Asp Met Arg Lys Asp Leu Arg
 260 265 270
 Leu Ala Leu Ser Val Thr Glu Thr Val Ala Phe Ser His Cys Cys Leu
 275 280 285
 Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Glu Lys Phe Arg Arg Tyr Leu
 290 295 300
 Tyr His Leu Tyr Gly Lys Cys Leu Ala Val Leu Cys Gly Arg Ser Val
 305 310 315 320
 His Val Asp Phe Ser Ser Ser Glu Ser Gln Arg Ser Arg His Gly Ser
 325 330 335
 Val Leu Ser Ser Asn Phe Thr Tyr His Thr Ser Asp Gly Asp Ala Leu
 340 345 350
 Leu Leu Leu
 355

<210> 4
 <211> 1376
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 4
 gaattccccc aacagagcca agctctccat ctagtggaca gggaagctag cagcaaacct 60
 tcccttccact acaaaacttc attgcttggc cannaagaga gtaattcaa tgtgacatc 120
 tatgttaggca attaaaaacc tattgatgta taanaacggt tgcattcatg gagggcaact 180
 aatacaattc taggacttta taanagatca ctttttattt atcacaggg tggacaaga 240
 tggattatca agtgcgaagt ccaatctatg acatcaatta ttatacatcg gagccctgcc 300
 aaaaaatcaa tgtgaagcaa atgcagccc gcctcctgcc tccgctctac tcactgggtg 360
 tcactcttgg ttttggggc aacatgctgg tcatcctcat cctgataaac tgcaaaagcc 420

WO 03/039475

PCT/US02/35824

```

tgaagagcat gactgacatc tacctgctca acctggccat ctctgacctg tttttccttc 480
tlactgtccc cttctgggct cactatgctg cggcccagtg ggactttgga aatcaaatgt 540
gtcaactott gacagggctc tatttatag gettctcttc tggaaicttc ttcacatcc 600
tcctgacaat gcataggtag ctggctgtcg tccatgctgt gtttgcitta aaagccagg 660
cggtcacctt tgggggtggt acaagtgtag tcccttgggt ggttgcctgt tttgctctc 720
tcccaggaat catctttacc agatctcaaa asaaagttct tcaatacaac tgcagctctc 780
atttccata cagtccagtat caattctgga agaatttcca gacattaagc atagtcatct 840
tggggctggt cctgcagctg ctgtctatgg tcatctgcta ctggggaatc ctaaaaactc 900
tgattcgggt tgaaatgag asaaagaggc acaggctgt gaggcttacc ttcacatca 960
tgaacagagc tcttgggat aattgcaagta gctctaacag gttggaacca gctatgcaag 1020
aggaattctt tggctgaat aattgcaagta gctctaacag gttggaacca gctatgcaag 1080
tgaacagagc tcttgggat aattgcaagta gctctaacag gttggaacca gctatgcaag 1140
gagaaaggtt cagaactac ctcttagtct tcttccaaaa gcaaatgcc aaagctctc 1200
gaccaactgg tctatatttc cagcaagagg ctcccagagc agcaagctca gtttacacc 1260
atccaactgg gagaagaaa atactctgtg gcttctgaca cggactcaag tgggctggtg 1320
acctagtcag agttgtgcac atggcttagt tttcacaac agcctgggct ggggggt 1376

```

```

<210> 5
<211> 1059
<212> DNA
<213> Homo Sapien

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1059)

```

```

<400> 5
atg gat tat caa gtg tca agt cca atc tat gac atc aat tat tat aca 48
Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr
1 5 10 15

tcg gag ccc tgc caa aaa atc aat gtg aag caa atc gca gcc cgc ctc 96
Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu
20 25 30

ctg cct cag ctg tac tca ctg gtg ttc atc ttt ggt ttt gtg ggc aac 144
Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn
35 40 45

atg ctg gtc atc ctg atc ctg ata aac tgc aaa agg ctg aag agc atg 192
Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met
50 55 60

act gac atc tac ctg ctg aac ctg gcc atc tct gac ctg ttt ttc ctt 240
Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu
65 70 75 80

ctt act gtc ccc ttc tgg gct cac tat gct gcc gcc cag tgg gac ttt 288
Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe
85 90 95

gga aat aca atg tgt caa ctg tgg aca ggg ctg tat ttt ata ggc ttc 336
Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe
100 105 110

ttc tct gga atc ttc ttc atc atc ctg aca atc gat agg tac ctg 384
Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu
115 120

gct gtc gtc cat gct gtg ttt gct tta aaa gcc agg acg gtc acc ttt 432
Ala Val Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe

```

WO 03/039475 PCT/US02/35824

130 135 140

ggg gtg gtg aca agt gbg atc act tgg gtg gct gtg ttt gcg tct 480
 Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser
 145 150 155 160

ctc cca gga atc atc ttt acc aga tct caa aaa gaa ggt ott cat tac 528
 Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr
 165 170

acc tgc agc tct cat ttt cca tac agt cag tat caa ttc tgg aag aat 576
 Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn
 180 185 190

ttc cag aca tta aag ata gtc atc ttg ggg ctg gtc ctg cgg ctg ctt 624
 Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu
 195 200 205

gtc atg gtc atc tgc tac tgg gga atc cta aaa act ctg ctt cgg tgt 672
 Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys
 210 215 220

cga aat gag aag aag agg cac agg gct gtg agg ctt atc ttc acc atc 720
 Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile
 225 230 235 240

atg att gtt tat ttt ctc ttc tgg gct ccc tac aac att gtc ctt ctc 768
 Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu
 245 250 255

ctg aac acc ttc cag gaa ttc ttt ggc ctg aat aat tgc agt agc tct 816
 Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser
 260 265 270

aac agg ttg gac caa gct atg cag gtg aca gag act ctt ggg atg acg 864
 Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr
 275 280 285

caac tgc tgc atc aac ccc atc atc tat gcc ttt gtc ggg gag aag ttc 912
 His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe
 290 295 300

aga aac tac ctc tta gtc ttc ttc caa aag cac att gcc aaa cgc ttc 960
 Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe
 305 310 315 320

lgc aaa tgc tgt tct att ttc cag caa gag gct ccc gag cga gca agc 1008
 Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser
 325 330 335

tca gtt tac acc cga tcc act ggg gag cag gaa ata tct gtg ggc ttg 1056
 Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu
 340 345 350

tga 1059
 *

<210> 6
 <211> 352

WO 03/039475

PCT/US02/35824

<212> PRT
<213> Homo Sapien

```

<400> 6
Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr
1 5 10 15
Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu
20 25 30
Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn
35 40 45
Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met
50 55 60
Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu
65 70 75 80
Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe
85 90 95
Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe
100 105 110
Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu
115 120 125
Ala Val Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe
130 135 140
Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser
145 150 155 160
Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr
165 170 175
Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn
180 185 190
Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu
195 200 205
Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys
210 215 220
Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile
225 230 235 240
Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu
245 250 255
Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser
260 265 270
Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr
275 280 285
His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe
290 295 300
Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe
305 310 315 320
Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser
325 330 335
Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu
340 345 350

```

<210> 7
<211> 647
<212> DNA
<213> Homo Sapien

```

<400> 7
gctctctctg cacacttccc tcgctctccc acaccactgc accaggcccc ggaaccccc 60
ttgtgtgcs gagaatggct actcctcaca cgtgtggat gggactggcc ctgctggggg 120
tgctggggca cctgcaggca gcaccggagg cccaggtctc cgtgcagccc aacttccagc 180
aggacaagtt cctggggcgc tggttcagcg cgggctctgc ctccaactcg agctggctcc 240
gggagaagaa ggcggcggtt tccatgtgca agtctgtggt ggcctctgcc acggatggtg 300

```

WO 03/039475

PCT/US02/35824

```

gcctcaacct gacctccacc ttctctcagga aaaaccagtg tgagaccoga accatgctgc 360
tgccagccgc ggggtccctc ggtcctctaca gctaccggag tcccactcgg ggcagcaact 420
actccgtgtc agtggtagag accgactacg accagtaeag gctgctgtac agccaggoga 480
gcaaggggcc tggcgaggac ttccgcatgg ccacctctca cagccgaacc cagaccocca 540
gggtcagatt aaaggagaaa ttcaccgctt tctgcaaggc ccagggttc acagaggata 600
ccattgtctt cctgccccaa accgataagt gcatgacgga acaatag 647

<210> 8
<211> 573
<212> DNA
<213> Homo Sapien

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(573)

<400> 8
atg gct act cat cac acg ctg tgg atg gga ctg gcc ctg ctg ggg gts 48
Met Ala Thr His His Thr Leu Trp Met Gly Leu Ala Leu Leu Gly Val
1 5 10 15
ctg ggc gac ctg cag gca gca ccg gag gcc cag gtc tcc gtg cag ccc 96
Leu Gly Asp Leu Gln Ala Ala Pro Glu Ala Gln Val Ser Val Gln Pro
20 25 30
aac ttc cag cag gac aag ttc ctg ggg cgc tgg ttc agc gcg ggc ctc 144
Asn Phe Gln Gln Asp Lys Phe Leu Gly Arg Trp Phe Ser Ala Gly Leu
35 40 45
gcc tcc aac tcg agc tgg ctc cgg gag aag aag gcg gcg ttg tcc atg 192
Ala Ser Asn Ser Ser Trp Leu Arg Glu Lys Lys Ala Ala Leu Ser Met
50 55 60
tgc aag tot gtg gtg gcc cct gcc acg gat ggt ggc ctc aac ctg acc 240
Cys Lys Ser Val Val Ala Pro Ala Thr Asp Gly Gly Leu Asn Leu Thr
65 70 75 80
tcc acc ttc ctc agg aaa aac cag tgt gag acc cga acc atg cts ctg 288
Ser Thr Phe Leu Arg Lys Asn Gln Cys Glu Thr Arg Thr Met Leu Leu
85 90 95
cag ccc gcg ggg tcc ctc gcc tcc tac agc tac cgg agt ccc cac tgg 336
Gln Pro Ala Gly Ser Leu Gly Ser Tyr Ser Tyr Arg Ser Pro His Trp
100 105 110
ggc agc acc tac tcc gtg tca gtg gtg gag acc gac tac gac cag tac 384
Gly Ser Thr Tyr Ser Val Ser Val Val Glu Thr Asp Tyr Asp Gln Tyr
115 120 125
gcg ctg ctg tac agc cag gcc agc aag gcc cct gcc gag gac ttc cgc 432
Ala Leu Leu Tyr Ser Gln Gly Ser Lys Gly Pro Gly Glu Asp Phe Arg
130 135 140
atg gcc acc ctc tac agc cga acc cag acc ccc agg gct gag tta aag 480
Met Ala Thr Leu Tyr Ser Arg Thr Gln Thr Pro Arg Ala Glu Leu Lys
145 150 155 160
gag aaa ttc acc gcc ttc tgc aag gcc cag gcc ttc aca gag gat acc 528
Glu Lys Phe Thr Ala Phe Cys Lys Ala Gln Gly Phe Thr Glu Asp Thr
165 170 175

```

WO 03/039475

PCT/US02/35824

```

att gtc ttc ctg ccc caa acc gat aag tgc atg acg gaa caa tag      573
ile val phe leu pro gln thr asp lys cys met thr glu gln *
      180                185                190

```

```

<210> 9
<211> 190
<212> PRT
<213> Homo Sapien

```

```

<400> 9
Met Ala Thr His His Thr Leu Trp Met Gly Leu Ala Leu Leu Gly Val
 1      5      10      15
Leu Gly Asp Leu Gln Ala Ala Pro Glu Ala Gln Val Ser Val Gln Pro
 20     25     30
Asn Phe Gln Gln Asp Lys Phe Leu Gly Arg Trp Phe Ser Ala Gly Leu
 35     40     45
Ala Ser Asn Ser Ser Trp Leu Arg Glu Lys Lys Ala Ala Leu Ser Met
 50     55     60
Cys Lys Ser Val Val Ala Pro Ala Thr Asp Gly Gly Leu Asn Leu Thr
 65     70     75     80
Ser Thr Phe Leu Arg Lys Asn Gln Cys Glu Thr Arg Thr Met Leu Leu
 85     90     95
Gln Pro Ala Gly Ser Leu Gly Ser Tyr Ser Tyr Arg Ser Pro His Trp
100    105    110
Gly Ser Thr Tyr Ser Val Ser Val Val Glu Thr Asp Tyr Asp Gln Tyr
115    120    125
Ala Leu Leu Tyr Ser Gln Gly Ser Lys Gly Pro Gly Glu Asp Phe Arg
130    135    140
Met Ala Thr Leu Tyr Ser Arg Thr Gln Thr Pro Arg Ala Glu Leu Lys
145    150    155    160
Glu Lys Phe Thr Ala Phe Cys Lys Ala Gln Gly Phe Thr Glu Asp Thr
165    170    175
ile val phe leu pro gln thr asp lys cys met thr glu gln
180                185                190

```

```

<210> 10
<211> 747
<212> DNA
<213> Homo Sapien

```

```

<400> 10
atggggctca gcattttttt gctcctgtgt gttcttgggc tcagccaggc agccacaccg 60
aagattttca atggcaactga gtgtggggct aactcaacgc cgtggcaggt gggcgtgttt 120
gagggcacca gcctgcgctg cgggggtgtc aactcaacgc cgtggcaggt gggcgtgttt 180
gctcaactga gcggcagcag gtaactgggt cgcttggggg aacacagcct cagccagctc 240
gactggaccg agcagatccg gcaacggcgc ttctctgtga cccatcccgg ctacctggga 300
gctcgcacga gccacagaca gacactccgg ctgctggggc tggcctgtgc cgtccgcgta 360
accagcagcg ttcaacccct gccctgtccc aatgactgtg caaccgctgg caccgagtgc 420
cactgtctcag gctggggcat caccacacc ccaaggaaac caltcccgga tctgctccag 480
tgctcaacc tctccatcgt ctcccatgcc acctgccatg gttgtatcc cgggagaatc 540
acgagcwaca tgggtgtgtg aggcggcgtc ccggggcagg atgcctgcca gggtagttct 600
ggggcccacc tgggtgtgtg gggagtctt caaggtctgg tgcctgggg gctctggggg 660
cctgtgggac aagatggcat cctggagtc tacacctata ttgcaagta tgtggactgg 720
atccggatga tcatgaggaa caactga                                747

```

```

<210> 11
<211> 747
<212> DNA

```

WO 03/039475

PCT/US02/35824

<213> Homo Sapien

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(747)

<400> 11

```

atg ggg ctc agc atc ttt ttg ctc ctg tgt gtt ctt ggg ctc agc cag 48
Met Gly Leu Ser Ile Phe Leu Leu Leu Cys Val Leu Gly Leu Ser Gln
1 5 10 15

gca gcc aca cgg aag att ttc aat ggc act gag tgt ggg cgt aac tca 96
Ala Ala Thr Pro Lys Ile Phe Asn Gly Thr Glu Cys Gly Arg Asn Ser
20 25 30

cag ccg tgg cag gtg ggg ctg ttt gag ggc acc agc ctg cgc tgc ggg 144
Gln Pro Trp Trp Gln Val Gly Leu Phe Glu Gly Thr Ser Leu Arg Cys Gly
35 40 45

ggt gtc ctt att gac cac agg tgg gtc ctc aca gcg gct cac tgc agc 192
Gly Val Leu Ile Asp His Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ser
50 55 60

ggc agc agg tac tgg gtg cgc ctg ggg gaa cac agc ctc agc cag ctc 240
Gly Ser Arg Tyr Trp Val Arg Leu Gly Glu His Ser Leu Ser Gln Leu
65 70 75 80

gac tgg acc gag cag atc cgg cac agc ggc ttc tct gtg acc cat ccc 288
Asp Trp Thr Thr Gln Ile Arg His Ser Gly Phe Ser Val Thr His Pro
85 90 95

ggc tac ctg gga gcc tgg acg agc cac gag cac gac ctc cgg ctg ctg 336
Gly Tyr Leu Gly Ala Ser Thr Ser His Glu His Asp Leu Arg Leu Leu
100 105 110

cgg ctg cgc ctg ccc gtc cgc gta acc agc agc gtt caa ccc ctg ccc 384
Arg Leu Arg Leu Pro Val Arg Val Thr Ser Ser Val Gln Pro Leu Pro
115 120 125

ctg ccc aat gac tgt gca acc gct ggc acc gag tgc cac gtc tca ggc 432
Leu Pro Asn Asp Cys Ala Thr Ala Gly Thr Glu Cys His Val Ser Gly
130 135 140

tgg ggc atc acc aac cac cca cgg aac cca ttc ccg gat ctg ctc cag 480
Trp Gly Ile Thr Asn His Pro Arg Asn Pro Phe Pro Asp Leu Leu Gln
145 150 155 160

tgc ctc aac ctc tcc atc gtc tcc cat gcc acc tgc cat ggt gtg tat 528
Cys Leu Asn Leu Ser Ile Val Ser His Ala Thr Cys His Gly Val Tyr
165 170 175

ccc ggg aga atc acg agc wac atg gtg tgt gca ggc ggc gtc ccg ggg 576
Pro Gly Arg Ile Thr Ser Xaa Met Val Cys Ala Gly Gly Val Pro Gly
180 185 190

cag gat gcc tgc cag ggt gat tct ggg ggc ccc ctg gtg tgt ggg gga 624
Gln Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gly Gly
195 200 205

gtc ctt caa ggt ctg gtg tcc tgg ggg tct gtg ggg ccc tgt gga caa 672
Val Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Ser Val Gly Pro Cys Gly Gln

```

WO 03/039475

PCT/US02/35824

210 215 220

gat ggc atc cct gga gtc tac acc tat att tgc aag tat gtg gac tgg 720
 asp gly ile pro gly val tyr thr tyr ile cys lys tyr val asp trp
 225 230 235 240

atc cgg atg atc atg agg aac aac tga 747
 ile arg met ile met arg asn asn *

245

<210> 12
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 12
 Met Gly Leu Ser Ile Phe Leu Leu Leu Cys Val Leu Gly Leu Ser Gln
 1 5 10 15
 Ala Ala Thr Pro Lys Ile Phe Asn Gly Thr Glu Cys Gly Arg Asn Ser
 20 25 30
 Gln Pro Trp Gln Val Gly Leu Phe Glu Gly Thr Ser Leu Arg Cys Gly
 35 40 45
 Gly Val Leu Ile Asp His Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ser
 50 55 60
 Gly Ser Arg Tyr Trp Val Arg Leu Gly Glu His Ser Leu Ser Gln Leu
 65 70 75 80
 Asp Trp Thr Glu Gln Ile Arg His Ser Gly Phe Ser Val Thr His Pro
 85 90 95
 Gly Tyr Leu Gly Ala Ser Thr Ser His Glu His Asp Leu Arg Leu Leu
 100 105 110
 Arg Leu Arg Leu Pro Val Arg Val Thr Ser Ser Val Gln Pro Leu Pro
 115 120 125
 Leu Pro Asn Asp Cys Ala Thr Ala Gly Thr Glu Cys His Val Ser Gly
 130 135 140
 Trp Gly Ile Thr Asn His Pro Arg Asn Pro Phe Pro Asp Leu Leu Gln
 145 150 155 160
 Cys Leu Asn Leu Ser Ile Val Ser His Ala Thr Cys His Gly Val Tyr
 165 170 175
 Pro Gly Arg Ile Thr Ser Xaa Met Val Cys Ala Gly Gly Val Pro Gly
 180 185 190
 Gln Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gly Gly
 195 200 205
 Val Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Ser Val Gly Pro Cys Gly Gln
 210 215 220
 Asp Gly Ile Pro Gly Val Tyr Thr Tyr Ile Cys Lys Tyr Val Asp Trp
 225 230 235 240
 ile arg met ile met arg asn asn

245

<210> 13
 <211> 840
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 13
 gggaggggac atcaaggcag catcatgctc attgcaactt ccttctctct ttttttctca 60
 tcggtgggtg cagccccac ccacagcagt ttctggcagt ttcagaggag ggtcaaacac 120
 atcaaggggc gaagtgcctt cttctcatat tacggatgat gctgctactg tgggcttggg 180
 gataaaggga tccccgtgga tgacactgac aggcacagcc cctcatctcc ctctccctac 240

WO 03/039475

PCT/US02/35824

```

gagaagctga aggagttcag ctgccagcct gtgttgaaca getaccagtt ccacatcgtc 300
aatggcgagc tggtttggg atgcaccctt ggtctggtg ccagctgcca ctgcaggtg 360
aaggcctgtg agtgtgacaa gcaatccgtg cactgctta aagagagcct gccacactat 420
gagaaaaact tcaagcagtt ctccagcgrg cccaggtgtg gcagacataa gccctggtgc 480
tagggacacc acagggtecc tctcatcate cagcatccg tctagtgttg ctcttcagg 540
aagccttctc agatcatccc caacagcacc ctgttcttc actgggaggg aggacaaaat 600
gtctcccgca ggcagctca cctttagca ttctgacaa ggggactccc bgtcgtcag 660
catcagaggg ctggagagca gaaatggaa agatgagatg cctgcctgc aggagctggc 720
attctgtgga gtggggagga ctacaaatgc atggatatag aagtaagaga cacattagac 780
tgtatgaagt gctatgatgc agtaaaaaca agggacggga tagagatgca cccaacccca 840

```

<210> 14
 <211> 459
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(459)

```

<400> 14
atg ctc att gca act tcc ttc ttc ctt ttt ttc tca tgg gtg gtg gca 48
Met Leu Ile Ala Thr Ser Phe Phe Leu Phe Phe Ser Ser Val Val Ala
1 5 10 15
gcc ccc acc cac agc agt ttc tgg cag ttt cag agg agg gtc aaa cac 96
Ala Pro Thr His Ser Ser Phe Trp Gln Phe Gln Arg Arg Val Lys His
20 25 30
atc acg ggg cga agt gcc ttc ttc tca tat tac gga tat ggc tgc tac 144
Ile Thr Gly Arg Ser Ala Phe Phe Ser Tyr Tyr Gly Tyr Gly Cys Tyr
35 40 45
tgt ggg ctt ggg gat aaa ggg atc ccc gtg gat gac act gac agg cac 192
Cys Gly Leu Gly Asp Lys Gly Ile Pro Val Asp Asp Thr Asp Arg His
50 55 60
agc ccc tca tct ccc tct ccc tac gag aag ctg aag gag ttc agc tgc 240
Ser Pro Ser Ser Pro Ser Pro Tyr Glu Lys Leu Lys Glu Phe Ser Cys
65 70 75 80
cag cct gtg ttg aac agc tac cag ttc cac atc gtc aat ggc gca gtg 288
Gln Pro Val Leu Asn Ser Tyr Gln Phe His Ile Val Asn Gly Ala Val
85 90 95
gtt tgt gga tgc acc ctt ggt cct ggt gcc agc tgc cac tgc agg ctg 336
Val Cys Gly Cys Thr Leu Gly Pro Gly Ala Ser Cys His Cys Arg Leu
100 105 110
aag gcc tgt gag tgt gac aag caa tcc gtg cac tgc ttc aaa gag agc 384
Lys Ala Cys Glu Cys Asp Lys Gln Ser Val His Cys Phe Lys Glu Ser
115 120 125
ctg ccc acc tat gag aaa aac ttc aag cag ttc tcc agc crg ccc agg 432
Leu Pro Thr Tyr Glu Lys Asn Phe Lys Gln Phe Ser Ser Xaa Pro Arg
130 135 140
tgt ggc aga cat aag ccc tgg tgc tag 459
Cys Gly Arg His Lys Pro Trp Cys *
145 150

```

WO 03/039475

PCT/US02/35824

```

<210> 15
<211> 152
<212> PRT
<213> Homo Sapien
.
<400> 15
Met Leu Ile Ala Thr Ser Phe Phe Leu Phe Phe Ser Ser Val Val Ala
1          5          10          15
Ala Pro Thr His Ser Ser Phe Trp Gln Phe Gln Arg Arg Val Lys His
20          25          30
Ile Thr Gly Arg Ser Ala Phe Phe Ser Tyr Tyr Gly Tyr Gly Cys Tyr
35          40          45
Cys Gly Leu Gly Asp Lys Gly Ile Pro Val Asp Asp Thr Asp Arg His
50          55          60
Ser Pro Ser Ser Pro Ser Pro Tyr Glu Lys Leu Lys Glu Phe Ser Cys
65          70          75          80
Gln Pro Val Leu Asn Ser Tyr Gln Phe His Ile Val Asn Gly Ala Val
85          90          95
Val Cys Gly Cys Thr Leu Gly Pro Gly Ala Ser Cys His Cys Arg Leu
100         105         110
Lys Ala Cys Glu Cys Asp Lys Gln Ser Val His Cys Phe Lys Glu Ser
115         120         125
Leu Pro Thr Tyr Glu Lys Asn Phe Lys Gln Phe Ser Ser Xaa Pro Arg
130         135         140
Cys Gly Arg His Lys Pro Trp Cys
145         150

```

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(43) International Publication Date
15 May 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/039475 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/67, 9/64, 15/68
- (21) International Application Number: PCT/US2002/035824
- (22) International Filing Date: 7 November 2002 (07.11.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/344,552 7 November 2001 (07.11.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): SILOS-SANTIAGO, Inmaculada [ES/US]; 2123 De Mayo Road, Del Mar, CA 92014 (US).
- (74) Agents: PAGLIERANI, Paul, J. et al.; Millennium Pharmaceuticals, Inc., 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, 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: 25 March 2004



WO 2003/039475 A3

(54) Title: METHODS OF IDENTIFYING AND USING MODULATORS OF FRACTALKINE RECEPTOR

(57) Abstract: The present invention relates to methods for the diagnosis and treatment of a urological disorder or urological disorders. Specifically, the present invention identifies the differential expression of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 genes in tissues relating to urological disorder, relative to their expression in normal, or non-urological disorder disease states, and/or in response to manipulations relevant to a urological disorder. The present invention describes methods for the diagnostic evaluation and prognosis of various urological diseases, and for the identification of subjects exhibiting a predisposition to such conditions. The invention also provides methods for identifying a compound capable of modulating a urological disorder or urological disorders. The present invention also provides methods for the identification and therapeutic use of compounds as treatments of urological disorders.

【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)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(43) International Publication Date
15 May 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/039475 A3

- (51) International Patent Classification⁷: C12N 15/67, 9/64, 15/68
- (21) International Application Number: PCT/US2002/035824
- (22) International Filing Date: 7 November 2002 (07.11.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/544,552 7 November 2001 (07.11.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): SILOS-SANTIAGO, Inmaculada [ES/US]; 2123 De Mayo Road, Del Mar, CA 92014 (US).
- (74) Agents: PAGLIERANI, Paul, J. et al.; Millennium Pharmaceuticals, Inc., 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, 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: 25 March 2004
- (48) Date of publication of this corrected version: 13 May 2004
- (15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 20/2004 of 13 May 2004, Section II
- 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 2003/039475 A3

(54) Title: METHODS OF IDENTIFYING AND USING MODULATORS OF FRACTALKINE RECEPTOR

(57) Abstract: The present invention relates to methods for the diagnosis and treatment of a urological disorder or urological disorders. Specifically, the present invention identifies the differential expression of 313, 333, 5464, 18817 or 33524 genes in tissues relating to urological disorder, relative to their expression in normal, or non-urological disorder disease states, and/or in response to manipulations relevant to a urological disorder. The present invention describes methods for the diagnostic evaluation and prognosis of various urological diseases, and for the identification of subjects exhibiting a predisposition to such conditions. The invention also provides methods for identifying a compound capable of modulating a urological disorder or urological disorders. The present invention also provides methods for the identification and therapeutic use of compounds as treatments of urological disorders.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/38824
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 15/07, 9/04, 15/08 US CL. : 485/6, 7.31; 514/329; 586/25.5 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) U.S. : 485/6, 7.31; 514/329; 586/25.5 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 practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/53776 A2 (MOUNT SINAI HOSPITAL) 14 September 2000, see page 84, lines 26-34, and page 85, lines 8-11 and 23-29, claims 12, 22-23, 25-26 and 31, pages 21-24, section 4.2; sections 4.3, pages 24-27, see entire document.	1-13
X, P	US 6,476,054 B1 (CALDWELL et al) 05 November 2002, see title, abstract, claims, column 74, lines 9-26, column 64, lines 32-60, and entire document.	1-13
X	WO 01/60406 A1 (MELLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 23 August 2001, see page 10, lines 12-22, page 10, lines 24-30, page 17, lines 25-30, pages 18-24, therapeutic methods page 24, line 15 through page 27, lines 16, and entire document.	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"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	
"A" Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"B" Earlier document published on or after the international filing date	"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	
"I" Document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)	"G" Document member of the same patent family	
"O" Document referring 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		
Date of the actual completion of the international search 08 APRIL 2003	Date of mailing of the international search report 09 JUN 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 805-2830	Authorized officer GINNY FORTNER <i>Ginny Fortner</i> Telephone No. (703) 808-0168	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/85824
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,140,349 A1 (CALDWELL et al) 31 October 2000, see title, abstract, col. 71, lines 29-67 and col. 72, lines 1-48, col. 71, line 4, and entire document	1-13
X	US 6,172,113 B1 (OHTANI et al) 09 January 2001, see title, abstract, column 10, lines 33-56, col. 1, lines 25-40, col. 1, lines 61-65, and entire document	1-13
X	US 6,103,469 A1 (HAWKINS et al) 15 August 2000, see title, abstract, col. 4, lines 5-9, col. 4, lines 64-67, col. 5, lines 1-2, col. 17, lines 13-67 through col. 18, line 14, col. 19, lines 20-45, col. 21, lines 11-59, col. 22, lines 63-67, col. 23, lines 1-36 and entire document	1-13
X	US 6,008,344 A1 (BENNETT et al) 28 December 1999, see title, abstract, col. 34, lines 43-65, col. 35, lines 27-67, col. 36, lines 1-20, cols. 39-40, col. 5, lines 44-65 and entire document	1-13
X,P	US 6,383,746 B1 (GUIGNARD et al) 07 May 2002, see title, abstract and entire document	1-13
X,P	US 6,458,549 B2 (MAESAKA) 01 October 2002, see title, abstract, claims and entire document	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/35824

B. FIELDS SEARCHED
Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used)

WEST, DERWENT, JPO, EPO, FGPE, TDBD

search terms: fractalkine, ccr2, pgd-2, human phospholipase, hyperplasia, cancer, inhibitor, modulator, blocker, antagonist.

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 K 48/00	A 6 1 P 13/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 13/00	A 6 1 P 13/02	
A 6 1 P 13/02	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 13/08	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	C 1 2 N 15/00	A
G 0 1 N 33/50	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, 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, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 シロス - サンチアゴ, インマキュラーダ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 1 4, デル マー, デ メイヨ ロード 2 1 2 3

Fターム(参考) 2G045 CB01 DA13 DA14 FB12

4B024 AA01 AA11 CA01 CA04 CA11 DA02 EA04 GA11 HA12

4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR33 QR42 QR55 QR59 QR62

QR77 QR80 QS05 QS25 QS34 QS36 QX02

4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 NA14 ZA81 ZA84

ZB26

4C085 AA32 EE01

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZA84 ZB26