(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2005-507664
(P2005-507664A)
(43)公表日　平成17年3月24日(2005.3.24)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12Q 1/02	C12Q 1/02	ZNA	2G045
A61K 31/7088	A61K 31/7088		4B024
A61K 38/00	A61K 39/395	D	4B063
A61K 39/395	A61K 39/395	N	4C084
A61K 45/00	A61K 45/00		4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 136 頁）　最終頁に続く

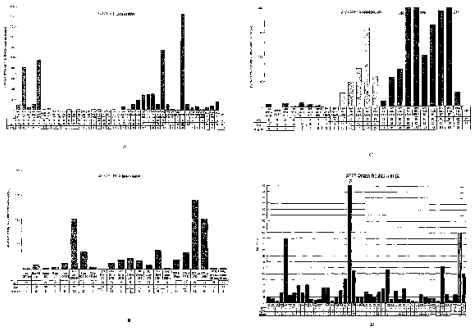
(21)出願番号　特願2003-539514(P2003-539514)
(86)(22)出願日　平成14年10月28日(2002.10.28)
(85)翻訳文提出日　平成16年2月5日(2004.2.5)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/034565
(87)国際公開番号　WO2003/037164
(87)国際公開日　平成15年5月8日(2003.5.8)
(31)優先権主張番号　60/335,251
(32)優先日　平成13年10月31日(2001.10.31)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500287639
ミレニアム・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
ＭＩＬＬＥＮＮＩＵＭ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国０２１３９マサチューセッツ州ケンブリッジ、ランズタウン・ストリート４０番
(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】２７７７を使用する血液学的障害の診断および処置のための方法および組成物

(57)【要約】
本発明は、血液学的障害（再生不良性貧血、血友病、鎌状赤血球貧血、サラセミア、血液損失および他の血液障害（例えば、骨髄照射処置もしくは化学療法処置または腎不全に関連する血液障害）を含むが、これらに限定されない）の処置および診断のための方法および組成物に関する。本発明はさらに、血液学的障害を処置し得る化合物を同定するための方法を提供する。本発明はまた、造血細胞活性を調節し得る化合物を同定するための方法を提供する。なおさらに、本発明は、造血細胞活性を調節するための方法を提供する。さらに、本発明は、異常な２７７７ポリペプチド活性または異常な２７７７核酸発現によって特徴づけられる血液学的障害を有する被験体を処置するための方法を提供する。別の局面において、本発明は、被験体において造血細胞増殖を増大させるための方法、および被験体において造血細胞アポトーシスを調節するための方法を提供する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
血液学的障害を処置し得る化合物を同定するための方法であって、該方法は、化合物が２７７７核酸発現または２７７７ポリペプチド活性を調節する能力をアッセイし、それによって、血液学的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】
造血を調節し得る化合物を同定するための方法であって、該方法は、以下：
（ａ）２７７７を発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程；ならびに
（ｂ）該試験化合物が、２７７７核酸の発現または２７７７ポリペプチドの活性を調節する能力をアッセイし、それによって、造血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】
細胞において造血を調節するための方法であって、該方法は、細胞を２７７７調節因子と接触させ、それによって、該細胞において造血を調節する工程を包含する、方法。
【請求項４】
前記細胞が、造血細胞である、請求項２に記載の方法。
【請求項５】
前記２７７７調節因子が、有機低分子、ペプチド、抗体または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２７７７調節因子が、２７７７ポリ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２７７７調節因子が、有機低分子、ペプチド、抗体または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２７７７調節因子が、２７７７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２７７７ポリペプチド活性または異常な２７７７核酸発現によって特徴付けられる血液学的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、該被験体に２７７７調節因子を投与し、それによって血液学的障害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、前記血液学的障害が、癌についての骨髄照射から生じる障害もしくは化学療法処置から生じる障害、悪性貧血、出血性貧血、溶血性貧血、再生不良性貧血、鎌状赤血球貧血、鉄芽球性貧血、マラリア感染、トリパノソーマ症感染、ＨＩＶ感染、ヘルペスウイルス感染または他のウイルス感染のような慢性感染に関連する貧血、骨髄欠損によって引き起こされる骨髄ろう性貧血、貧血から生じる腎不全、貧血、赤血球増加症（Ｐｏｌｙｃｅｔｈｅｍｉａ）、感染性単核球症（ＩＭ）、急性非リンパ性白血病（ＡＮＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、急性前骨髄球性白血病（ＡＰＬ）、急性骨髄単球性白血病（ＡＭＭｏＬ）、真性赤血球増加症（Ｐｏｌｙｃｅｔｈｅｍｉａ Ｖｅｒａ）、リンパ腫、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性白血病、ウィルムス腫瘍、ユーイング肉腫、網膜芽細胞腫、血友病、血栓症のリスクの増大と関連する障害、ヘルペスと関連する障害、サラセミア（Ｔｈａｌｅｓｓｅｍｉａ）と関連する障害、抗体媒介性障害（例えば、輸血反応および赤芽球症）、赤血球に対する機械的損傷（例えば、細血管異常性溶血性貧血、血栓性血小板減少性紫斑病および汎発性血管内凝固症候群）、寄生生物（例えば、プラスモディウム属）による感染、（例えば、鉛中毒による）化学的損傷、ならびに脾機能亢進症、からなる群より選択される、方法。
【請求項１１】
前記２７７７調節因子が、薬学的に受容可能な処方物で投与される、請求項９に記載の方

法。
【請求項１２】
前記２７７７調節因子が、有機低分子、ペプチド、抗体または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１３】
前記２７７７調節因子が、２７７７ポリ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】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、米国特許仮出願第６０／３３５，２５１号（２００１年１０月３１日出願）に対して優先権を主張し、その内容全体は、本明細書に参考として援用される。
【背景技術】
【０００２】
血液学的障害は、血液関連障害である。血液は、高度に特殊化した組織であり、身体の全ての部分に酸素および栄養物を運び、そして老廃物を肺、腎臓および肝臓に廃棄のために戻す。従って、血液は、身体の異なる部分間の連絡を維持する。血液はまた、免疫系の不可欠な部分であり、体液および温度バランス、特定の機能のための水力学的流体ならびにホルモンメッセージのための主要経路として重要である。
【０００３】
成体における全ての血球は、骨髄で産生される。赤血球、白血球および血小板は、骨（特に、椎骨、肋骨、股関節部、頭蓋、および胸骨）の骨髄で産生される。これらの必須の血球は、感染と戦い、酸素を運搬し、そして出血制御を補助する。具体的には、赤血球は、ヘモグロビンを含有する円盤形の細胞である。ヘモグロビンは、これらの細胞が、酸素を拾い上げ、全身に運搬するのを可能にする。白血球は、感染に対する身体の主要な防御手段である。これらは、血流から飛び出し、侵入を受けた組織に達し得る。血小板は、血管における小さな穴を塞ぐための塊を形成することによって、出血を制御し、凝血プロセスにおいて補助する小さな血球である。
【０００４】
日々、骨髄は、数十億もの十分に分化した機能性血球を生成し、そして循環中に放出する。造血は、血球が、骨髄中の多能性幹細胞から発達しそして分化するプロセスである。これらの細胞の産生は、少量貯蔵された休止状態の前駆細胞（ほとんどの原始幹細胞および他のより原始的でないがなお未成熟の前駆体を含む）に由来する。ほとんどの原始幹細胞は、全ての血液直系を含む数十億の細胞を生成する能力を有する。このような多数の細胞の産生は、その後の分化段階と結合した膨大な増殖により達成され、成熟細胞のバランスのとれた産生に至る。
【０００５】
造血系による成熟血球の産生は、可溶性因子と、骨髄微小環境と、造血前駆体との間の複雑な相互作用を含む。特に、造血は、その標的細胞上の膜結合レセプターを介して作用するポリペプチド増殖因子の複雑な相互作用を含む。増殖因子によるシグナル伝達は、しばしば直系特異的および／または段階特異的である特定の増殖因子に応じて、細胞増殖および細胞分化を生じる。幹細胞からの単一の細胞型（例えば、赤血球）の発達は、適切な順番で作用する複数の増殖因子の調和した作用を必要とし得る。
【０００６】
血球産生の減少は、幹細胞または前駆細胞の増殖および分化が妨害される場合に起こる。血球産生の減少は、血液学的障害の原因である。血球産生の減少により生じるいくつかのより一般的な疾患（すなわち、血液学的障害）としては、再生不良性貧血、低形成貧血、赤芽球ろうおよび腎不全または内分泌障害に関連する貧血が挙げられる。赤芽球の増殖および分化における障害としては、ＤＮＡ合成における欠損（例えば、ビタミンＢ１２または葉酸の利用の減少）および巨赤芽球性貧血、ヘムまたはグロビンの合成における欠損、

ならびに未知の起源の貧血（例えば、鉄芽球性貧血）、慢性の感染（例えば、マラリア、トリパノソーマ症、ＨＩＶ、肝炎ウイルスまたは他のウイルス）に関連する貧血、および骨髄損傷により生じる骨髄ろう性貧血が挙げられる。血球産生の減少はまた、骨髄照射または化学療法処置を受ける、がん患者および他の自己免疫疾患患者に影響を及ぼす。

【０００７】

従って、血液学的障害は、悪性および非悪性の両方の多数の疾患の臨床的および研究的局面を含む多様なファミリーの障害である。いくらかの進歩が、血液学的障害と闘うための診断ストラテジーおよび治療ストラテジーにおいてなされてきたが、分子の進歩は、治療の進歩を超える速度で継続している。従って、既知の分子の進歩に基づく血液学的障害の診断および処置のための新規な方法が、この分野において緊急に必要とされる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

本発明は、血液学的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。本発明は、少なくとも部分的に、２７７７遺伝子が、造血細胞において高レベルで発現されるという発見に基づく。詳細には、２７７７は、インビトロおよびインビボの両方で赤血球系細胞において有意に発現される。２７７７はまた、インビボで赤血球系前駆（ＢＦＵ－Ｅ）細胞およびグリコホリンＡポジティブｌｏ（ＧＰＡ－ｌｏ）細胞において発現されるが、インビボでグリコホリンＡポジティブ－ｈｉ（ＧＰＡ－ｈｉ）細胞では発現されない（図１を参照のこと）。２７７７がメンバーであるファミリーに属するペプチダーゼは、ペプチドホルモンを分解することが公知であるので、造血細胞における２７７７の発現は、２７７７が、赤血球生成を調節する（例えば、刺激する）ペプチドホルモンの分解に関与するということを示す。従って、２７７７分子は、造血細胞活性の調節因子として機能し、そして造血細胞活性（例えば、造血細胞増殖）の調節および血液学的障害の処置のための標的および治療的薬剤として有用である。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

従って、本発明は、以下を含むがこれらに限定されない血液学的疾患の診断および処置のための方法を提供する：再生不良性貧血、血友病、鎌状赤血球貧血、サラセミア、血液損失および他の血液障害（例えば、増加した血圧）または骨髄照射処置、化学療法処置もしくは無防備（ｃｏｍｐｒｏｍｉｓｅｄ）腎臓機能に関連する血液障害。

【００１０】

１つの局面において、本発明は、血液学的障害（例えば、貧血またはサラセミア）を処置し得る化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、２７７７核酸発現または２７７７ポリペプチド活性を調節する化合物の能力をアッセイすることを包含する。１つの実施形態において、核酸発現または２７７７ポリペプチド活性を調節する化合物の能力は、造血細胞の増殖の調節を検出することにより決定される。別の実施形態において、核酸発現または２７７７ポリペプチド活性を調節する化合物の能力は、造血細胞のアポトーシスの調節を検出することにより決定される。

【００１１】

別の局面において、本発明は、血液学的活性（例えば、造血細胞増殖、分化または細胞死）を調節し得る化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、２７７７核酸またはポリペプチドを発現する細胞（例えば、造血細胞）を、試験化合物と接触させる工程、およびこの試験化合物が、２７７７核酸の発現または２７７７ポリペプチドの活性を調節する能力をアッセイする工程を包含する。

【００１２】

本発明の別の局面は、血液学的活性（例えば、造血細胞増殖、細胞分化または細胞死）を調節するための方法を提供する。この方法は、造血細胞を、有効量の２７７７調節因子（例えば、抗２７７７抗体、配列番号２のアミノ酸配列もしくはそのフラグメントを含む２７７７ポリペプチド、配列番号２のアミノ酸配列に少なくとも９０％同一であるアミノ酸

配列を含む２７７７ポリペプチド、配列番号２のアミノ酸配列からなるポリペプチドの単離された天然に存在する対立遺伝子改変体、低分子、アンチセンス２７７７核酸分子、配列番号１の核酸分子もしくはそのフラグメント、またはリボザイム）と接触させる工程を包含する。

【００１３】

なお別の局面において、本発明は、血液学的障害（例えば、異常な２７７７ポリペプチド活性または異常な２７７７核酸発現により特徴付けられる血液学的障害（例えば、貧血またはサラセミア））を有する被験体を処置するための方法を特徴とする。この方法は、この被験体に、治療有効量の２７７７調節因子を、例えば薬学的に受容可能な処方物で、または遺伝子治療ベクターを使用して投与する工程を包含する。本発明のこの局面の実施形態は、低分子である２７７７調節因子、抗２７７７抗体、配列番号２のアミノ酸配列もしくはそのフラグメントを含む２７７７ポリペプチド、配列番号２のアミノ酸配列に少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む２７７７ポリペプチド、配列番号２のアミノ酸配列からなるポリペプチドの単離された天然に存在する対立遺伝子改変体、アンチセンス２７７７核酸分子、配列番号１の核酸分子もしくはそのフラグメント、またはリボザイムを含む。

【００１４】

別の局面において、本発明は、造血細胞増殖を調節するために有効な量の２７７７調節因子を被験体に投与することにより、この被験体における造血細胞の増殖を調節する（例えば、増加するかまたは減少する）ための方法を提供する。

【００１５】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかとなる。

【００１６】

真核生物細胞において、プロテオソームにより生成される細胞質ゾルペプチドの大部分は、種々のクラスのペプチダーゼにより完全な分解を受ける。タンパク質分解のこのプロセスは、細胞の構造および機能に不可欠なホメオスタシス機構の一部である（Ｐａｒｔａｒｏ，Ｆ．Ｃ．Ｖ．，ら（２００１）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２６８：８８７－８９４）。Ｔｈｉｍｅｔオリゴペプチダーゼ（「２７７７」）は、メタロペプチダーゼＭ３ファミリーの公知の亜鉛依存性ペプチダーゼメンバーである（Ｏｌｉｖｅｉｒａ，Ｖ．ら（２００１）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２９２：２５７－２６５）。この酵素は、真のペプチダーゼであり、そして短い（２０残基未満）の基質のみを切断する（Ｓｍｉｔｈ、Ａ．Ｉ．、ら（２０００）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓａｃ．２８（４）：４３０－４３４）。

【００１７】

２７７７は、身体全体で細胞および組織において広く分布していることが公知である。特に、高レベルの２７７７は、脳、下垂体および精巣に局在化しており、より低いレベルで、肝臓、腎臓、脾臓および肺のような他の組織に局在化している（Ｓｍｉｔｈ、Ａ．Ｉ．ら（２０００）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓａｃ．２８（４）：４３０－４３４）。神経ペプチド含有量が豊富な領域における２７７７の分布は、生体活性ペプチドのプロセシング／代謝におけるこの酵素の役割と一致する。実際、研究により、２７７７が、生物学的に活性な神経ペプチドであるニューロテンシン（「ＮＴ」）を、加水分解することが示されており、インビトロおよびインビボでの実験は、ＮＴ分解が、２７７７インヒビターによりブロックされ得ることを示した（Ｏｌｉｖｅｉｒａ、Ｖ．、ら（２００１）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２９２：２５７－２６５）。

【００１８】

しかし、２７７７の遍在する分布は、オリゴペプチダーゼ代謝におけるこの酵素の全体的な機能（すなわち、多数の生物学的に重要なペプチドの中枢および末梢の調節の両方における役割）を支持する。研究により、２７７７が、ジノルフィン、ゴナドロピン放出ホルモン（ＧｎＲＨ）、およびサブスタンスＰを含む多くの生物学的に活性なペプチド（ＮＴ

を除く）をインビトロで分解または生成し得ることが示された（ＭｃＣｏｏｌ，Ｓ．Ｐｉｅｒｏｔｔｉ，Ａ．（２０００）ＤＮＡ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１９（１２）：７２９－７３８）。２７７７はまた、いくつかの生理学的に重要なプロセスにも関与している。例えば、新規オピオイドレセプターリガンドであるノシセプチン（ｎｏｃｉｃｅｐｔｉｎ）を含む、多くのオピオイドペプチドは、この酵素の基質である（ＭｃＣｏｏｌ、Ｓ．Ｐｉｅｒｏｔｔｉ、Ａ．（２０００）ＤＮＡ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１９（１２）：７２９－７３８）。

【００１９】

本発明は、少なくとも一部、これまで知られていなかった、造血細胞における２７７７の発現に基づく。詳細には、本発明は、２７７７が、インビトロおよびインビボの両方で、赤血球系の細胞において高レベルで発現されることを示す。赤血球系細胞培養は、発達の６日目まで、２７７７発現のレベルの増加を示す（図１を参照のこと）。２７７７はまた、赤血球系前駆体（「ＢＦＵ－Ｅ」）細胞およびグリコホリンＡポジティブ－ｌｏ（「ＧＰＡ－ｌｏ」）のインビボ細胞集団において高レベルで発現されるが、ＧＰＡ－ｈｉインビボ細胞集団においては低レベルで発現される。器官リサイタル実験において、２７７７は、脳、ＨＵＶＥＣ細胞、および赤血球系細胞において高レベルで発現された（図１を参照のこと）。グリコホリンＡタンパク質は、後期赤血球系特異的タンパク質として知られている。ＧＰＡ－ｌｏ細胞集団における２７７７の顕著な発現、およびＧＰＡ－ｈｉ細胞集団における２７７７の相対的な非発現は、２７７７が、赤血球生成を刺激するペプチドホルモンを分解することを示す。赤血球生成の調節は、血液学的障害の重要な局面であるので、２７７７の調節は、これらの障害の処置において、重要な治療手段である。従って、本発明は、血液学的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。

【００２０】

本明細書中で使用される場合、「血液学的障害」は、造血細胞または組織に影響を及ぼす、疾患、障害、または状態を含む。血液学的障害は、異常な血液学的含有量または機能に関連する疾患、障害、または状態を含む。血液学的障害は、２７７７活性の誤調節（例えば、ダウンレギュレーションまたはアップレギュレーション）により特徴付けられ得る。血液学的障害の例としては、以下が挙げられる：癌のための骨髄照射処置または化学療法処置から生じる障害、悪性貧血、出血性貧血、溶血性貧血、再生不良性貧血、鎌状赤血球貧血、鉄芽球性貧血のような障害、マラリア、トリパノソーマ症、ＨＩＶ、肝炎ウイルスまたは他のウイルスのような慢性の感染に関連する貧血、骨髄欠損により生じる骨髄ろう性貧血、貧血から生じる腎不全、貧血、赤血球増加症、伝染性単核球症（ＩＭ）、急性非リンパ性白血病（ＡＮＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、急性前骨髄球性白血病（ＡＰＬ）、急性骨髄単球性白血病（ＡＭＭｏＬ）、真性赤血球増加症、リンパ腫、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性白血病、ウィルムス腫、ユーイング肉腫、網膜芽細胞腫、血友病；血栓症、ヘルペス、サラセミアの増加したリスクに関連する障害、輸血反応および赤芽球症のような抗体媒介障害、細血管異常性溶血性貧血、血栓性血小板減少性紫斑病および汎発性血管内凝固症候群のような赤血球に対する機械的損傷、プラスモディウム属のような寄生虫による感染、例えば鉛中毒からの化学的損傷ならびに脾機能亢進症。

【００２１】

本明細書中で使用される場合、「２７７７」は、シグナル伝達を調節し、それによりインビトロまたはインビボで、造血細胞の増殖またはアポトーシスを調節する能力により特徴付けられるタンパク質を包含する。代表的なヒト２７７７ｃＤＮＡ配列は、本明細書中に配列番号１で示され、そして対応するアミノ酸配列は、配列番号２で示される。コード配列は、配列番号３で示される。当業者は、示された配列が、ヒト２７７７遺伝子の単一の対立遺伝子に対応すること、および対立遺伝子バリエーションの存在が予測されることを認識する。対立遺伝子改変体は、サイレント変異を含む改変体、および変異がアミノ酸配列変化をもたらす改変体を含む。当業者が、例えば、代替のコドンを使用するヌクレオチド配列の操作を容易にする部位を操作すること、アミノ酸配列において保存的変化を生じ

るようにコドンを置換することなどにより、さらなる改変体を生成し得ることもまた明らかである。対立遺伝子改変体２７７７および操作された改変体２７７７の使用は、本発明に企図される。非ヒト種由来の２７７７分子の使用もまた本発明により企図される。

【００２２】

本発明は、血液学的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。本発明の方法に従って同定された２７７７調節因子を使用して、造血細胞増殖を調節し得、従って、これらの２７７７調節因子は、血液学的障害を処置または診断する際に有用である。例えば、２７７７分子の活性の阻害（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を使用して同定された２７７７調節因子を使用する）は、増加した造血細胞増殖を生じ得、従って、被験体における増加した血球産生を生じ得、それにより被験体における再生不良性貧血または鎌状赤血球貧血のような血液学的障害を防止する。

【００２３】

あるいは、２７７７分子の活性の刺激（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を使用して同定された２７７７調節因子を使用する）は、減少した造血細胞増殖を生じ得、従って、被験体における減少した血球産生を生じ得、それにより被験体における出血性貧血、赤血球増加症（ｐｏｌｙｃｅｔｈｅｍｉａ）、伝染性単核球症または白血病のような血液学的障害を防止する。

【００２４】

本明細書中において交換可能に使用される、「２７７７活性」、「２７７７の生物学的活性」、または「２７７７の機能的活性」は、標準的技術に従って、インビボまたはインビトロで決定された場合に、２７７７応答性の細胞もしくは組織（例えば、造血細胞）、または２７７７タンパク質基質に対して、２７７７タンパク質、２７７７ポリペプチドまたは２７７７核酸分子により及ぼされる活性を含む。２７７７活性は、２７７７標的分子との会合のような直接的活性であり得る。本明細書中で使用される場合、「基質」または「標的分子」または「結合パートナー」は、２７７７タンパク質がその分子に結合するかまたは本質的に相互作用して、その結果２７７７媒介機能（例えば、アポトーシスの調節または細胞増殖の調節）が達成される分子である。２７７７標的分子は、非２７７７分子であり得るか、または２７７７タンパク質もしくは２７７７ポリペプチドであり得る。このような標的分子の例としては、２７７７タンパク質と同じシグナル伝達経路にあるタンパク質、例えば、造血細胞の増殖またはアポトーシスの調節を含む経路において２７７７タンパク質の上流で機能しても（活性の刺激因子およびインヒビターの両方を含む）、下流で機能してもよいタンパク質が挙げられる。あるいは、２７７７活性は、間接的な活性（例えば、２７７７タンパク質と２７７７標的分子との相互作用により媒介される細胞シグナル伝達活性）である。２７７７の生物学的活性は、本明細書中に記載される。例えば、２７７７タンパク質は、以下の活性の１つ以上を有し得る：（１）造血細胞増殖を調節する；（２）造血細胞のアポトーシスを調節する；および（３）赤血球生成に関与するペプチドホルモンの分解を調節する。

【００２５】

本明細書中で使用される場合、用語「造血細胞」は、卵黄嚢幹細胞、原始赤血球系細胞、胎児肝細胞、胎児脾細胞、胎児骨髄細胞、非胎児骨髄細胞、巨核球、幹細胞、リンパ系幹細胞、骨髄性幹細胞、前駆細胞、前駆（ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ）リンパ球、前駆Ｔリンパ球、前駆Ｂリンパ球、前駆赤血球、前駆好中球、前駆好酸球、前駆好塩基球、前駆単球、前駆肥満細胞、前駆血小板、前駆（ｃｏｍｉｔｔｅｄ）リンパ球、前駆Ｔリンパ球、前駆Ｂリンパ球、前駆赤血球、前駆好中球、前駆好中球、前駆好塩基球、前駆単球、前駆肥満細胞、前駆血小板、分化したリンパ球、分化したＴリンパ球、分化したＢリンパ球、分化した赤血球、分化した好中球、分化した好酸球、分化した好塩基球、分化した単球、分化した肥満細胞、分化した血小板、成熟リンパ球、成熟Ｔリンパ球、成熟Ｂリンパ球、成熟赤血球、成熟好中球、成熟好酸球、成熟好塩基球、成熟単球、成熟肥満細胞、および成熟血小板を含む。

【００２６】

本明細書中で使用される場合、用語「前駆細胞」は、分化および増殖により完全に分化した機能的子孫を生成する能力を有する任意の体細胞を含む。前駆細胞は、任意の組織又は器官系（血液、神経、筋肉、皮膚、消化管、骨、腎臓、肝臓、膵臓、胸腺などを含むがこれらに限定されない）由来の前駆体を含む。前駆細胞は、「前駆（ｃｏｍｍｉｔｔｅｄ）細胞」および「分化した細胞」とはさらに区別され、増殖する能力を有していても有さなくてもよい細胞、すなわち、自己複製するが、通常の生理学的条件下で異なる細胞型へと更なる分化を受けることができない細胞として規定される。さらに、前駆体細胞は、がん細胞（特に白血病細胞）のような異常な細胞とは区別され、増殖する（自己複製する）が、未成熟または未分化のようであるにもかかわらず一般的にはさらに分化しない。

【００２７】

前駆細胞は、分化および増殖の系統において、ほとんど分化したかまたは完全な成熟細胞の前にある全ての細胞を含む。従って、例えば、前駆体としては、成体における皮膚前駆体が挙げられる。この細胞は、１つのみの細胞型へと分化し得るが、それ自体は、十分に成熟していないかまたは十分に分化していない。成熟した、機能的血球の産生は、「単一機能性前駆体」（すなわち、１つのみの血球型を生成する能力を有する前駆体）の増殖および分化により生じる。赤血球産生については、「ＣＦＵ－Ｅ」（コロニー形成単位－赤血球系）と呼ばれる前駆体は、２～３２の子孫細胞を生成する能力を有する。

【００２８】

種々の他の造血前駆体が、特徴付けられている。例えば、造血前駆細胞としては、最大８個の異なる成熟造血細胞系統を生じる、分化および増殖の連続的なサイクルを行い得る細胞が挙げられる。造血スペクトルの最も初期または非分化段階において、造血前駆細胞は、造血「幹細胞」を含む。これらの稀な細胞（骨髄において、１０，０００細胞中に１個から１００，０００細胞中に１個存在する）は各々、数十億個の全系統の成熟血球を生成する能力を有し、そして動物の一生にわたり、血球産生を維持する役割を担っている。これらは、主に休止状態で骨髄に存在し、そして自己再生と呼ばれるプロセスを通して同一の娘細胞を形成し得る。従って、このような非専任的な前駆細胞は、「全能性（ｔｏｔｉｐｏｔｅｎｔ）」（すなわち、全ての型の成熟血球を産生するために必要十分である）として記載され得る。全ての血球系統を生成する能力を保持するが、自己再生し得ない前駆細胞は、「多潜能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ）」と呼ばれる。全てではないがいくつかの血液系統を産生し得、そして自己再生し得ない細胞は、「多能性（ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ）」と呼ばれる。

【００２９】

本明細書中で使用される場合、「造血細胞活性」は、造血細胞により発揮される活性または造血細胞において生じる活性を含む。例えば、このような活性としては、造血細胞の生理学的な役割に寄与する細胞プロセスが挙げられる（例えば、造血、しかし細胞増殖、分化、成長、移動、およびプログラムされた細胞死に限定されない）。

【００３０】

本明細書中で使用される場合、用語「調節する」は、記載される特定のパラメータ（例えば、２７７７活性）の変更（例えば、増加または減少）を含む。

【００３１】

本明細書中で使用される場合、用語「アポトーシス」は、当該分野で公知の技術を使用して特徴付けられ得るプログラムされた細胞死を含む。アポトーシス細胞死は、例えば、細胞の縮小、膜の小気胞化（ｂｌｅｂｂｉｎｇ）、および細胞断片化におけるクロマチン凝縮の終了により特徴付けられ得る。アポトーシスを受けた細胞はまた、ヌクレオソーム間ＤＮＡ切断の特徴的なパターンを示す。

【００３２】

（Ｉ．スクリーニングアッセイ）

本発明は、モジュレーターを同定するための方法（本明細書中で「スクリーニングアッセイ」ともいわれる）を提供する。すなわち、２７７７タンパク質に結合する候補化合物もしくは試験化合物または薬剤（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子、リボザイム

、または２７７７アンチセンス分子）は、２７７７発現または２７７７活性に対する刺激効果または阻害効果を有するか、あるいは、２７７７標的分子の発現または活性に対する刺激効果または阻害効果を有する。本明細書中に記載されるアッセイを使用して同定される化合物は、血液学的障害を処置するために有用であり得る。

【００３３】

候補／試験化合物としては、例えば、１）Ｉｇテール融合ペプチドならびにランダムペプチドライブラリー（例えば、Ｌａｍ，Ｋ．Ｓ．ら（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８２－８４；Ｈｏｕｇｈｔｅｎ，Ｒら（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８４－８６を参照のこと）およびＤ配置および／またはＬ配置のアミノ酸で構成されるコンビナトリアル化学誘導分子ライブラリーのメンバーを含む、ペプチド（例えば、可溶性ペプチド）；２）ホスホペプチド（例えば、ランダム縮重特異的ホスホペプチドライブラリーおよび部分縮重特異的ホスホペプチドライブラリー（例えば、Ｓｏｎｇｙａｎｇ，Ｚら（１９９３）Ｃｅｌｌ ７２：７６７－７７８）を参照のこと）のメンバー；３）抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体、および単鎖抗体、ならびに抗体のＦａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆａｂ発現ライブラリーフラグメント、およびエピトープ結合フラグメント）；ならびに４）有機低分子および無機低分子（例えば、コンビナトリアルライブラリーおよび天然産物ライブラリーから獲得される分子）が挙げられる。

【００３４】

本発明の試験化合物は、当該分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くのアプローチのいずれか（生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相ライブラリーまたは液相ライブラリー；デコンヴォルーション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クロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法を含む）を使用して獲得され得る。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、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適用可能である（Ｌａｍ、Ｋ．Ｓ．（１９９７）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．１２：１４５）。

【００３５】

分子ライブラリーの合成方法の例としては、例えば、当該分野では以下において見出され得る：ＤｅＷｉｔｔら（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．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；Ｃａｒｅｌｌら（１９９４）Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３３：２０６１；およびＧａｌｌｏｐら（１９９４）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：１２３３。

【００３６】

化合物のライブラリーは、溶液中で（例えば、Ｈｏｕｇｈｔｅｎ（１９９２）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：４１２－４２１）、あるいはビーズ（Ｌａｍ（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８２－８４）、チップ（Ｆｏｄｏｒ（１９９３）Ｎａｔｕｒｅ ３６４：５５５－５５６）、細菌（Ｌａｄｎｅｒ ＵＳＰ ５，２２３，４０９）、胞子（Ｌａｄｎｅｒ ＵＳＰ’４０９）、プラスミド（Ｃｕｌｌら（１９９２）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８９：１８６５－１８６９）またはファージ（ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０；Ｄｅｖｌｉｎ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：４０４－４０６；Ｃｗｉｒｌａら（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８７：６３７８－６３８２；Ｆｅｌｉｃｉ（１９９１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：３０１－３１０；Ｌａｄｎｅｒ前出）上で調製され得る。

【００３７】

２７７７活性を調節する化合物を同定するために使用され得るアッセイとしては、細胞アポトーシス（例えば、造血細胞アポトーシス）の間のミトコンドリアからのシトクロームＣ放出についてのアッセイ；（例えば、Ｂｏｓｓｙ－Ｗｅｔｚｅｌ　Ｅ．ら（２０００）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．３２２：２３５－４２に記載される）無細胞系において融合された各アポトーシスの細胞蛍光定量（例えば、Ｌｏｒｅｎｚｏ　Ｈ．Ｋ．ら（２０００）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．３２２：１９８－２０１）；アポトーシス性ヌクレアーゼアッセイ（例えば、Ｈｕｇｈｅｓ　Ｆ．Ｍ．（２０００）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．３２２：４７－６２に記載される）；フローサイトメトリーおよびレーザー走査サイトメトリー（例えば、Ｄａｒｚｙｎｋｉｅｗｉｃｚ　Ｚ．ら（２０００）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．３２２：１８－３９に記載される）による、アポトーシス性細胞（例えば、アポトーシス性造血細胞）の分析；アネキシンＶ標識によるアポトーシスの検出（例えば、Ｂｏｓｓｙ－Ｗｅｔｚｅｌ　Ｅ．ら（２０００）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．３２２：１５－１８に記載される）；細胞死遺伝子についての一過性トランスフェクションアッセイ（例えば、Ｍｉｕｒａ　Ｍ．ら（２０００）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．３２２：４８０－９２に記載される）；およびアポトーシス性細胞（例えば、アポトーシス性造血細胞）におけるＤＮＡ切断を検出するアッセイ（例えば、Ｋａｕｆｆｍａｎ　Ｓ．Ｈ．ら（２０００）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．３２２：３－１５に記載される）が挙げられる。

【００３８】

２７７７のペプチダーゼ活性（例えば、生物学的に活性なペプチドの２７７７による加水分解）を同定するために使用され得るアッセイとしては、Ｍｏｌｉｎａら（２０００）Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　６７：５０９－５２０において記載される蛍光分析酵素アッセイ（ｆｌｕｏｒｉｍｅｔｒｉｃ　ｅｎｚｙｍｅ　ａｓｓａｙ）；Ｍｏｌｉｎａら（２０００）Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　６７：５０９－５２０において記載される加水分解されたペプチドのＨＰＬＣ分析；Ｓａｒｉｃ，Ｔ．，ら（２００１）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６（３９）：３６４７４－３６４８１（２７７７活性を、クエンチされる蛍光生成基質を用いて分析した）において記載されるペプチダーゼアッセイ；Ｏｌｉｖｅｉｒａ，Ｖ．（２００１）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　４０：４４１７－４４２５において記載される速度論的アッセイ；Ｓｍｉｔｈ，Ａ．Ｉ．，ら（２０００）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｓｏｃｉｅｔｙ　２８（４）：４３０－４３４において記載されるペプチダーゼ活性（例えば、２７７７活性）の測定、および統計学的分析；ならびにＯｌｉｖｅｉｒａ，Ｖ．，（２００１）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ　２９２：２５７－２６５において記載される速度論的アッセイ、２７７７により切断される結合の決定およびアミノ酸分析（２７７７のアミノ酸組成および濃度を決定するため）が挙げられる。

【００３９】

２７７７活性を調節する化合物を同定するために使用され得る増殖アッセイとしては、米国特許第６，２３１，８８０号（その内容は、本明細書中で参考として援用される）において記載される、３２Ｄ細胞（多系統の（ｍｕｌｔｉ－ｌｉｎｅａｇｅ）マウス造血細胞株）を使用するアッセイが挙げられる。目的の増殖調節遺伝子（例えば、２７７７）が除去された細胞の増殖表現型を測定する細胞増殖アッセイは、Ｓｕｄｅｒｓｈａｎ，Ｃ．，ら（１９９８）Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．１７６：６７－７５において記載される。試験化合物が２７７７活性を調節する能力はまた、細胞分裂、タンパク質合成、核酸（ＤＮＡもしくはＲＮＡ）合成、核酸（主にＤＮＡ）フラグメント化およびアポトーシスのような細胞プロセスをモニタリングすることにより決定され得る。

【００４０】

１つの局面において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、このアッセイにおいて、造血細胞の増殖に関与すると考えられる２７７７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は、試験化合物と接触され、試験化合物が２７７７活性を調節する能力が、決定される。好ましい実施形態において、２７７７タンパク質の生物学的に活性な部分としては、造血細胞のアポトーシスを調節し得るドメインもしくはモチーフなら

びに／または造血細胞増殖を調節し得るドメインもしくはモチーフが挙げられる。その試験化合物が２７７７活性を調節する能力の決定は、例えば、２７７７を発現する細胞における１以上の特定の代謝産物の生成をモニタリングすること（例えば、Ｓａａｄａら（２０００）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２６９：３８２－３８６を参照のこと）によって、または細胞死、細胞増殖、もしくは細胞の細胞分化をモニタリングすることによって達成される。例えば、細胞は、哺乳動物起源の細胞（例えば、方向付けられた赤血球細胞または前駆体細胞のような造血細胞）であり得る。

【００４１】

試験化合物が、基質への２７７７結合を調節するかまたは２７７７に結合する能力もまた、決定され得る。試験化合物が基質に対する２７７７結合を調節する能力の決定は、例えば、放射性同位体標識または酵素標識を２７７７基質とカップリングすることにより達成され得、その結果、２７７７基質の２７７７への結合は、複合体中の標識２７７７基質を検出することによって決定され得る。あるいは、２７７７は、試験化合物が複合体における２７７７基質への２７７７結合を調節する能力をモニターするために、放射性同位体標識または酵素標識とカップリングされ得る。試験化合物が２７７７を結合する能力の決定は、例えば、その化合物を放射性同位体標識または酵素標識とカップリングすることにより達成され得、その結果、その化合物の２７７７に対する結合は、複合体における標識２７７７化合物を検出することによって決定され得る。例えば、２７７７基質は、^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、または^{3}Ｈで直接的または間接的に標識され得、放射性同位体は、放射線の直接計数により、またはシンチレーションカウンティングにより検出される。あるいは、化合物は、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的に標識され得、その酵素的標識は、適切な基質の生成物への変換の決定により検出され得る。

【００４２】

相互作用物質を何ら標識することなく、化合物が２７７７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、微量生理機能測定器（ｍｉｃｒｏｐｈｙｓｉｏｍｅｔｅｒ）が、化合物も２７７７もいずれも標識することなく、化合物と２７７７との相互作用を検出するために使用され得る（ＭｃＣｏｎｎｅｌｌ，Ｈ．Ｍ．ら（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５７：１９０６－１９１２）。本明細書中で使用される場合、「微量生理機能測定器」(例えば、細胞センサ)は、光指定可能電位差センサ（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機器である。この酸性化速度における変化は、化合物と２７７７との間の相互作用の指標として使用され得る。

【００４３】

２７７７モジュレーターが２７７７活性を調節（例えば阻害または増大）する能力はまた、アポトーシスおよび細胞増殖を増大または減少させるかいずれかのモジュレーターを同定するスクリーニングアッセイを通じて決定され得る。１つの実施形態において、本発明は、２７７７タンパク質または２７７７ポリペプチドを発現する細胞と、試験化合物とを接触させる工程、およびアポトーシスの形態的特徴について細胞を試験する工程を包含するスクリーニングアッセイを提供する。例えば、２７７７タンパク質または２７７７ポリペプチドを発現する細胞は、試験化合物と接触され得、アクリジンオレンジで核が染色され得る。その後、核ＤＮＡが抽出され得、Ｉｎｏｈｏｒａら，（１９９７）ＥＭＢＯ Ｊ．１６：１６８６－１６９４において記載されるように、ＤＮＡフラグメント化について分析され得る。

【００４４】

試験化合物が、２７７７発現を調節するか否かを決定するために、インビトロ転写アッセイが行われ得る。このようなアッセイを行うために、２７７７の全長プロモーターおよびエンハンサーが、レポーター遺伝子（例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ））に連結され得、宿主細胞に導入され得る。次いで、この同じ宿主細胞が、試験化合物でトランスフェクトされ得る。試験化合物の効果は、ＣＡＴ活性を試験し、このＣＡＴ活性を、試験化合物を含まない細胞におけるＣＡＴ活性と比較することに

よって測定され得る。ＣＡＴ活性における増大または減少は、２７７７発現の調節を示し、従って、試験化合物が造血細胞増殖を調節する能力の指標を示す。

【００４５】

なお別の実施形態において、本発明のアッセイは、無細胞アッセイであり、このアッセイにおいて、２７７７タンパク質またはその生物学的に活性な部分(例えば、２２個のアミノ末端アミノ酸なしの２７７７遺伝子)は、試験化合物と接触され、試験化合物が２７７７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能力またはその活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力が決定される。本発明のアッセイにおいて使用される２７７７タンパク質の好ましい生物学的に活性な部分は、非２７７７分子との相互作用に関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）を含む。試験化合物の２７７７タンパク質への結合は、上記のように、直接的または間接的に決定され得る。２７７７タンパク質が試験化合物に結合する能力の決定はまた、リアルタイム生体分子相互作用分析（ＢＩＡ）（Ｓｊｏｌａｎｄｅｒ，Ｓ．およびＵｒｂａｎｉｃｚｋｙ，Ｃ．（１９９１）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６３：２３３８－２３４５；Ｓｚａｂｏら（１９９５）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５：６９９－７０５）のような技術を使用して達成され得る。本明細書中で使用される場合、「ＢＩＡ」は、相互作用物質を何ら標識することなく、リアルタイムで生体特異的相互作用を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）の光学的現象における変化は、生体分子間のリアルタイム反応の指標として使用され得る。

【００４６】

本発明の上記のアッセイ方法の１を超える実施形態に置いて、２７７７または２７７７標的分子のいずれかを固定して、複合体化形態を、そのタンパク質の一方または両方の非複合体化形態から分離することを容易にすること、ならびにこのアッセイの自動化に適合させることが望ましい。試験化合物の２７７７タンパク質に対する結合、または試験化合物の存在下または非存在下における２７７７タンパク質と２７７７標的分子との相互作用は、反応物質を含むために適した任意の容器において達成され得る。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、および微量遠心管が挙げられる。１つの実施形態において、タンパク質の一方または両方がマトリクスに結合することを可能にするドメインが付加され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／２７７７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は、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に吸着され得る。次いで、これは、試験化合物と、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２７７７タンパク質のいずれかと合わされ得、この混合物は、複合体形成をもたらす条件下で（例えば、塩およびｐＨについての生理学的条件にて）インキュベートされ得る。インキュベートした後、そのビーズまたはマイクロタイタープレートウェルは洗浄されて、いずれの非結合成分も除去され、ビーズの場合にはマトリクスが固定化され、例えば、上記のように、直接的または間接的に複合体形成が決定される。あるいは、複合体は、マトリクスから解離され得、２７７７結合または活性のレベルが、標準的な技術を使用して決定され得る。

【００４７】

タンパク質をマトリクスに固定化するための技術はまた、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、２７７７タンパク質または２７７７標的分子のいずれかが、ビオチンとストレプトアビジンの結合を利用して固定化され得る。ビオチン化２７７７タンパク質または標的分子は、当該分野で公知の技術（例えば、ビオチン化キット、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を使用して、ビオチン－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシ－スクシンイミド）から調製され得、ストレプトアビジンコーティング９６ウェルプレート（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ）のウェルに固定化され得る。あるいは、２７７７タンパク質または標的分子と反応するが、２７７７タンパク質のその標的分子に対する結合を妨害しない抗体は、そのプレートのウェルに誘導体化され得

、非結合標的または２７７７タンパク質が、抗体結合によりウェル中に捕捉される。このような複合体を検出するための方法は、ＧＳＴ固定化複合体についての上記の方法に加えて、２７７７タンパク質または標的分子と反応する抗体を用いて、複合体を免疫検出すること、ならびに２７７７タンパク質または標的分子に関連する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

【００４８】

本発明のなお別の局面において、２７７７タンパク質またはそのフラグメント（例えば、アポトーシス活性の調節に関与すると考えられる２７７７タンパク質のＮ末端領域）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）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ 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、２７７７と結合または相互作用し、２７７７活性に関与する他のタンパク質（「２７７７結合タンパク質」または「２７７７－ｂｐ」）を同定するために「ベイト（ｂａｉｔ）タンパク質」として使用され得る。そのような２７７７結合タンパク質は、例えば、２７７７媒介性シグナル伝達経路の下流エレメントのような、２７７７タンパク質または２７７７標的によるシグナルの伝達に関与している可能性もある。あるいは、そのような２７７７結合タンパク質は、２７７７インヒビターである可能性がある。

【００４９】

このツーハイブリッドシステムは、ほとんどの転写因子のモジュラー型の性質に基づく。ほとんどの転写因子は、別個のＤＮＡ結合ドメインおよび活性化ドメインからなる。簡単に述べると、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、２７７７タンパク質をコードする遺伝子が、既知の転写因子（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。他の構築物において、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配列ライブラリー由来のＤＮＡ配列が、既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」タンパク質と「プレイ」タンパク質とがインビボで相互作用して２７７７依存性複合体を形成し得る場合、その転写因子のＤＮＡ結合ドメインと活性化ドメインとは、近接する。このように近くにあることにより、その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。そのレポーター遺伝子の発現が検出され得、そしてその機能的な転写因子を含む細胞コロニーが、単離され得、そして２７７７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遺伝子を得るために使用され得る。

【００５０】

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うちの２つ以上の組み合わせに関する。例えば、調節剤が、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、そしてその因子が２７７７タンパク質の活性を調節する能力が、例えば、動物（例えば、再生不良性貧血、鎌状赤血球貧血、サラセミアまたは鉄芽球性貧血についての動物モデル）においてインビボで確認され得る。使用され得る動物の例としては、例えば、化合物が、米国特許第６，２３１，８８０号（これはまた、ヒヒにおける造血性増殖因子により誘導される細胞増殖刺激を記載する)に記載される赤血球生成を刺激することにおいてインビトロ活性を有するか否かを試験するためのＣ５７マウスモデル；Ｉａｎｎｏｎｅ，Ｒ．ら（２００１）Ｂｌｏｏｄ ９７（１２）：３９６０－３９６５において記載される鎌状赤血球貧血についての骨髄移植のためのトランスジェニックマウスモデル；Ｓａｎｔｉａｇｏ，Ｓ．ら（２００１）Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ Ｐｒｏｃ．３３（４）：２６００－２６０２において記載される再生不良性貧血についてのラットモデル；Ｆｉｂａｃｈ，Ｅ．（２００１）Ｓｅｍｉｎ Ｈｅｍａｔｏｌ ３８（４）：３７４－３８１において記載される胎児ヘモグロビン刺激化合物についてスクリーニングするトランスジ

ェニック動物モデル；Ｉｋｅｈａｒａ，Ｓ．（２００１）Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ ２９：６６１－６６９（特に、栓球性紫斑（ｔｈｒｏｍｂｏｃｙｔｉｃ ｐｕｒｐｕｒａ）、血小板減少症、腎不全、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、溶血性貧血、シェーグレン症候群、慢性関節リウマチ、膵炎、唾液腺炎、自己免疫肝炎、心筋梗塞、インスリン非依存性糖尿病、非インスリン依存性糖尿病および巣状分節状糸球体硬化症（ｆｏｇａｌ ｓｅｇｍｅｎｔａｌ ｇｌｏｍｅｒｕｌａｒ ｓｃｌｅｒｏｓｉｓ）を有するマウスが記載される）において記載される造血幹細胞移植による自己免疫疾患の処置についてのマウスモデル；Ｍａｒｔｉｎｅｌｌ，Ｊ．，ら（１９８１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７８（８）：５０５６－５０６０において記載されるヒトサラセミアを生じるグロビン遺伝子変異を有する種類のマウスモデル；Ｙａｍａｍｏｔｏ，Ｍ．ら（２０００）Ｉｎｔｌ．Ｊ．Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ Ｒｅｖｉｅｗ ７２：１５７－１６４において記載されるＸ連鎖鉄芽球性貧血についての動物モデル；Ｍａｒｔｉｎ，Ｊ．Ｓ．ら（１９９５）Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７５２：３００－８において記載される貧血性卵黄嚢（ａｎｅｍｉｃ ｙｏｌｋ ｓａｃ）についてのマウスモデル；Ｎａｇｅｌ．Ｒ．Ｌ．（２００１）Ｂｒｉｔ Ｊ．Ｈｅｍａｔｏ．１１２：１９－２５（特に、マウスグロビンおよびヒトグロビン鎖の組み合わせを有するモデル、ＮＹＣ１モデル、Ｓ＋Ｓ Ａｎｔｉｌｌｅｓモデル、およびもっぱらヒトグロビン鎖を有するトランスジェニックモデルが記載される）において記載される鎌状赤血球貧血についての種々の動物モデル；Ｊｏｎｅｓ，Ｊ．Ｂ．およびＬａｎｇｅ，Ｒ．Ｄ．（１９８３）Ｅｘｐ．Ｈｅｍａｔｏｌ．１１（７）：５７１－５８０において記載されるおよび周期性造血の動物モデルが挙げられる。さらに、米国特許第６，２３１，８８０号において記載されるヒトβグロビン遺伝子座についてのトランスジェニックマウスが、使用され得る。

【００５１】

さらに、本明細書中に記載される同定された２７７７モジュレーター（例えば、アンチセンス２７７７核酸分子、２７７７特異的抗体、または低分子）は、このようなモジュレーターを使用した処置の効力、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同定された２７７７モジュレーターは、このようなモジュレーターの作用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。

【００５２】

（ＩＩ．予測医学：）

本発明はまた、予測医学の分野に関し、ここで診断アッセイ、予後アッセイ、および臨床試験のモニタリングは、予後（予測）目的のために、それにより予防的に個体を処置するために使用される。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）の状況において２７７７タンパク質および／または核酸発現、ならびに２７７７活性を決定し、それにより、個体が造血性障害に罹患し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、個体が造血性障害を発生する危険性があるか否かを決定するための予後（または予測）アッセイを提供する。例えば、２７７７遺伝子における変異は、生物学的サンプル中でアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後目的または予測目的のために、それにより、造血性障害を発症する前に個体を予防的に処置する使用され得る。

【００５３】

本発明の別の局面は、臨床試験における２７７７の発現または活性に対する２７７７モジュレーター（例えば、抗２７７７抗体または２７７７リボザイム）の影響をモニタリングすることに関する。

【００５４】

これらおよび他の薬剤は、以下の節においてさらに詳細に記載される。

【００５５】

Ａ．造血性障害についての診断アッセイ

被験体が、造血性障害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、その生物学的サンプルが、化合物または２７７７タンパク質もしくは

２７７７タンパク質をコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡもしくはゲノムＤＮＡ）を検出し得る薬剤と、生物学的サンプル中で接触され得る。２７７７　ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡを検出するための好ましい薬剤は、２７７７　ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡにハイブリダイズし得る標識核酸プローブである。その核酸プローブは、例えば、配列番号１に記載される２７７７核酸、またはその一部（例えば、長さが少なくとも１５、２０、２５、３０、２５、４０、４５、５０、１００、２５０または５００ヌクレオチドであって、ストリンジェントな条件下で２７７７　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な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ける使用に適切な他のプローブは、本明細書中に記載される。

【００５６】

サンプル中の２７７７タンパク質を検出するために好ましい薬剤は、２７７７タンパク質に結合し得る抗体、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、またはより好ましくは、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。用語「標識（された）」は、プローブまたは抗体に関して、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る（すなわち、物理的に連結する）ことによるそのプローブまたは抗体の直接標識、ならびにそのプローブまたは抗体を、直接的に標識された別の試薬との反応性による間接的標識を包含することが意図される。間接的標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を使用した一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るように、ＤＮＡプローブのビオチンを用いた末端標識を包含する。

【００５７】

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、および流体を包含することが意図される。すなわち、本発明の検出方法は、インビトロおよびインビボで生物学的サンプル中の２７７７　ｍＲＮＡ、タンパク質、またはゲノムＤＮＡを検出するために使用され得る。例えば、２７７７　ｍＲＮＡの検出のためのインビトロ技術は、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。２７７７タンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光が挙げられる。２７７７ゲノムＤＮＡの検出のためのインビトロ技術は、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、２７７７タンパク質の検出のためのインビボ技術としては、被験体に標識抗２７７７抗体を導入することが挙げられる。例えば、その抗体は、反応性マーカーで標識され得、被験体中のこのマーカーの存在および位置が、標準的な画像化技術により検出され得る。

【００５８】

別の実施形態において、この方法は、コントロール生物学的サンプルを、コントロール被験体から得る工程、そのコントロールサンプルを、２７７７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ように、化合物または２７７７タンパク質、ｍＲＮＡ、もしくはゲノムＤＮＡを検出し得る薬剤と接触させる工程、およびコントロールサンプル中の２７７７タンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの存在と、試験サンプル中の２７７７タンパク質、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの存在とを比較する工程を包含する。

【００５９】

（Ｂ．造血性障害についての予後アッセイ）

本発明はさらに、異常な２７７７発現または活性と関連する造血性障害を有するかまたはこの障害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。

【００６０】

本明細書中で使用される場合、用語「異常な」は、野生型２７７７発現または活性からはずれた２７７７発現または活性を包含する。異常な発現または活性は、増大または減少した発現または活性、ならびに発現の野生型発生パターンにも発現の細胞下パターンにも従

わない、発現または活性を包含する。例えば、異常な２７７７発現または活性は、２７７７遺伝子における変異が、２７７７遺伝子を過小発現または過剰発現させる場合、およびそのような変異が、非機能的２７７７タンパク質または野生型様式にて機能しないタンパク質（例えば、２７７７基質と相互作用しないタンパク質または非２７７７基質と相互作用するタンパク質）を生じる状況を包含することが意図される。

【００６１】

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）は、造血性障害（例えば、再生不良性貧血、鎌状赤血球貧血、赤血球増加症または白血病）を有するかまたはこの障害を発症する危険性のある被験体を同定するために使用され得る。生物学的サンプルは、被験体から得られ得、遺伝的改変の存在または非存在について試験され得る。例えば、このような遺伝的改変は、以下のうちの少なくとも１つの存在を確認することによって検出され得る：１）２７７７遺伝子からの１以上のヌクレオチドの欠失、２）２７７７遺伝子への１以上のヌクレオチドの付加、３）２７７７遺伝子の１以上のヌクレオチドの置換、４）２７７７遺伝子の染色体再配置、５）２７７７遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ転写物レベルにおける改変、６）２７７７遺伝子の異常な改変（例えば、ゲノムＤＮＡのメチル化パターンの改変）、７）２７７７遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、８）２７７７タンパク質の非野生型レベル、９）２７７７遺伝子の対立遺伝子喪失、および１０）２７７７タンパク質の不適切な翻訳後修飾。

【００６２】

本明細書中に記載されるように、２７７７遺伝子における遺伝的改変を検出するために使用され得る当該分野で公知の多数のアッセイがある。例えば、２７７７遺伝子における遺伝的改変は、アンカーＰＣＲまたはＲＡＣＥ　ＰＣＲのような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）において、あるいは連結鎖反応（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）（このうち後者は、２７７７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））において、プローブ／プライマーを使用して検出され得る。この方法は、被験体から生物学的サンプルを回収する工程、核酸（例えば、ゲノムＤＮＡ、ｍＲＮＡまたはその両方）をそのサンプルから単離する工程、その核酸サンプルを、２７７７遺伝子（存在する場合）のハイブリダイゼーションおよび増幅が発生するような条件下で、２７７７遺伝子に特異的にハイブリダイズする１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工程、あるいは増幅産物のサイズを検出する工程およびその長さをコントロールサンプルと比較する工程を包含する。ＰＣＲおよび／またはＬＣＲは、本明細書中で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ともに、予備的な増幅工程として使用するために望ましいことが理解される。

【００６３】

代替的増幅方法としては、以下が挙げられる：自己維持的配列複製（ｓｅｌｆ　ｓｕｓｔａｉｎｅｄ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ）（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－βレプリカーゼ（Ｌｉｚａｒｄｉ，Ｐ．Ｍ．ら（１９８８）Ｂｉｏ－Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　６：１１９７）、または任意の他の核酸増幅法、その後の当業者に周知の技術を用いる増幅分子の検出。これらの検出スキームは、核酸分子がごく少数で存在する場合に、このような分子の検出に特に有用である。

【００６４】

代替的実施形態において、生物学的サンプル由来の２７７７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化により同定され得る。例えば、サンプルＤＮＡおよびコントロールＤＮＡは、単離され、増幅され（必要に応じて）、１以上の制限エンドヌクレアーゼで消化され、フラグメント長がゲル電気泳動により決定され、比較される。サンプルＤＮＡとコントロールＤＮＡとの間のフラグメント長サイズにおける差異は、サンプルＤＮＡにおける変異を示す。さらに、配列特異的リボザイム（例えば、米国特許第５，４９８，５３１号を参照のこと）の使用は、リボザイム切断部位の発生または喪失により、特定の変異の存在についてスコア付けするために使用され得る。

【００６５】

他の実施形態において、２７７７における遺伝的変異は、得られた生物学的サンプルおよびコントロール核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）を、数百または数千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り同定され得る（Ｃｒｏｎｉｎ，Ｍ．Ｔ．ら（１９９６）Ｈｕｍａｎ　Ｍｕｔａｔｉｏｎ　７：２４４－２５５；Ｋｏｚａｌ，Ｍ．Ｊ．ら（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　２：７５３－７５９）。例えば、２７７７における遺伝的改変は、光生成（ｌｉｇｈｔ－ｇｅｎｅｒａｔｅｄ）ＤＮＡプローブ（Ｃｒｏｎｉｎ，Ｍ．Ｔ．ら（１９９６）前出）を含む二次元アレイにおいて同定され得る。簡潔には、プローブの第１のハイブリダイゼーションアレイは、連続する、重複したプローブの線形アレイを作製することにより、サンプルおよびコントロール中のＤＮＡの長いストレッチを介して走査して、配列間の塩基の変化を同定するために使用され得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程の次に、検出された全ての改変体または変異に相補的な、より小さな、特定されたプローブアレイを使用することにより、特定の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行われる。各変異アレイは、平行なプローブセット（一方は、野生型遺伝子に相補的であり、他方は、変異遺伝子に相補的である）から構成される。

【００６６】

なお別の実施形態において、当該分野で公知の任意の種々の配列決定反応は、生物学的サンプル中の２７７７遺伝子を直接配列決定し、生物学的サンプル中の２７７７の配列と、対応する野生型（コントロール）配列とを比較することにより、変異を検出するために使用され得る。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）により開発された技術に基づいたものが挙げられる。任意の種々の自動化配列決定手順が、質量分析法（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）による配列決定を含む、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。

【００６７】

２７７７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２７７７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重鎖の一本鎖領域を切断する薬剤で処理される。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ＤＮＡ／ＲＮＡ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得、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により分離される。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。

【００６８】

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２７７７ｃＤＮＡ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ミスマッチでを切断する（Ｈｓｕら（１９９４）Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎｅｓｉｓ １５：１６５７－１６６２）。例示的実施形態に従って、２７７７配列（例えば、野生型の２７７７配列）に基くプローブは、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を用いて処理され、そしてその切断産物は、存在する場合、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。

【００６９】

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、２７７７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（Ｏｒｉｔａ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２７７７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。アッセイの感度は、（ＤＮＡよりむしろ）ＲＮＡを用いることにより増強され得る。ＲＮＡの二重構造は、配列の変化により敏感である。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）。

【００７０】

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４０ｂｐ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）。

【００７１】

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、既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体にハイブリダイズされる。

【００７２】

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（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）か、または適切な条件下で、ミスマッチが、ポリメラーゼ伸長を防ぎ得るかまたは低減し得る場合、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。

【００７３】

さらに、本明細書中に記載される予後アッセイが、用いられて、被験体が血液障害を有効に処置するための２７７７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。

【００７４】

（Ｃ．臨床試験の間の効果のモニタリング）

本発明は、被験体における血液障害の処置における２７７７モジュレーター（例えば、本明細書中で同定される２７７７モジュレーター）の有効性を決定するための方法をさらに提供する。例えば、２７７７遺伝子発現、２７７７タンパク質レベルを増加するか、または２７７７活性をアップレギュレートする２７７７モジュレーターの有効性は、２７７７遺伝子発現、２７７７タンパク質レベルの減少、または２７７７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、２７７７遺伝子発現、タンパク質レベルを減少するか、または２７７７活性をダウンレギュレートする２７７７モジュレーターの有効性は、２７７７遺伝子発現、２７７７タンパク質レベルの増加、または２７７７活性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、２７７７遺伝子、および好ましくは、例えば、血液障害に関与する他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。

【００７５】

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）２７７７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、２７７７を含む遺伝子が、同定され得る。よって、血液障害に罹患する患者における２７７７活性を調節する因子の効果を（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、２７７７および血液関連障害に関連する他の遺伝子の発現レベルについてそれぞれ分析され得る。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ブロット分析またはＲＴ－ＰＣＲによって、あるいは本明細書中に記載されるような方法の１つによって産生されるタンパク質量を測定することによって、あるいは２７７７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、細胞の、２７７７活性を調節する因子に対する生理学的応答を示すマーカーとし

て働き得る。よって、この応答状態は、個体を２７７７活性を調節する因子で処置する前、またはその間の種々の時点で測定され得る。

【００７６】

好ましい実施形態において、本発明は、２７７７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、投与前サンプルを被験体から得る工程；（ｉｉ）この投与前サンプル中の２７７７タンパク質、２７７７ｍＲＮＡ、または２７７７ゲノムＤＮＡの発現レベルを検出する工程；（ｉｉｉ）１つより多くの投与後サンプルを被験体から得る工程；（ｉｖ）これらの投与後サンプル中の２７７７タンパク質、２７７７ｍＲＮＡ、または２７７７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）投与前サンプル中の２７７７タンパク質、２７７７ｍＲＮＡ、または２７７７ゲノムＤＮＡの発現レベルまたは活性レベルを、投与後サンプル中の２７７７タンパク質、２７７７ｍＲＮＡ、または２７７７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）それによって被験体に対するこの因子の投与を変更する工程。例えば、因子の投与増加は、２７７７発現または２７７７活性を、検出された（すなわち、この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、２７７７発現または２７７７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。このような実施形態に従って、２７７７発現または２７７７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。

【００７７】

（ＩＩＩ．血液障害を罹患する被験体の処置法）

本発明は、血液障害（例えば、再生不良性貧血、鎌状赤血球貧血、赤血球増加症、または白血病）の危険性のある（または障害を罹患しそうな）被験体（例えば、ヒト）を処置する予防法および治療法の両方を提供する。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、ゲノム薬理学（ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｏｍｉｃｓ）の分野から得られる知識に基いて、特別に仕立てられる（ｔａｉｌｏｒｅ）るかまたは改変され得る。本明細書中で使用される場合、「ゲノム薬理学」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」）を決定するのかについての研究をいう。

【００７８】

よって、本発明の別の局面は、個体の薬物応答遺伝子型に従って、本発明の２７７７分子または２７７７モジュレーターのいずれかを用いるその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。ゲノム薬理学によって、臨床医（ｃｌｉｎｉｃｉａｎ）または内科医（ｐｈｙｓｉｃｉａｎ）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。

【００７９】

（Ａ．予防法）

１つの局面において、本発明は、２７７７発現または２７７７活性を調節する（例えば、造血細胞増殖の造血細胞増殖調節）因子を被験体に投与することによって、被験体における血液障害を予防するための方法を提供する。血液障害のある被験体は、例えば、本明細書中に記載される診断アッセイまたは予後アッセイのいずれかまたはその組合わせによって、同定され得る。予防薬の投与は、２７７７の異常な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、血液障害が、予防またはその進行において遅延される。２７７７異常の型に依存して、例えば、２７７７、２７７７のアゴニスト剤または２７７７

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。

【００８０】

（Ｂ．治療法）

本発明の別の局面は、血液障害を罹患する被験体を処置するための方法に関する。これらの方法は、２７７７発現または２７７７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って同定される因子）またはこのような因子の組合わせを、被験体に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、減少した２７７７発現もしくは２７７７活性または異常な２７７７発現もしくは２７７７活性または所望されない２７７７発現もしくは２７７７活性を補うための治療剤として２７７７タンパク質分子または２７７７核酸分子を被験体に投与する工程を包含する。

【００８１】

２７７７活性の刺激は、２７７７が異常にダウンレギュレートされる状況、および／または増加した２７７７活性が有益な効果（例えば、造血細胞の増殖の減少）を有し、これにより、被験体における血液障害（例えば、赤血球増加症（ｐｏｌｙｃｙｔｅｍｉａ）または感染性単核細胞症）を改善する可能性のある状況において所望される。同様に、２７７７活性の阻害は、２７７７が異常にアップレギュレートされる状況、および／または減少した２７７７活性が有益な効果（例えば、造血細胞の増殖の増加）を有し、これにより、被験体における血液障害（例えば、再生不良性貧血または出血性貧血）を改善する可能性のある状況において、所望される。

【００８２】

（１．薬学的組成物）

２７７７活性を調節する因子は、被験体への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、典型的には因子（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、用語「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬剤投与に適合可能な溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などのいずれかおよび全てを含むことが意図される。このような媒体及び因子の、薬学的に活性な物質への使用は、当該分野において周知である。任意の慣用的な媒体または因子が活性化合物に適合し得ない場合を除いて、組成物におけるこれらの使用が企図される。補充される活性化合物はまた、組成物中に組み込まれ得る。

【００８３】

本発明の治療法において使用される薬学的組成物は、その意図される投与経路に適合性であるように処方される。投与経路の例としては、非経口投与（例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与）、経口投与（例えば、吸入投与）、経皮投与（局所投与）、経粘膜投与、および直腸投与が挙げられる。非経口適用、皮内適用または皮下適用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、注入水、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重亜硫酸ナトリウム）；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、クエン酸またはリン酸）および張性の調整のための因子（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）で調整され得る。非経口調製物は、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、ディスポーサブルシリンジまたは複数用量のバイアル中に封入され得る。

【００８４】

注入可能な用途に適切な薬学的組成物としては、滅菌水溶液（水溶性の場合）または滅菌水性分散物、および滅菌注入可能な溶液もしくは分散物の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる。静脈内投与について、適切なキャリアとしては、生理学的生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ　ＥＬ^{TM}（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、組成物は滅菌されていなければならず、そして容易な注射可能性が存在する程度に流体であるべきである。組成物は、製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして、細菌および真菌のような微生物の夾雑作用に対して保護されなければならない。キャリアは、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）、およびこれらの適切な混合物を含む、溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性が、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散物の場合に必要とされる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。微生物の作用からの保護は、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、チメロサールなど）によって達成され得る。多くの場合において、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組成物中に含むことが、好ましい。注入可能な組成物の延長された吸収は、吸収を遅延させる因子（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を組成物中に含ませることによってもたらされ得る。

【００８５】

滅菌注入可能な溶液は、上記で列挙した成分の１つまたは組合わせとともに、２７７７活性を調節する因子（例えば、２７７７タンパク質のフラグメントまたは抗２７７７抗体）を適切な溶媒中に必要とされる量で組み込み、必要ならば、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散物は、基本分散媒体および上記で列挙された成分から必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注入可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、予め滅菌濾過したその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得る。

【００８６】

経口組成物は、一般的に、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、または錠剤へ圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、この活性化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、マウスウォッシュ（ｍｏｕｔｈｗａｓｈ）としての使用のために流体キャリアを使用して調製され得、ここで、この流体キャリア中のこの化合物は、経口的に適用され、そして素早く動かされ（ｓｗｉｓｈ）、そして吐き出されるか、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、トローチ剤などが、以下のいずれかの成分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、トラガカントガムまたはゼラチン）；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）；潤滑剤（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）；あるいは香味剤（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）。

【００８７】

吸入による投与について、この化合物は、適切な噴霧剤（例えば、二酸化炭素のような気体）を含む加圧容器またはディスペンサー、あるいは噴霧器から、エアロゾルスプレーの形態で送達される。

【００８８】

全身的投与はまた、経粘膜手段または経皮手段により得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透されるバリアに対して適切な浸透剤が、処方において使用される。このような浸透剤は、一般的に、当該分野で公知であり、そして、例えば、経粘膜投与としては、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、鼻スプレーまたは坐剤の使用を通じて達成され得る。経皮投与については、この活性化合物は、当該分野で一般的に公知である軟膏（ｏｉｎｔｍｅｎｔ）、軟膏（ｓａｌｖｅ）、ゲル、ま

たはクリーム剤へ処方される。

【００８９】

２７７７活性を調節する因子はまた、直腸送達のための坐剤の形態（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤基剤と共に）または保持浣腸の形態で調製され得る。

【００９０】

１つの実施形態において、２７７７活性を調節する因子は、身体からの迅速な排出に対してこの化合物を保護するキャリアを用いて調製され（例えば、制御放出処方物）、これには、移植片およびマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。酢酸エチレンビニル、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、およびポリ乳酸のような、生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当業者には明らかである。これらの材料はまた、Ａｌｚａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｎｏｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．から市販されている。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を有する、感染させた細胞へ標的化されるリポソームを含む）がまた、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。

【００９１】

投与の容易さおよび投薬の均一性のために、投薬単位形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有益である。本明細書で使用される投薬単位形態は、処置される被験体のための単位投薬量として適切な、物理的に別の単位をいい；各単位は、必要とされる薬学的キャリアと共に、所望の治療的効果を生じるように計算された所定量の活性化合物を含む。本発明の投薬単位形態についての詳細は、２７７７活性を調節する因子の固有の特性、および達成される特定の治療効果、ならびに被験体の処置のためのこのような因子を調合する当該分野に固有の制限によって決定され、そしてこれらに直接依存する。

【００９２】

このような因子の毒性および治療効率は、例えば、ＬＤ５０（集団の５０％に致死的な量）およびＥＤ５０（集団の５０％において治療的に有効な量）を決定するための、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定され得る。毒性と治療効果との間での用量比は、治療指数であり、そしてこれは、ＬＤ５０／ＥＤ５０比として表され得る。大きな治療指数を示す因子が好ましい。毒性の副作用を示す因子が使用され得るが、治療は、感染していない細胞に対する可能性のある損傷を最少にし、それによって副作用が減少するように、患部組織の部位に対してそのような因子を標的化する送達システムを設計するように、行われるべきである。

【００９３】

細胞培養アッセイおよび動物実験によって得られたデータは、ヒトでの使用のための投与量の範囲を処方する際に使用され得る。このような２７７７調節因子の投与量は、好ましくは、わずかな毒性を有するかまたは毒性を全く有さないでＥＤ５０を含む、循環している濃度の範囲内である。投与量は、使用される投与量形態および利用される投与の経路に依存して、この範囲内で変化し得る。本発明の治療方法において使用される任意の因子については、治療有効用量は、細胞培養アッセイから最初に概算され得る。用量は、細胞培養物中で決定されるような、ＩＣ５０（すなわち、症状の最大の半分の抑制を達成する試験化合物の濃度）を含む、循環している血漿濃度の範囲を達成するように、動物モデルにおいて処方し得る。このような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。血漿中でのレベルは、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。

【００９４】

本明細書中に規定されるように、タンパク質またはポリペプチドの治療有効量（すなわち、有効投薬量）は、約０．００１～３０ｍｇ／ｋｇ細胞増殖まで、好ましくは約０．０１

～２５ｍｇ／ｋｇ細胞増殖まで、より好ましくは約０．１～２０ｍｇ／ｋｇ細胞増殖まで、およびさらにより好ましくは約１～１０ｍｇ／ｋｇまで、２～９ｍｇ／ｋｇまで、３～８ｍｇ／ｋｇまで、４～７ｍｇ／ｋｇまで、または５～６ｍｇ／ｋｇ細胞増殖の範囲である。疾患または障害の重篤度、事前の処置、被験体の一般的な健康状態および／もしくは年齢、ならびに他の疾患の存在を含むがこれらに限定されない特定の要因が、被験体を効果的に処置するために必要とされる投与量に影響を与え得ることが、当業者に明らかである。さらに、治療有効量のタンパク質、ポリペプチドまたは抗体での被験体の処置は、単回の処置を含み得るか、または好ましくは、一連の処置を含み得る。

【００９５】

好ましい例においては、被験体は、約０．１～２０ｍｇ／ｋｇ細胞増殖の範囲の抗体、タンパク質またはポリペプチドを用いて、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、およびさらにより好ましくは約４、５、または６週間の間、１週間に１回、処置される。処置のために使用される抗体、タンパク質またはポリペプチドの有効投与量が、特定の処置の経過にわたって増大し得るかまたは減少し得ることもまた、明らかである。投与量の変化が生じ得、そして本明細書中に記載されているような診断アッセイの結果から明白となる。

【００９６】

本発明は、発現または活性を調節する因子を含む。因子は、例えば、低分子であり得る。例えば、このような低分子としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：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１０，０００ｇ／モル未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物（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５，０００ｇ／モル未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物、約１，０００ｇ／モル未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物、約５００ｇ／モル未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物、ならびにこのような化合物の塩、エステル、および薬学的に受容可能な他の形態。低分子因子の適切な用量が当該分野の医師、獣医師または研究者の知識内の多くの要因に依存することが、理解される。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正体、サイズおよび状態に依存して、適用可能な場合、この組成物が投与される経路、およびこの低分子が有していることを開業医が所望する、本発明の核酸またはポリペプチドに対する効果にさらに依存して、変化する。

【００９７】

代表的な用量は、被験体またはサンプル重量１ｋｇあたりｍｇまたはμｇの量の低分子を含む（例えば、約１μｇ／ｋｇ～約５００ｍｇ／ｋｇ、約１００μｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇ、または約１μｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ）。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対するこの低分子の効力に依存することがさらに理解される。このような適切な用量は、本明細書中で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１つ以上が、本発明のポリペプチドまたは核酸の発現また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、獣医または研究者は、例えば、初めに比較的低い用量を処方し、続いて、適切な応答が得られるまで、この用量を増加し得る。さらに、任意の特定の動物被験体についての特定の用量レベルは、用いられる特定の化合物の活性、被験体の年齢、細胞増殖、身体全体の健康状態、性別および食餌、投与時間、投与経路、排泄速度、任意の薬物の組合せ、ならびに調節されるべき発現または活性の程度を含む種々の因子に依存することが、理解される。

【００９８】

さらに、抗体（またはそのフラグメント）が、治療的部分（例えば、細胞毒、治療剤または放射性金属イオン）に結合体化され得る。細胞毒または細胞毒性剤としては、細胞に対して有害な任意の因子が挙げられる。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、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、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、プロプラノロールおよびプロマイシン、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、代謝拮抗剤（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、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロランブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロソスファミド（ｃｙｃｌｏｔｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、ならびに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、ダウノルビシン（以前は、ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前は、アクチノマイシン）、ブレオマイシン、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剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００９９】

本発明の結合体は、所定の生物学的応答を調節するために使用され得、薬物部分は、古典的な化学療法剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、例えば、毒素（例えば、アブリン、リシンＡ、シュードモナス体外毒素またはジフテリア毒素）；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アクチベータ；または生物学的応答調節因子（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」）、または他の増殖因子））が挙げられ得る。

【０１００】

このような治療的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、Ａｒｎｏｎら．，「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｏｆ Ｄｒｕｇｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｒｅｉｓｆｅｌｄら（編），ｐｐ．２４３－５６（Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．１９８５）；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍら，「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ」，Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ（第２版），Ｒｏｂｉｎｓｏｎら（編），ｐｐ．６２３－５３（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．１９８７）；Ｔｈｏｒｐｅ，「Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃａｒｒｉｅｒｓ Ｏｆ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ａｇｅｎｔｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ」，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ’８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｐｉｎｃｈｅｒａら（編），ｐｐ．４７５－５０６（１９８５）；「Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｓｕｌｔｓ，Ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ Ｏｆ Ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｕｓｅ Ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｂａｌｄｗｉｎら（編），ｐｐ．３０３－１６（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９８５），および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、米国特許第４，６７６，９８０号（Ｓｅｇａｌ）により記載されるように、第２の抗体と結合体化して、抗体ヘテロ結合体を形成し得る。

【０１０１】

本発明の方法において使用される核酸分子は、ベクターに挿入され、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。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埋め込まれる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、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。

【０１０２】

（２．移植および輸血）

本発明は、患者（特に、（例えば、癌の処置において）放射線療法および／または化学療法を受けている患者）において造血細胞を増加するための方法を提供する。このような治療は、骨髄および末梢血において、分裂する前駆細胞を殺傷し、治療を制限し、血小板および他の血球の循環レベルを回復するために、しばしば輸血を必要とする。放射線治療後に骨髄移植および／または末梢血幹細胞移植を受けた患者、および骨髄移植が必要な先天性代謝欠損に罹患する患者は、特に目的である。これらの適応症中では、乳癌、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、および先天性欠損（例えば、重症複合型免疫不全、サラセミア、および鎌状赤血球貧血）の処置に関連する骨髄移植である。末梢血幹細胞移植は、血液中の腫瘍細胞の危険性が存在しない条件において、好ましくあり得る。

【０１０３】

本明細書中で使用される場合、用語「移植」は、ドナー被験体から細胞を取り出すプロセス、続いてレシピエント被験体にこの細胞を投与するプロセスを包含する。この用語は、同種異系移植および自己移植の両方を包含し、同種異系移植において、ドナーおよびレシピエントは、同じ種の異なる被験体であり、自己移植において、ドナーおよびレシピエントは、同じ被験体である。

【０１０４】

骨髄移植および末梢血幹細胞移植を実施するための方法は、当該分野で公知である。（Ｓｎｙｄｅｒら、「Ｔｒａｎｓｆｕｄｉｏｎ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ」、ＢｅｎｚおよびＭｃＡｒｔｈｕｒ編、Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ １９９４、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ、９６－１０６、１９９４）。例えば、末梢血幹細胞は、承認された臨床的手順に従って、白血球搬出法によって回収される。造血前駆細胞は、細胞表面マーカー（例えば、ＣＤ３４）に基づいて選択され得、所望の細胞の濃縮および混入した腫瘍細胞の枯渇を可能にする。この回収された細胞は、必要とされるまで、適切な凍結保護物質（例えば、ジメチルスルホキシド、ヒドロキシエチルデンプン）中で凍結して保存される。骨髄細胞は、感覚脱失下で、骨穿刺によってドナーから回収される。体積を減少するために、回収された骨髄は、通常、細胞成分から血漿を分離するようにプロセスされる。血漿の除去はまた、同種異系移植に非適合性である赤血球を除去し得る。細胞画分は、密度勾配技術および自動化分離方を使用して、単核細胞について濃縮され得、そして種々の細胞傷害性剤を使用してＴ細胞を枯渇され得る。回収された骨髄細胞は、確立された手順に従って、凍結保存され、この手順は、速度制御凍結および凍結保護物質の使用を包含する。幹細胞は、温水浴中で解凍され、直後に、融解に伴う損失を最小化するために使用する。同種異系移植の場合において、ドナーおよびレシピエントは、対宿主性移植片病の危険性を最小化するために適合される組織である。

【０１０５】

造血細胞の増加は、幹細胞（特に骨髄性細胞系列の細胞（ＣＤ３４＋幹細胞およびＣＤ３４＋幹細胞由来の細胞を含む））のレシピエント患者への移植から生じる。巨核球細胞系列および赤血球細胞系列中の細胞は、特に目的のものであり、これらの細胞系列は、レシピエントの血小板細胞集団および赤血球細胞集団をそれぞれ再構成する。

【０１０６】

本発明の１つの局面において、骨髄細胞または末梢血細胞の供与の前に、ドナーは、造血細胞の増殖を刺激するのに十分な量および／または造血細胞のアポトーシスを阻害するのに十分な量で、２７７７を阻害する化合物で処置される。ドナーの処置は、３日～２週間の期間の間、１日～数日、好ましくは約２～５日の期間実施され、その後、骨髄幹細胞または末梢血幹細胞を回収する。細胞を回収する前の５日～１０日の期間の間、ドナーを処置するのが好ましい。ドナーにおけるＣＤ３４＋幹細胞および骨髄性細胞系列の他の細胞の増加は、移植レシピエントにおける造血細胞の改善された回復によって明らかになる。本発明の別の局面において、レシピエントは、移植後に２７７７を阻害する化合物で処置され、造血細胞の回復をさらに増強する。

【０１０７】

本発明の別の局面は、被験体（例えば、（例えば、癌の処置のために）放射線治療および／または化学治療を受けている被験体）における造血細胞の数を増加するための方法を特徴とする。この方法は、ドナーから細胞を取り出すプロセス、続いて細胞をレシピエントに投与するプロセスを包含する。本発明の１つの局面において、ドナーは、骨髄細胞または末梢血細胞の供与前に、造血細胞の増殖を刺激するのに十分な量および／または造血細胞のアポトーシスを阻害するのに十分な量の、２７７７を阻害する化合物で処置される。本発明の別の実施形態において、レシピエントは、移植後に、２７７７を阻害する化合物で処置され、造血細胞の回復をさらに増強する。

【０１０８】

別の局面において、本発明は、造血前駆細胞および前駆（ｃｏｍｍｉｔｔｅｄ）赤血球細胞を増加することを必要とするレシピエント被験体において、造血幹細胞および前駆赤血球細胞を増加するための方法を提供する。この方法は、ドナーにおいて、造血細胞のアポトーシスの誘導を阻害するのに十分な量の２７７７および造血細胞の細胞増殖の阻害を予防するのに十分な量の２７７７をドナー被験体に投与する工程；ドナーから細胞を回収する工程であって、ここでこの細胞は、骨髄細胞または末梢血幹細胞である、工程；およびこの骨髄細胞または末梢血幹細胞をレシピエント被験体に投与する工程を包含する。ドナーおよびレシピエントは、異なる被験体であっても同じ被験体であってもよい。本発明の１つの実施形態において、レシピエント被験体は、化学療法または放射線療法で処置されている。

【０１０９】

別の局面において、本発明は、移植のための細胞を調製する方法に関し、この方法は、ドナー被験体において、造血細胞のアポトーシスを阻害するのに十分な量の２７７７または２７７７調節因子、および造血細胞の細胞増殖の阻害を予防するのに十分な量の２７７７または２７７７調節因子、をドナー被験体に投与する工程、およびこのドナー被験体から細胞（例えば、骨髄細胞または末梢血幹細胞）を回収する工程を包含する。

【０１１０】

別の局面において、本発明は、化学療法または放射線療法を受けている患者において、血小板回復または赤血球回復を刺激する方法を提供する。この方法は、被験体において、骨髄性細胞系列の細胞増殖を刺激するのに十分な量の２７７７または２７７７調節因子を被験体に投与する工程；化学療法または放射線療法の前に、被験体から骨髄細胞または末梢血幹細胞を回収する工程；および化学療法または放射線療法に引き続いて回収された細胞を被験体に戻す工程を包含する。１つの実施形態において、この方法は、回収された細胞を戻した後または戻すのと同時に、血小板回復または赤血球回復を増強するのに十分な量の２７７７または２７７７調節因子を被験体に投与する工程をさらに包含する。

【０１１１】

（Ｃ．薬理ゲノム学（ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｏｍｉｃｓ））

本発明の治療方法と共に、薬理ゲノム学（すなわち、被験体の遺伝子型とこの被験体の外来化合物または薬物に対する応答との間の関係の研究）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り、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、２７

７７活性を調節する薬剤を投与するか否かを決定する際、ならびに２７７７活性を調節する薬剤を用いる処置の投薬量および／または治療レジメンを変更する際に、関連の薬理ゲノム学研究において得られた知識を適用することを考慮し得る。

【０１１２】

薬理ゲノム学は、変更された薬物の性質および罹患した個人における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異を扱う。例えば、Ｅｉｃｈｅｌｂａｕｍ，Ｍ．ら、（１９９６）Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．２３（１０－１１）：９８３－９８５およびＬｉｎｄｅｒ，Ｍ．Ｗ．ら、（１９９７）Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．４３（２）：２５４－２６６を参照のこと。一般に、２つの型の薬理遺伝子学条件が、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（変更された薬物作用）単一因子として伝わったか、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（変更された薬物代謝）単一因子として伝わった。これらの薬理遺伝子学条件は、稀な遺伝子欠損としてかまたは天然に存在する多型としてかの、いずれかとして生じ得る。例えば、グルコース－６－ホスフェート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、酸化薬剤（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。

【０１１３】

「ゲノムワイドアソシエーション（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の多型または可変性部位からなり、これらの各々が、２つの改変体を有する））からなるヒトゲノムの高解像度マップに、主に依存する。このような高解像度遺伝子マップは、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、第ＩＩ期／第ＩＩＩ期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、このような高解像度マップは、ヒトゲノムにおいて、数千万の公知の単一ヌクレオチド多型（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」は、ＤＮＡのストレッチにおいて、単一ヌクレオチド塩基において生じる一般的な変更である。例えば、ＳＮＰは、ＤＮＡの１０００塩基毎に１回起き得る。ＳＮＰは、疾患プロセスに関与し得るが、大部分は、疾患に関連しないかもしれない。このようなＳＮＰの存在に基づく遺伝子マップが与えられると、個体は、個々のゲノム中の、ＳＮＰの特定のパターンに依存して、遺伝子のカテゴリーに分類され得る。このような様式において、処置レジメンは、このような遺伝学的に類似の個体の間で共通であり得る形質を考慮して、遺伝学的に類似の個体の群に対して調整され得る。

【０１１４】

あるいは、「候補遺伝子アプローチ」と称される方法は、薬物応答を予見する遺伝子を同定するために利用され得る。この方法によれば、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２７７７タンパク質）、その遺伝子のすべての共通の改変体は、集団中で完全に容易に同定され得、そして別のバージョンに対して遺伝子の１つの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。

【０１１５】

例示の実施形態として、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要因である。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）およびシトクロームＰ４５０酵素（ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９））の遺伝子多型の発見は、薬物の標準的および安全用量を摂取した後、なぜ特定の患者が期待された薬物効果を得ないか、または過大な薬物応答および重篤な毒性を示すかに関する説明を提供した。これらの多型は、集団において、２つの表現型（拡張代謝型（ＥＭ）および低減代謝型（ＰＭ））で発現される。ＰＭの罹患率は、異なる集団の間で異なる。例えば、ＣＹＰ２Ｄ６をコードする遺伝子は高度に多型であり、そしてＰＭ中にいくつかの変異

が同定され、これらはすべて機能的ＣＹＰ２Ｄ６の不在に至る。ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９の低減代謝型は、極めて頻繁に、それらが標準的用量を受けるとき、過大な薬物応答および副作用を経験する。代謝物が活性な治療部分である場合、ＰＭは、そのＣＹＰ２Ｄ６で形成された代謝物モルヒネにより媒介されるコデインの鎮痛性効果について証明されるように、治療応答を示さない。その他の極端な例は、標準的な用量に応答しない、いわゆる、超迅速代謝型である。最近、超迅速代謝型の分子の基礎が、ＣＹＰ２Ｄ６遺伝子増幅に起因することが同定された。

【０１１６】

あるいは、「遺伝子発現プロファイリング」と称される方法が、薬物応答を予見する遺伝子を同定するために利用され得る。例えば、薬物（例えば、本発明の２７７７分子または２７７７モジュレーター）を投与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オンされたか否かの指標を与え得る。

【０１１７】

上記の薬物動態学的アプローチの１つより多くから得られる情報は、被験体の予防処置または治療処置のために適切な投薬量および処置レジメンを決定するために用いられ得る。この知識により、投与すること、または薬物選択に適用されるとき、有害反応または治療の失敗を避けることができ、そしてそれ故、血液学的障害を患う被験体を２７７７活性を調整する薬剤で処置するとき、治療効果または予防効果を増大する。

【０１１８】

（ＩＶ．本発明の方法で用いら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、本明細書に記載のスクリーニングアッセイ）は、２７７７タンパク質（またはその一部分）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。本明細書で用いるとき、用語「ベクター」は、連結された別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。１つの型のベクターは、その中に付加的なＤＮＡセグメントが連結され得る環状の２本鎖ＤＮＡループをいう「プラスミド」である。別の型のベクターは、ウイルスベクターであり、ここでは、付加的ＤＮＡセグメントは、ウイルスゲノム中に連結され得る。特定のベクターは、それらが導入された宿主細胞中で自律複製し得る（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。その他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中への導入に際し、宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、そしてそれによって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、それらに作動可能に連結された遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書で、「発現ベクター」と称される。一般に、組換えＤＮＡ技法における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」および「ベクター」は交換可能に用いられ得る。なぜなら、プラスミドは、最も一般的に用いられるベクターの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、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）のような発現ベクターのこのようなその他の形態を含むことが意図される。

【０１１９】

本発明の方法で用いられるべき組換え発現ベクターは、本発明の核酸を、宿主細胞における核酸の発現に適する形態で含み、これは、こ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ている、発現のために用いられるべき宿主細胞を基礎に選択された１つ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内で、「作動可能に連結された」は、目的のヌクレオチド配列が、調節配列（単数または複数）に、ヌクレオチド配列の発現を可能にするような様式（例えば、インビトロ転写／翻訳系において、またはベクターが宿主細胞中に導入されるとき宿主細胞において）で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その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。このような調節配列は、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８５：３－７に記載されている。調節配列は、多くの型の宿主細胞でヌ

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でのみ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）を含む。発現ベクターの設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは当業者に認識される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞中に導入され得、それによって本明細書に記載されるような核酸によってコードされる、融合タンパク質またはペプチド（例えば、２７７７タンパク質、２７７７タンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を含む、タンパク質またはペプチドを生成する。

【０１２０】

本発明の方法で用いられるべき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２７７７タンパク質の発現のために設計され得る。例えば、２７７７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用いる）、酵母細胞、または哺乳動物細胞中で発現され得る。適切な宿主細胞は、Ｇｏｅｄｄｅｌ（１９９０）上述でさらに論議されている。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ポリメラーゼを用いてインビトロで転写および翻訳され得る。

【０１２１】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合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用い、Ｅ．ｃｏｌｉ中で最も頻繁に実施される。融合ベクターは、多くのアミノ酸を、その中にコードされるタンパク質に（通常、組換えタンパク質のアミノ末端に）付加する。代表的には、このような融合タンパク質は、３つの目的の役に立つ：１）組換えタンパク質の発現を増加すること；２）組換えタンパク質の溶解度を増加すること；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支援すること、である。しばしば、融合発現ベクターにおいては、タンパク質切断部位が、融合部分と組換えタンパク質との融合の接続部に導入され、そしてこの融合タンパク質の精製の次に融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能にする。このような酵素、およびそれらの同族起源の認識配列は、第Ｘａ因子、トロンビ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は、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をそれぞれ標的組換えタンパク質に融合する、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）を含む。

【０１２２】

精製された融合タンパク質は、２７７７活性アッセイ（例えば、以下に詳細に記載される直接アッセイまたは競合アッセイ）で利用され得るか、または２７７７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。好適な実施形態では、本発明のレトロウイルス発現ベクターで発現される２７７７融合タンパク質は、次に、照射されたレシピエント中に移植される骨髄細胞を感染するために利用され得る。次いで、十分な時間（例えば、６週間）が通過した後、被験体レシピエントの病理が調査される。

【０１２３】

別の実施形態では、本発明の核酸は、哺乳動物ベクターを用いて哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例としては、ｐＣＤＭ８（Ｓｅｅｄ、Ｂ．（１９８７）Ｎａｔｕｒｅ ３２９：８４０）およびｐＭＴ２ＰＣ（Ｋａｕｆｍａｎら（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ．６：１８７－１９５）が挙げられる。哺乳動物細胞中で用いられるとき、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、一般に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、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の両方に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の第１６章および第１７章、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８９を参照のこと。

【０１２４】

別の実施形態では、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型における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を用いて核酸を発現する）。

【０１２５】

本発明の方法は、アンチセンス配向で発現ベクター中にクローン化された本発明のＤＮＡ分子を含む組換え発現ベクターをさらに用い得る。すなわち、ＤＮＡ分子は、２７７７ｍＲＮＡに対してアンチセンスである、ＲＮＡ分子の発現を（ＤＮＡ分子の転写によって）可能にする様式で調節配列に作動可能に連結される。アンチセンス配向でクローン化された核酸に作動可能に連結された調節配列が選択され得、これは、種々の細胞型でこのアンチセンスＲＮＡ分子の連続発現を指向し、例えば、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、ウイルスプロモーターおよび／またはエンハンサー、または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であり得、ここで、アンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で産生され、その活性は、ベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を用いる遺伝子発現の調節の論議については、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。

【０１２６】

本発明の別の局面は、本発明の２７７７核酸分子、例えば、組換え発現ベクター内の２７７７核酸分子、またはそれが宿主細胞のゲノムの特異的部位中に相同的に組換えることを可能にする２７７７核酸分子含有配列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、本明細書では交換可能に用いられる。このような用語は、特定の被験体細胞のみをいうのではなく、このような細胞の子孫または潜在的子孫をいうことが理解される。世代を継承することで、変異または環境的影響のいずれかに起因して特定の改変が生じ得るので、このような子孫は、実際、親細胞と同一でないかもしれないが、なお、本明細書で用いられる用語の範囲内に含まれる。

【０１２７】

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、２７７７タンパク質は、Ｅ．ｃｏｌｉのような細菌細胞、昆虫細胞、酵母または（チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）またはＣＯＳ細胞のような）哺乳動物細胞中で発現され得る。その他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【０１２８】

ベクターＤＮＡは、従来の形質転換またはトランスフェクション技法により原核生物細胞または真核生物細胞中に導入され得る。本明細書で用いられるとき、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、外来核酸（例えば、ＤＮＡ）を宿主細胞中に導入するための種々の当該分野で認識された技法をいうことが意図され、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈殿、ＤＥＡＥデキストラン媒介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ーレーションを含む。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトする適切な方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．第2版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８９）、およびその他の実験室マニュアル中に見出され得る。

【０１２９】

培養中の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞のような、本発明の方法で用いられる宿主細胞は、２７７７タンパク質を産生（すなわち、発現）するために用いられ得る。従

って、本発明は、本発明の宿主細胞を用いて２７７７タンパク質を産生する方法をさらに提供する。１つの実施形態では、この方法は、本発明の宿主細胞（これに２７７７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、２７７７タンパク質が産生されるように培養する工程を包含する。別の実施形態では、この方法は、上記培地または宿主細胞から２７７７タンパク質を単離する工程をさらに包含する。

【０１３０】

（Ｖ．本発明の方法において使用される、単離された核酸分子）

単離されたヒト２７７７ｃＤＮＡのコード配列およびヒト２７７７ポリペプチドの予想されるアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号１および２に示される。単離されたヒト２７７７ポリペプチドのアミノ酸配列はまた、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｐ５２８８８において見出され得る。

【０１３１】

本発明の方法は、２７７７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、２７７７をコードする核酸分子（例えば、２７７７　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十分な核酸フラグメント、および２７７７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作製された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、好ましくは二本鎖ＤＮＡである。

【０１３２】

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、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の核酸配列の全部または一部を使用して、２７７７核酸分子を、（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｈ，Ｅ．Ｆ．，およびＭａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　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。

【０１３３】

さらに、配列番号１の全部または一部を含有する核酸分子を、配列番号１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。

【０１３４】

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、２７７７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。

【０１３５】

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に示される核酸配列、配列番号１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。

【０１３６】

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。

【０１３７】

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２７７７タンパク質の部分（例えば、２７７７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のセンス配列、配列番号１のアンチセンス配列、あるいは配列番号１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ェントな条件下で、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、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００以上のヌクレオチド長よりも長く、かつストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号１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。

【０１３８】

本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、互いに有意に同一または相同であるヌクレオチ配列が、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ェントな条件は、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。さらなるストリンジェントな条件は、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、約６５～７０℃での、４×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、４×ＳＳＣ＋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、１×ＳＳＣ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、約６５～７０℃での、１×ＳＳＣ中でハイブリダイゼーション（または約４２～５０℃での、１×ＳＳＣ＋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、０．３×ＳＳＣで１回以上の洗浄が挙げられる。好ましい、低いストリンジェンシーの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、４×ＳＳＣ中でハイブリダイゼーション（または約４０～４５℃での、６×ＳＳＣ＋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、２×ＳＳＣ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（１×ＳＳＰＥは、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、１０ｍＭ NaH_2PO_4 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（１×ＳＳＣ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、各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塩基対長の間のであるハイブリッドについて、T_m（℃）＝８１．５＋１６．６（$\log_{10}$［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（１×ＳＳＣ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得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、０．２５～０．５Ｍ　NaH_2PO_4、７％　ＳＤＳ中でハイブリダイゼーション、次いで６５℃での、０．０２Ｍ　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×ＳＳＣ、１％　ＳＤＳ）。

【０１３９】

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、２７７７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２７７７コード核酸のレベルを測定すること、例えば、２７７７ｍＲＮＡレベルを検出するか、またはゲノムの２７７７遺伝子が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）。

【０１４０】

本発明の方法は、遺伝暗号の縮重に起因して、配列番号１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２７７７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２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。

【０１４１】

本発明の方法は、ヒト２７７７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２７７７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、２７７７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２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２７７７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、２７７７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２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。本発明の方法は、ヒト２７７７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２７７７タンパク質のオルソログは、非ヒト生物から単離され、そして同じ２７７７の活性を有するタンパク質である。

【０１４２】

本発明の方法は、配列番号１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２７７７の野生型配列（例えば、配列番号２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２７７７タンパク質およびＣＩＤＥファミリー（例えば、ＣＩＤＥ－Ｂ、ＦＳＰ－２７、およびＤＦＦ４５）の他のメンバー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。

【０１４３】

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）、β－分枝側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、２７７７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、２７７７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、２７７７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、本明細書中に記載されたアッセイを用いて決定され得る。

【０１４４】

本発明の別の局面は、配列番号１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２７７７コード鎖または、それらの一部のみに相補的であり得る。１実施形態において、アンチセンス核酸分子は、２７７７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、このアンチセンス核酸分子は、２７７７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）。

【０１４５】

本明細書中に開示される２７７７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、２７７７ｍＲＮＡの全コード領域に相補的であり得るが、より好ましくは、２７７７ｍＲＮＡ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、２７７７ｍＲＮＡ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、β－Ｄ－ガラクトシルキューオシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルキューオシン、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ワイブトキソシン（ｗｙｂｕｔｏｘｏｓｉｎｅ）、スードウラシル、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、以下のサブセクションにさらに記載される、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向のＲＮＡである）。

【０１４６】

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、代表的に、被験体に投与されるか、またはこれらのアンチセンス核酸分子が、２７７７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とハイブリダイズするか、または結合することによって、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ように、インサイチュで産生される。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り得るか、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においては、その二重らせんの大きい方の溝における特異的相互作用を介し得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子を改変して、選択された細胞を標的化し、次いで、全身に投与され得る。全身投与に関して、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　ＩＩプロモーターまたはｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターの制御下に置かれたベクター構築物は、好ましい。

【０１４７】

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アンチセンス核酸分子は、α－アノマー核酸分子である。α－アノマー核酸分子は、相補的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β－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）ＦＥ

ＢＳ Ｌｅｔｔ．２１５：３２７－３３０）を含み得る。

【０１４８】

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アンチセンス核酸分子は、リボザイムである。リボザイムは、例えば、ｍＲＮＡのような単鎖核酸（リボザイムは、それに対する相補領域を有する）を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒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に記載されている））は、２７７７ ｍＲＮＡ転写物を触媒により切断するために使用され得、これにより、２７７７ ｍＲＮＡの翻訳を阻害する。２７７７コード核酸に対して特異性を有するリボザイムは、本明細書に開示される２７７７ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号１）に基づいて設計され得る。例えば、Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ Ｌ－１９ ＩＶＳ ＲＮＡの誘導体は、活性部位のヌクレオチド配列が２７７７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、２７７７ 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。

【０１４９】

あるいは、２７７７遺伝子の発現は、標的細胞中で２７７７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、２７７７の調節領域（例えば、２７７７プロモーターおよび／またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的することによって阻害され得る。一般に、Ｈｅｌｅｎｅ，Ｃ．（１９９１）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．６（６）：５６９－８４；Ｈｅｌｅｎｅ，Ｃ．ら（１９９２）Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６０：２７；およびＭａｈｅｒ，Ｌ．Ｊ．（１９９２）Ｂｉｏａｓｓａｙｓ １４（１２）：８０７－１５を参照のこと。

【０１５０】

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２７７７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。

【０１５１】

２７７７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。２７７７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クランピングによって）；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。

【０１５２】

別の実施形態において、２７７７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に親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、またはリポ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２７７７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、Ｈｙｒｕｐ　Ｂ．ら、（１９９６）前出およびＦｉｎｎ　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－チミジンホスホルアミダイトが、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）。

【０１５３】

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、インビ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、（１９８７）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。

【０１５４】

（ＶＩ．本発明の方法において使用される、単離された２７７７タンパク質および抗２７７７抗体）

本発明の方法は、単離された２７７７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２７７７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２７７７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、２７７７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、２７７７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。

【０１５５】
本明細書中で使用する場合、２７７７タンパク質の「生物学的に活性な部分」は、２７７７活性を有する、２７７７タンパク質のフラグメントを含む。２７７７タンパク質の生物学的に活性な部分は、２７７７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２７７７タンパク質より少ないアミノ酸を含み、かつ２７７７タンパク質の少なくとも１つの活性を示す、配列番号２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、２７７７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、２７７７タンパク質のＮ末端領域）を含む。２７７７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。２７７７タンパク質の生物学的に活性な部分は、２７７７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。

【０１５６】
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２７７７タンパク質は、配列番号２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、２７７７タンパク質は、配列番号２に対して実質的に同一であり、そして配列番号２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２７７７タンパク質は、配列番号２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。

【０１５７】
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２の２７７７アミノ酸配列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（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ギャップの数、および各ギャップの長さが考慮される）。

【０１５８】
配列の比較および２つの配列間の同一性パーセントの決定は、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同一性パーセントは、ＧＣＧソフトウェアパッケージ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍから入手可能）において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、Ｂｌｏｓｕｍ 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（ｌｅｎ

ｇｔｈ　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同一性パーセントは、ＧＣＧソフトウェアパッケージ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍから入手可能）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種のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列間の同一性パーセントが、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０または２．０Ｕ）に組み込まれたＥ．ＭｅｙｅｒｓおよびＷ．Ｍｉｌｌｅｒ（Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．４：１１－１７（１９８８））のアルゴリズムを用い、ＰＡＭ１２０ウェイト残基テーブル、ギャップレングスペナルティー１２およびギャップペナルティー４を用いて決定される。

【０１５９】

本発明の方法はまた、２７７７キメラタンパク質または２７７７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、２７７７「キメラタンパク質」または２７７７「融合タンパク質」は、非２７７７ポリペプチドに作動可能に連結された２７７７ポリペプチドを含む。「２７７７ポリペプチド」は、２７７７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い、一方、「非２７７７ポリペプチド」は、２７７７タンパク質に対して実質的には相同ではないタンパク質（例えば、２７７７タンパク質とは異なり、かつ同一または異なる生物に由来するタンパク質）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。２７７７融合タンパク質において、２７７７ポリペプチドは、２７７７タンパク質の全てまたは一部分に対応し得る。好ましい実施形態において、２７７７融合タンパク質は、２７７７タンパク質の少なくとも１つの生物学的に活性な部分を含む。別の好ましい実施形態において、２７７７融合タンパク質は、２７７７タンパク質の少なくとも２つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結された」は、２７７７ポリペプチドおよび非２７７７ポリペプチドが、互いにインフレームで融合されていることを示すことが意図される。非２７７７ポリペプチドは、２７７７ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に融合され得る。

【０１６０】

例えば、１つの実施形態において、融合タンパク質はＧＳＴ－２７７７融合タンパク質であり、ここで２７７７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２７７７タンパク質の精製を容易にし得る。

【０１６１】

別の実施形態において、この融合タンパク質は、そのＮ末端に異種シグナル配列を含む２７７７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、２７７７の発現および／または分泌は、異種シグナル配列の使用を通じて増加され得る。

【０１６２】

本発明の方法において使用される２７７７融合タンパク質は、薬学的組成物に組み込まれ得、インビボで被験体に投与され得る。２７７７融合タンパク質は、２７７７基質のバイオアベイラビリティーに影響を与えるために使用され得る。２７７７融合タンパク質の使用は、例えば、（ｉ）２７７７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）２７７７タンパク質遺伝子の誤った調節；および（ｉｉｉ）２７７７タンパク質の異常な翻訳後修飾、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。

【０１６３】

さらに、本発明の方法において使用される２７７７融合タンパク質は、被験体において抗２７７７抗体を産生するための免疫原として、２７７７リガンドを精製するために、そしてスクリーニングアッセイにおいて、２７７７と２７７７基質との相互作用を阻害する分子を同定するために使用され得る。

【０１６４】

好ましくは、本発明の方法において使用される２７７７キメラタンパク質または２７７７

融合タンパク質は、標準的組換えＤＮＡ技術により生成される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするＤＮＡフラグメントを、従来の技術に従って（例えば、連結のために平滑末端または付着末端（ｓｔａｇｇｅｒ－ｅｎｄｅｄ）を使用すること、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切な場合は付着末端（ｃｏｈｅｓｉｖｅ　ｅｎｄ）を埋めること（ｆｉｌｌｉｎｇ－ｉｎ）、望ましくない結合を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結によって）インフレームでともに連結する。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動化ＤＮＡ合成機を含む従来の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、２つの連続する遺伝子フラグメント間の相補的オーバーハング（ｏｖｅｒｈａｎｇ）を生じるアンカープライマーを使用して実施され得、これらは、引き続いてキメラ遺伝子配列を生成するためにアニールされ得、そして再増幅され得る（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｕｓｕｂｅｌら編、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ：１９９２を参照のこと）。さらに、すでに融合部分（例えば、ＧＳＴポリペプチド）をコードする、多くの発現ベクターが、市販されている。２７７７をコードする核酸は、このような発現ベクター中にクローン化され得、その結果、融合部分は、インフレームで２７７７タンパク質に連結される。

【０１６５】

本発明はまた、２７７７タンパク質の改変体の使用に関し、この２７７７タンパク質の改変体は、２７７７アゴニスト（模倣物）または２７７７アンタゴニストのいずれかとして機能する。２７７７タンパク質の改変体を、変異誘発（例えば、２７７７タンパク質の個別の点変異または短縮化）により作製し得る。２７７７タンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態の２７７７タンパク質の生物学的活性と実質的に同一な活性か、またはその活性のサブセットを保持し得る。２７７７タンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形態の２７７７タンパク質の活性のうちの１つ以上を、例えば、この２７７７タンパク質の２７７７媒介活性を競合的に調節することによって阻害し得る。従って、特定の生物学的効果を、制限された機能の改変体で処理することにより誘発し得る。１つの実施形態において、この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での被験体の処置は、天然に存在する形態の２７７７タンパク質での処置と比較して、被験体において少ない副作用を有する。

【０１６６】

１つの実施形態において、２７７７アゴニスト（模倣物）または２７７７アンタゴニストのいずれかとして機能する２７７７タンパク質の改変体は、２７７７タンパク質アゴニスト活性または２７７７タンパク質アンタゴニスト活性について、２７７７タンパク質の変異体（例えば、短縮型変異体）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、２７７７改変体の多様なライブラリーが、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。２７７７改変体の多様なライブラリーは、例えば、遺伝子配列に合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素的に連結することによって産生され得、その結果、可能な２７７７配列の縮重セットが個々のポリペプチドとして、あるいは、２７７７配列のセットを含む、より大きな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のために）発現可能である。縮重オリゴヌクレオチド配列から可能な２７７７改変体のライブラリーを産生するために使用され得る種々の方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動化ＤＮＡ合成機において実行され得、次いでこの合成遺伝子は、適切な発現ベクターに連結され得る。遺伝子の縮重セットの使用は、１つの混合物中に、可能な２７７７配列の望ましいセットをコードする配列のすべてを提供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）。

【０１６７】
さらに、２７７７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、２７７７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２７７７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、２７７７コード配列の二本鎖ＰＣＲフラグメントを、ニックが１分子あたり約１つだけ生じる条件下でヌクレアーゼで処理すること、その二本鎖ＤＮＡを変性させること、そのＤＮＡを再生させて、異なるニックを有する生成物からセンス／アンチセンス対を含み得る二本鎖ＤＮＡを形成すること、Ｓ１ヌクレアーゼを用いる処理によって、再形成された二重鎖から一本鎖部分を除去すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクターに連結すること、によって生成され得る。この方法によって、２７７７タンパク質の種々のサイズの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を誘導し得る。

【０１６８】
点変異または短縮化によって作製される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、および選択された特性を有する遺伝子産物について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、２７７７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る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。高スループット分析に適用可能な、大きい遺伝子ライブラリーのスクリーニングのための最も広範に使用される技術は、代表的には、複製可能な発現ベクターへの遺伝子ライブラリーのクローニング、得られたベクターライブラリーでの適切な細胞の形質転換、および所望の活性の検出が、その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条件下でのコンビナトリアル遺伝子の発現を含む。帰納的アンサンブル変異誘発（ｒｅｃｕｒｓｉｖｅ ｅｎｓａｍｂｌｅ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）（ＲＥＭ）は、ライブラリーにおける機能的変異体の頻度を高める新たな技術であり、２７７７改変体を同定するために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Ｙｏｕｖａｎ（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：７８１１－７８１５；Ｄｅｌｇｒａｖｅら（１９９３）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ６（３）：３２７－３３１）。

【０１６９】
本発明の方法は、抗２７７７抗体の使用をさらに包含する。単離された２７７７タンパク質、またはその一部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体調製およびモノクローナル抗体調製のための標準的な技術を使用して、２７７７を結合する抗体を生成するための免疫原として使用され得る。全長２７７７タンパク質が使用され得るか、あるいは、２７７７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。２７７７の抗原性ペプチドは、配列番号２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２７７７のエピトープを包含し、その結果、そのペプチドに対して惹起された抗体は、２７７７タンパク質との特異的な免疫複合体を形成する。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、なおより好ましくは、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。

【０１７０】
この抗原性ペプチドによって含まれる好ましいエピトープは、そのタンパク質の表面に位置する２７７７の領域（例えば、親水性領域）ならびに高い抗原性を有する領域である。

【０１７１】
代表的には、２７７７免疫原を使用して、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）を免疫原によって免疫することにより抗体を調製する。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換え発現された２７７７タンパク質または化学合成された２７７７ポリペプチドを含み得る。この調製物は、アジュバント（例えば、フロイント完全アジュバントまたはフロイント不完全アジュバント）または同様な免疫刺激剤をさらに含み

得る。適切な被験体を免疫原性２７７７調製物で免疫することにより、ポリクローナル抗２７７７抗体応答が誘導される。

【０１７２】

用語「抗体」とは、本明細書中で用いられる場合、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部分（すなわち、抗原（例えば、２７７７）を特異的に結合する（抗原と免疫反応する）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、酵素（例えば、ペプシン）で抗体を処理することにより生成され得るＦ（ａｂ）フラグメントおよびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントが挙げられる。本発明は、２７７７分子を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。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」とは、本明細書中で使用される場合、２７７７の特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位を１種だけ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、代表的には、このモノクローナル抗体組成物が免疫反応する特定の２７７７タンパク質に対する単一の結合親和性を提示する。

【０１７３】

ポリクローナル抗２７７７抗体は、適切な被験体を２７７７免疫原で免疫することにより、上記のように調製され得る。免疫した被験体における抗２７７７抗体力価は、標準的技術により（例えば、固定化した２７７７を用いる酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）を用いて）経時的にモニターされ得る。所望であれば、２７７７に対する抗体分子は、哺乳動物から（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、プロテインＡクロマトグラフィー）によりＩｇＧ画分を得るために精製され得る。免疫後、適切な時点で（例えば、抗２７７７抗体の力価が最も高いときに）、抗体産生細胞を被験体から獲得し得、そしてこれを使用して、標準的技術（例えば、元々ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５）Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－４９７により記載されたハイブリドーマ技術（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；およびＹｅｈら（１９８２）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ２９：２６９－７５もまた参照のこと）、より最近のヒト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．，７７－９６頁）またはトリオーマ（ｔｒｉｏｍａ）技術）によりモノクローナル抗体を調製し得る。モノクローナル抗体ハイブリドーマを生成する技術は、周知である（一般には、Ｋｅｎｎｅｔｈ，Ｒ．Ｈ．、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）。簡潔には、不死化細胞株（代表的には骨髄腫）を、上記のように２７７７免疫原で免疫した哺乳動物由来のリンパ球（代表的には、脾臓細胞）と融合し、そして得られたハイブリドーマ細胞の培養物上清をスクリーニングして、２７７７を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。

【０１７４】

リンパ球と不死化細胞株とを融合するために使用される多くの周知のプロトコルのいずれもが、抗２７７７モノクローナル抗体を産生する目的で適用され得る（例えば、Ｇ．Ｇａｌｆｒｅら（１９７７）Ｎａｔｕｒｅ ２６６：５５０５２；Ｇｅｆｔｅｒら（１９７７）上記；Ｌｅｒｎｅｒ（１９８１）上記；およびＫｅｎｎｅｔｈ（１９８０）、上記を参照のこと）。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が存在し、これらは、やはり有用であることを理解する。代表的には、不死細胞株（例えば、骨髄腫細胞

株）はリンパ球と同じ哺乳動物種に由来する。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由来のリンパ球と不死化マウス細胞株とを融合することにより作製され得る。好ましい不死細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養培地（「ＨＡＴ培地」）に感受性であるマウス骨髄腫細胞株である。多くの骨髄腫細胞株（例えば、Ｐ３－ＮＳ１／１－Ａｇ４－１、Ｐ３－ｘ６３－Ａｇ８．６５３またはＳｐ２／Ｏ－Ａｇ１４骨髄腫株）のいずれもが、標準的技術に従って融合パートナーとして使用され得る。これらの骨髄腫株は、ＡＴＣＣから入手可能である。代表的には、ＨＡＴ感受性マウス骨髄腫細胞を、ポリエチレングリコール（「ＰＥＧ」）を使用してマウス脾臓細胞に融合する。次いで、融合から得られたハイブリドーマ細胞を、ＨＡＴ培地を用いて選択する（このことにより、融合していない骨髄腫細胞および非産生的融合骨髄腫細胞は死ぬ（融合していない脾臓細胞は、形質転換していないので数日後に死ぬ））。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、２７７７を結合する抗体について、ハイブリドーマ培養物上清をスクリーニングすることにより（例えば、標準的ＥＬＩＳＡアッセイを使用して）検出される。

【０１７５】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製するかわりに、モノクローナル抗２７７７抗体を、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２７７７を用いてスクリーニングし、することにより同定および単離し得、それによって２７７７を結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離し得る。ファージディスプレイライブラリーを生成し、そして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 ＳｕｒｆＺＡＰ™ 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を生成し、そしてスクリーニングする際の使用に特になじみやすい方法および試薬の例は、例えば、Ｌａｄｎｅｒら、米国特許第５，２２３，４０９号；Ｋａｎｇら、ＰＣＴ国際公開ＷＯ９２／１８６１９；Ｄｏｗｅｒら、ＰＣＴ国際公開ＷＯ９１／１７２７１；Ｗｉｎｔｅｒら、ＰＣＴ国際公開ＷＯ９２／２０７９１；Ｍａｒｋｌａｎｄら、ＰＣＴ国際公開ＷＯ９２／１５６７９；Ｂｒｅｉｔｌｉｎｇら、ＰＣＴ国際公開ＷＯ９３／０１２８８；ＭａｃＣａｆｆｅｒｔｙら、ＰＣＴ国際公開ＷＯ９２／０１０４７；Ｇａｒｒａｒｄら、ＰＣＴ国際公開ＷＯ９２／０９６９０；Ｌａｄｎｅｒら、ＰＣＴ国際公開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；Ｇａｒｒａｒｄら（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＮＹ）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に見出され得る。

【０１７６】

さらに、ヒト部分および非ヒト部分の両方を含む組換え抗２７７７抗体（例えば、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であり、これらは、標準的な組換えＤＮＡ技術を用いて作製され得る。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、当該分野で公知の組換えＤＮＡ技術により（例えば、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；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら 欧州特許出願第１７３，４９４号；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、ＰＣＴ国際公開ＷＯ ８６／０１５３３；Ｃａｂｉｌｌｙら、米国特許第４，８１６，５６７号；Ｃａｂｉｌｌｙら、欧州特許出願番号第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；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，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 ３２１：５５２－５２５；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４；およびＢｅｉｄｌｅｒら（１９８８）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４１：４０５３－４０６０に記載される方法を使用して）生成され得る。

【０１７７】

抗２７７７抗体は、２７７７タンパク質の発現の量および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）２７７７タンパク質を検出するために使用され得る。抗２７７７抗体は、例えば、所定の処置レジメの効力を決定するために、臨床試験の手順の一部として、組織におけるタンパク質レベルをモニターするために診断的に使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質と結合させる（すなわち、物理的に連結させる）ことによって容易にされ得る。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、生体発光物質、および放射活性物質が挙げられる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β（□）－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；適切な補欠分子族複合体の例には、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には、ウンベリフェロン（ｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｏｎｅ）、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、ダンシルクロライド、またはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例には、ルミノールが挙げられ；生体発光物質の例には、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には、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ、または^{3}Ｈが挙げられる。

【０１７８】

（ＶＩＩ．電子装置読み出し可能媒体およびアレイ）

本発明の２７７７調節因子を含む電子装置読み出し可能媒体もまた提供される。本明細書中で使用される場合、「電子装置読み出し可能媒体」とは、電子装置によって直接読み取られ得、かつアクセスされ得るデータまたは情報を保存、保持または収容するための任意の適切な媒体をいう。このような媒体としては、以下が挙げられ得るが、これらに限定されない：磁気的記憶媒体（例えば、フロッピー（登録商標）ディスク、ハードディスク記憶媒体および磁気テープ）；光学的記憶媒体（例えば、コンパクトディスク）；電気的記憶媒体（例えば、ＲＡＭ、ＲＯＭ、ＥＰＲＯＭ、ＥＥＰＲＯＭなど）；一般的なハードディスクおよびこれらのカテゴリーのハイブリッド（磁気的／光学的記憶媒体など）。この媒体は、本発明のマーカーをそこに記録しているように適合または構成される。

【０１７９】

本明細書中で使用される場合、用語「電子装置」は、データまたは情報を保存するように構成または適合された、任意の適切な計算装置もしくは処理装置または他のデバイスを包含することが意図される。本発明とともに使用するのに適した電子装置の例としては、以下が挙げられる：独立型の計算装置；ネットワーク（ローカルエリアネットワーク（ＬＡＮ）、広域ネットワーク（ＷＡＮ）インターネット、インターネットおよびエクストラネ

ット（Ｅｘｔｒａｎｅｔ）を含む）；電子的電気器具（例えば、携帯情報端末機器（ＰＤＡ）、携帯電話、ページャーなど）；ならびにローカル処理システムおよび分散処理システム。

【０１８０】

本明細書中で使用される場合、「記録される」とは、電子装置読み出し可能媒体上に情報を記憶またはコード化するプロセスをいう。当業者は、公知の媒体上に情報を記録するための任意の現在公知の方法を容易に採用して、本発明の２７７７調節因子を含む製品を作製し得る。

【０１８１】

種々のソフトウェアプログラムおよびフォーマットが、本発明のマーカー情報を電子装置読み出し可能媒体上に記憶するために使用され得る。例えば、２７７７調節因子に対応する核酸配列は、市販されるソフトウェア（ＷｏｒｄＰｅｒｆｅｃｔおよびＭｉｃｒｏＳｏｆｔ　Ｗｏｒｄなど）にフォーマットされて、ワードプロセシングテキストファイルで表示され得るか、またはＡＳＣＩＩファイル（データベースアプリケーション（ＤＢ２、Ｓｙｂａｓｅ、Ｏｒａｃｌｅなど）において記憶される）の形式で、ならびに他の形式で表示され得る。本発明の２７７７調節因子が記録された媒体を獲得または作製するために、多くのデータプロセッサー構造化フォーマット（例えば、テキストファイルまたはデータベース）を使用し得る。

【０１８２】

本発明の２７７７調節因子を読み出し可能形態で提供することによって、種々の目的のために、慣用的にマーカー配列情報へアクセスし得る。例えば、当業者は、読み出し可能形態の本発明のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を使用して、標的配列または標的構造モチーフを、そのデータ記憶手段中に記憶された配列情報と比較し得る。検索手段を使用して、特定の標的配列または標的モチーフに一致する、本発明の配列のフラグメントまたは領域を同定する。

【０１８３】

従って、本発明は、被験体が血液学的障害または血液学的障害に対する素因を有するか否かを決定するための方法を実施するための指示を保持するための媒体を提供し、ここで、この方法は、２７７７調節因子の存在または非存在を決定する工程、および２７７７調節因子の存在または非存在に基づいて、被験体が血液学的障害または血液学的障害に対する素因を有するか否かを決定する工程、ならびに／あるいはこの血液学的障害、または血液学的障害前状態についての特定の処置を推奨する工程、を包含する。

【０１８４】

本発明はさらに、電子システムおよび／またはネットワークにおいて、被験体が、２７７７調節因子に関連する血液学的障害または血液学的障害に対する素因を有するか否かを決定するための方法を提供し、ここで、この方法は、２７７７調節因子の存在または非存在を決定する工程、および２７７７調節因子の存在または非存在に基づいて、被験体が血液学的障害、または血液学的障害に対する素因を有するか否かを決定する工程、ならびに／あるいはこの血液学的障害または血液学的障害前状態についての特定の処置を推奨する工程、を包含する。この方法はさらに、被験体に関する表現型情報を受け取る工程、および／または被験体に関する表現型情報をネットワークから得る工程を包含する。

【０１８５】

本発明はまた、被験体が、２７７７調節因子に関連する血液学的障害または血液学的障害に対する素因を有するか否かを決定するための方法を、ネットワークの中で提供し、この方法は、２７７７調節因子と関連する情報を受ける工程、この被験体に関する表現型情報を受ける工程、２７７７調節因子および／または血液学的障害に対応する情報をネットワークから入手する工程、そして、表現型情報、２７７７調節因子、および入手された情報のうちの１つ以上に基づいて、この被験体が血液学的障害、または血液学的障害に対する素因を有するか否かを決定する工程、を包含する。この方法はさらに、血液学的障害、または血液学的障害前状態に対する特定の処置を推奨する工程を包含し得る。

【０１８６】
本発明はまた、被験体が、血液学的障害または血液学的障害に対する素因を有するか否かを決定するためのビジネス方法を提供し、この方法は、２７７７調節因子に関連する情報を受ける工程、被験体に関する表現型情報を受ける工程、２７７７調節因子および／または血液学的障害に対応する情報をネットワークネットワークから入手する工程、そして表現型情報、２７７７調節因子および入手した情報のうちの１つ以上に基いて、この被験体が血液学的障害、または血液学的障害に対する素因を有するか否かを決定する工程、を包含する。この方法はさらに、血液学的障害または血液学的障害前状態についての特定の処置を推奨する工程を包含し得る。
【０１８７】
本発明はまた、本発明の２７７７調節因子を含むアレイを包含する。このアレイは、そのアレイ中の１つ以上の遺伝子の発現をアッセイするために使用され得る。１つの実施形態において、アレイは、このアレイ中の遺伝子の組織特異性を確認するために、組織における遺伝子発現をアッセイするために使用され得る。この様式において、約７６００個までの遺伝子が、発現について同時にアッセイされ得る。これによって、１つ以上の組織において特異的に発現される一連の遺伝子を示すプロフィールの開発が可能となる。
【０１８８】
このような定性的決定に加えて、本発明は、遺伝子発現の定量を可能にする。従って、組織特異性だけでなく、組織中の一連の遺伝子の発現レベルもまた、確認可能である。従って、遺伝子は、その組織発現自体に基づいて、そしてその組織中の発現レベルに基づいて分類され得る。このことは、例えば、組織間の遺伝子発現の関係を確認することにおいて有用である。従って、１つの組織が混乱され得、そして第二の組織における遺伝子発現に対するその影響が、決定され得る。この文脈において、生物学的刺激に応答した、別の細胞型に対する１つの細胞型の影響が、決定され得る。このような決定は、例えば、遺伝子発現レベルで細胞－細胞相互作用の影響を知るために有用である。薬剤が、１つの細胞型を処置するために治療的に投与されるが、別の細胞型に対して所望でない影響を有する場合、本発明は、所望でない影響の分子的基礎を決定するためのアッセイを提供し、従って、相殺薬剤を同時投与する機会か、さもなければ望ましくない効果を処置する機会を提供する。同様に、単一の細胞型内でさえも、望ましくない生物学的影響が分子レベルで決定され得る。従って、標的遺伝子以外の遺伝子の発現に対する薬剤の影響が確認され、そして相殺され得る。
【０１８９】
別の実施形態において、このアレイは、そのアレイ中の１つ以上の遺伝子の発現のタイムコースをモニタリングするために使用され得る。このことは、本明細書中に開示されるような種々の生物学的文脈（例えば、血液学的障害の発症、血液学的障害の進行、および血液学的障害に関連する細胞形質転換のようなプロセス）において生じ得る。
【０１９０】
このアレイはまた、同じ細胞または異なる細胞中の他の遺伝子の発現に対する、ある遺伝子の発現の影響を確認するためにも有用である。このことは、例えば、最終的な標的または下流の標的が調節され得ない場合に、治療的介入のための代替的分子標的の選択を提供する。
【０１９１】
このアレイはまた、正常細胞および異常細胞中の１つ以上の遺伝子の差示的発現パターンを確認するためにも有用である。このことは、診断的介入または治療的介入のため分子標的として作用し得る一連の遺伝子を提供する。
【０１９２】
本発明は、限定として解釈されるべきではない以下の実施例によって、さらに例示される。本明細書を通じ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、ならびに図面および配列表は、本明細書中で参考として援用される。
【実施例】

【０１９３】
（実施例１：血液学的障害の調節因子としての２７７７の同定）
この実施例は、種々の器官由来の正常組織（特に、細胞分化の種々の時点の間の造血細胞）における、２７７７の分布を記載する。
【０１９４】
（材料および方法）
造血細胞および造血組織におけるヒト２７７７およびマウス２７７７の発現の分析について、以下の方法を使用した：
組織を、７週齢の雌Ｃ５７／Ｂｌ６Ｊマウスから収集した。総ＲＮＡを、トリゾール法を用いて調製し、そしてＤＮＡｓｅで処理して混入しているゲノムＤＮＡを除去した。ｃＤＮＡを、標準的な技術を使用して合成した。逆転写酵素の非存在下でのモックｃＤＮＡ合成は、コントロールＲＮＡ遺伝子のＰＣＲ増幅が検出不能であるサンプルを生じ、これによりゲノムＤＮＡ混入の有効な除去を確認した。２７７７発現を、ＴａｑＭａｎ（登録商標）定量的ＰＣＲ分析を、製造業者（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡ）の指示に従って実施して測定した。
【０１９５】
これらのサンプルは、以下の正常細胞および正常組織を含んだ：心臓、脳、肺、肝臓、胎仔肝臓、脾臓、腎臓、ＣＤ３（Ｔ細胞）、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１４、骨髄、ＣＤ３４、臍帯血（ｃｏｒｄ ｂｌｏｄｄ）、ＧＰＡ－ｈｉ、ＧＰＡ－ｌｏ、プールされた好中球、プールされた巨核球、Ｋ５６２（白血病細胞）、間質細胞、ヒト内皮細胞（「ＨＵＶＥＣ」）、ＨＣＡＥＣ（ヒト冠状動脈内皮細胞）、骨格筋、小腸、膵臓、脊髄（ｓｉｎａｌ ｃｏｒｄ）、乳房、卵巣、前立腺、赤血球、マクロファージおよびリンパ節（図１を参照のこと）。
【０１９６】
ＰＣＲプローブを、ヒト２７７７の配列（配列番号１）に基づいて、ＰｒｉｍｅｒＥｘｐｒｅｓｓソフトウェア（ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）によって設計した。
【０１９７】
異なる組織間の結果を標準化するために、異なる蛍光標識によって識別可能な２つのプローブを、各サンプルに添加した。従って、２７７７遺伝子についてのプローブおよび内部コントロールとしてのコントロールＲＮＡについてのプローブの差示的標識は、同じウェル中での同時測定を可能にした。順方向プライマーおよび逆方向プライマーならびにコントロールＲＮＡおよびヒト２７７７の両方についてのプローブを、ＴａｑＭａｎ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（ＰＥ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）に添加した。プライマーおよびプローブの最終濃度は変動し得るが、各々は、所定の実験内で内部で一貫した。代表的な実験は、順方向および逆方向のプライマー２００ｎＭ＋コントロールＲＮＡについてのプローブ１００ｎＭ、ならびに順方向および逆方向のプライマー各々４５００ｎＭ＋マウス２７７７－２についてのプローブ１５０ｎＭを含んだ。ＴａｑＭａｎマトリックス実験を、ＡＢＩ ＰＲＩＳＭ ７７０ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（ＰＥ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して実施した。サーマルサイクラー条件は、以下の通りであった：５０℃で２分間、および９５℃で１０分間の維持、その後、（９５℃で１５秒間、続いて６０℃で１分間）×４０サイクルの、２段階ＰＣＲ。
【０１９８】
以下の方法を、同じ組織中のコントロールＲＮＡ発現と比較して、組織サンプル中の２７７７遺伝子発現を定量的に計算するために使用した。ＰＣＲ増幅が開始された閾値を、製造業者のソフトウェアを使用して決定した。閾値でのＰＣＲサイクル数を、ＣＴと称した。相対的発現を、以下のように計算した：
$2^{-((CT\,test-CT\,18S)\text{目的の組織}-((CT\,test-CT\,18S)\text{パネル中最も低い発現の組織})}$
サンプルを、二連で行い、そして２つの相対的発現の平均を示す。全てのプローブを、高

い発現レベルを有する組織からのＲＮＡの連続希釈に対して試験し、そして内部コントロール１８Ｓについての傾きと類似の傾きを有するテンプレートｃＤＮＡの量に対して線形であった相対発現レベルを示したプローブだけを、使用した。

【０１９９】

ノーザンブロットのために、ヒトｍＲＮＡブロット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を、５２０ヌクレオチドのＳａｃＩフラグメント（これは、ヒト２７７７の５’コード配列の４２０ヌクレオチドおよび５’ＵＴＲの１００ヌクレオチドを含む）を用いてプローブした。プローブを、^{32}Ｐで標識し、そしてＲａｐｉｄ－Ｈｙｂ緩衝液（Ａｍｅｒｓｈａｍ）を使用してハイブリダイズさせた。

【０２００】

（結果）

２７７７の発現を、種々の組織および造血細胞において、インビトロおよびインビボの両方で試験した。図１に示されるように、上記の実験の結果は、２７７７が、インビボおよびインビトロの両方で、赤血球系統の細胞において高度に発現されることを示す。具体的には、赤血球培養物は、分化の６日目まで、発現レベルの増加を示した。２７７７はまた、ＢＦＵ－Ｅ細胞およびＧＰＡ－ｌｏ細胞においても高度に発現されたが、ＧＰＡ－ｈｉ細胞ではインビボで低レベルで発現された。器官の説明部分として、２７７７は、脳、ＨＵＶＥＣ細胞および赤血球細胞において高レベルで発現された。２７７７の発現を確認するために、ノーザンブロットを、市販のＣｌｏｎｔｅｃｈ　Ｂｌｏｔｓを使用して実施した。

【０２０１】

上記の結果は、２７７７が造血細胞において発現されることを示す。従って、２７７７は、赤血球を刺激するペプチドホルモンの調節において重要な役割を果たし得る。

【０２０２】

（等価物）

当業者は、本明細書中に記載される発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、または慣用的に過ぎない実験を使用してその多く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よって包含されることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【０２０３】

【図１Ａ】図１Ａは、本発明の２７７７分子の組織分布を決定するための、種々の組織、細胞培養物および細胞株における２７７７ｃＤＮＡ発現のＴａｑＭａｎ^{TM}分析の結果を示すグラフである。

【図１Ｂ】図１Ｂは、本発明の２７７７分子の組織分布を決定するための、種々の組織、細胞培養物および細胞株における２７７７ｃＤＮＡ発現のＴａｑＭａｎ^{TM}分析の結果を示すグラフである。

【図１Ｃ】図１Ｃは、本発明の２７７７分子の組織分布を決定するための、種々の組織、細胞培養物および細胞株における２７７７ｃＤＮＡ発現のＴａｑＭａｎ^{TM}分析の結果を示すグラフである。

【図１Ｄ】図１Ｄは、本発明の２７７７分子の組織分布を決定するための、種々の組織、細胞培養物および細胞株における２７７７ｃＤＮＡ発現のＴａｑＭａｎ^{TM}分析の結果を示すグラフである。

【図２】図２は、ヒト２７７７タンパク質の、構造的、疎水性、および抗原性の分析を示す。

【図３】図３Ａ～３Ｂは、２７７７のｃＤＮＡ配列（配列番号１）およびアミノ酸配列（配列番号２）を示す。

【図１Ａ】

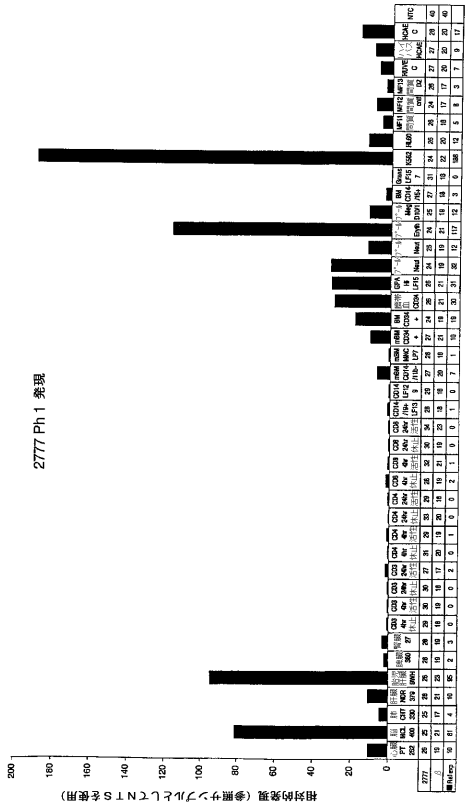


FIGURE 1A

【図１Ｂ】

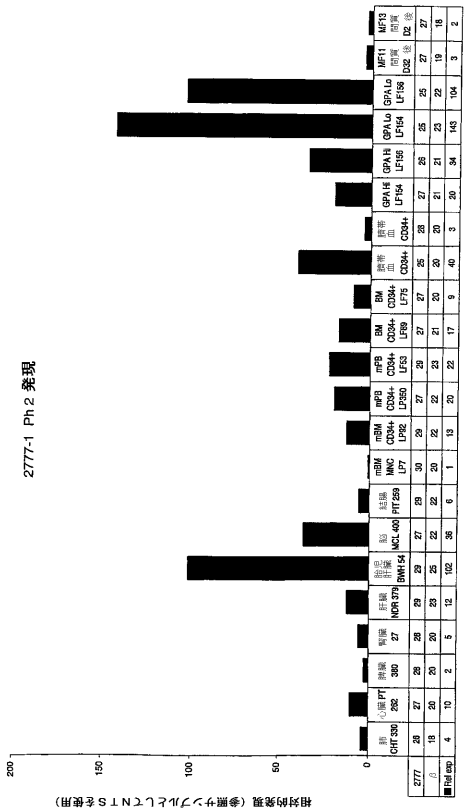


FIGURE 1B

【図１Ｃ】

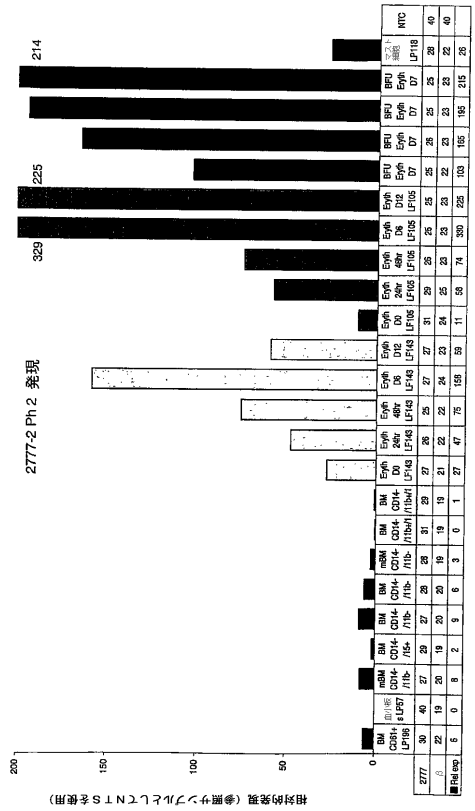


FIGURE 1C

【図１Ｄ】

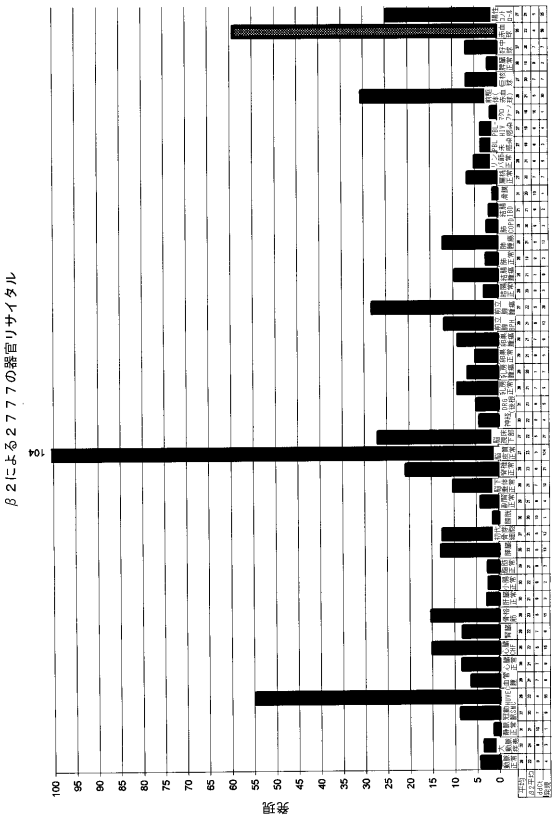


FIGURE 1D

【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
8 May 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/037164 A2

(51) International Patent Classification[7]: A61B

(21) International Application Number: PCT/US02/34565

(22) International Filing Date: 28 October 2002 (28.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/335,251 31 October 2001 (31.10.2001) 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)*: **CARROLL, Joseph, M.** [US/US]; 113 Sciarappa Street, Cambridge, MA 02141 (US).

(74) Agent: **SIOUSSAT, Tracy, M.**; Intellectual Property Group, 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, 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:
— *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 03/037164 A2

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF HEMATOLOGICAL DISORDERS USING 2777

(57) Abstract: The present invention relates to methods and compositions for the diagnosis and treatment of hematological disorders, including, but not limited to, apalstic anemia, hemophilia, sickle cell anemia, thalassisemia, blood loss and other blood disorders, *e.g.*, blood disorders related to bone marrow irradiation or chemotherapy treatment or renal failure. The invention further provides methods for identifying a compound capable of treating a hematological disorder. The invention also provides methods for identifying a compound capable of modulating a hematopoietic cell activity. Yet further, the invention provides a method for modulating a hematopoietic cell activity. In addition, the invention provides a method for treating a subject having a hematological disorder characterized by aberrant 2777 polypeptide activity or aberrant 2777 nucleic acid expression. In another aspect, the invention provides methods for increasing a hematopoietic cell proliferation in a subject and methods for modulating hematopoietic cell apoptosis in a subject.

METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF HEMATOLOGICAL DISORDERS USING 2777

This application claims priority to U.S. provisional application number 60/335,251, filed October 31, 2001, the entire contents of which are incorporated herein by reference.

Hematological disorders are blood associated disorders. Blood is a highly specialized tissue which carries oxygen and nutrients to all parts of the body and waste products back to the lungs, kidneys and liver for disposal. Thus, blood maintains communication between different parts of the body. Blood is also an essential part of the immune system, crucial to fluid and temperature balance, a hydraulic fluid for certain functions and a highway for hormonal messages.

All blood cells in adults are produced in the bone marrow. Red cells, white cells and platelets are produced in the marrow of bones, especially the vertebrae, ribs, hips, skull and sternum. These essential blood cells fight infection, carry oxygen and help control bleeding. Specifically, red blood cells are disc-shaped cells containing hemoglobin, which enables these cells to pick up and deliver oxygen to all parts of the body. White blood cells are the body's primary defense against infection. They can move out of the blood stream and reach tissues being invaded. Platelets are small blood cells that control bleeding by forming clusters to plug small holes in blood vessels and assist in the clotting process.

Each day the bone marrow generates and releases into the circulation several billion fully-differentiated, functional blood cells. Hematopoiesis is the process by which blood cells develop and differentiate from pluripotent stem cells in the bone marrow. Production of these cells derives from a small stock of quiescent progenitor cells (including the most primitive stem cells and other less primitive but still immature progenitors). The most primitive stem cells have the capacity to generate several billion cells containing all blood lineages. The production of such a large number of cells is achieved by extensive proliferation coupled with successive differentiation steps leading to a balanced production of mature cells.

The production of mature blood cells by the hematopoietic system involves complex interactions between soluble factors, the marrow microenvironment, and hematopoietic progenitors. In particular, hematopoiesis involves a complex interplay of polypeptide growth factors acting via membrane-bound receptors on their target cells. Signaling by growth factors results in cellular proliferation and differentiation, with a

response to a particular growth factor often being lineage-specific and/or stage-specific. Development of a single cell type, such as a red blood cell, from a stem cell may require the coordinated action of a plurality of growth factors acting in the proper sequence.

Impaired blood cell production occurs when the proliferation and differentiation of the stem cells or committed cells is disturbed. Impaired blood cell production is the root of hematological disorders. Some of the more common diseases caused by impaired blood cell production, *i.e.*, hematological disorders, include aplastic anemia, hypoplastic anemia, pure red cell aplasia and anemia associated with renal failure or endocrine disorders. Disturbances in the proliferation and differentiation of erythroblasts include defects in DNA synthesis such as impaired utilization of vitamin B12 or folic acid and the megaloblastic anemias, defects in heme or globin synthesis, and anemias of unknown origins such as sideroblastic anemia, anemia associated with chronic infections such as malaria, trypanosomiasis, HIV, hepatitis virus or other viruses, and myelophthisic anemias caused by marrow deficiencies. Impaired blood cell production also affects cancer patients and other autoimmune disease patients who receive bone marrow irradiation or chemotherapy treatment.

Hematological disorders are, thus, a diverse family of disorders embracing clinical and laboratory aspects of a large number of diseases, both malignant and non-malignant. Although some progress has been made in diagnostic and therapeutic strategies to combat hematological disorders, molecular advances are continuing at a rate exceeding the rate of progress in therapeutics. Thus, novel methods for diagnosis and treatment of hematological disorders based on known molecular advances are urgently needed in the field.

The present invention provides methods and compositions for the diagnosis and treatment of hematological disorders. The present invention is based, at least in part, on the discovery that the 2777 gene is expressed at high levels in hematopoietic cells. Specifically, 2777 is significantly expressed in erythroid cells both *in vitro* and *in vivo*. 2777 is also expressed in erythroid progenitor (BFU-E) cells and Glycophorin A positive-lo (GPA-lo) cells *in vivo* but not in Glycophorin A positive-hi (GPA-hi) cells *in vivo* (see Figure 1). Since peptidases belonging to the family of which 2777 is a member are known to degrade peptide hormones, the expression of 2777 in the hematopoietic cells indicates that 2777 is involved in degrading peptide hormones which modulate, *e.g.*, stimulate erythropoiesis. Thus, the 2777 molecules function as modulators of hematopoietic cell activity and are useful as targets and therapeutic agents for the modulation of

hematopoietic cell activity, *e.g.*, hematopoietic cell proliferation, and the treatment of hematological disorders.

Accordingly, the present invention provides methods for the diagnosis and treatment of hematological diseases including but not limited to apalstic anemia, hemophilia, sickle cell anemia, thalassemia, blood loss and other blood disorders, *e.g.*, increased blood pressure or blood disorders related to bone marrow irradiation treatments, chemotherapy treatments or compromised kidney function.

In one aspect, the invention provides methods for identifying a compound capable of treating a hematological disorder, *e.g.*, anemia or thalassemia. The method includes assaying the ability of the compound to modulate 2777 nucleic acid expression or 2777 polypeptide activity. In one embodiment, the ability of the compound to modulate nucleic acid expression or 2777 polypeptide activity is determined by detecting modulation of proliferation of a hematopoietic cell. In another embodiment, the ability of the compound to modulate nucleic acid expression or 2777 polypeptide activity is determined by detecting modulation of apoptosis of a hematopoietic cell.

In another aspect, the invention provides methods for identifying a compound capable of modulating a hematological activity, *e.g.*, hematopoietic cell proliferation, differentiation, or cell death. The method includes contacting a cell expressing a 2777 nucleic acid or polypeptide (*e.g.*, a hematopoietic cell) with a test compound and assaying the ability of the test compound to modulate the expression of a 2777 nucleic acid or the activity of a 2777 polypeptide.

Another aspect of the invention provides a method for modulating a hematological activity, *e.g.*, hematopoietic cell proliferation, cell differentiation, or cell death. The method includes contacting a hematopoietic cell with an effective amount of a 2777 modulator, for example, an anti-2777 antibody, a 2777 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or a fragment thereof, a 2777 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 90 percent identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, an isolated naturally occurring allelic variant of a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, a small molecule, an antisense 2777 nucleic acid molecule, a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1 or a fragment thereof, or a ribozyme.

In yet another aspect, the invention features a method for treating a subject having a hematological disorder, *e.g.*, a hematological disorder characterized by aberrant 2777 polypeptide activity or aberrant 2777 nucleic acid expression, *e.g.*, anemia or thalessemia.

The method includes administering to the subject a therapeutically effective amount of a 2777 modulator, *e.g.*, in a pharmaceutically acceptable formulation or by using a gene therapy vector. Embodiments of this aspect of the invention include the 2777 modulator being a small molecule, an anti-2777 antibody, a 2777 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or a fragment thereof, a 2777 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 90 percent identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, an isolated naturally occurring allelic variant of a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, an antisense 2777 nucleic acid molecule, a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1 or a fragment thereof, or a ribozyme.

In another aspect, the invention provides a method for modulating, *e.g.*, increasing or decreasing, hematopoietic cell proliferation in a subject by administering to the subject a 2777 modulator in an amount effective for modulating hematopoietic cell proliferation.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and claims.

Figures 1A-1D are graphs depicting the results of a TaqMan™ analysis of 2777 cDNA expression in various tissues, cell cultures and cell lines to determine the tissue distribution of the 2777 molecules of the present invention.

Figure 2 depicts a structural, hydrophobicity, and antigenicity analysis of the human 2777 protein.

Figure 3A-3B depicts the cDNA sequence (SEQ ID NO:1) and amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of 2777.

In eukaryotic cells, most of the cytosolic peptides generated by the proteosome undergo complete degradation by different classes of peptidases. This process of protein degradation is part of the homeostatic mechanism which is essential for the structure and function of the cells (Partaro, F.C.V., *et al.* (2001) *Eur. J. Biochem.* 268:887-894). Thimet oligopeptidase ("2777") is a known zinc-dependent peptidase member of the metallopeptidase M3 family (Oliveira, V., *et al.* (2001) *Anal. Biochem.* 292:257-265). This enzyme is a true peptidase and only cleaves short (less than 20 residues) substrates (Smith, A.I., *et al.* (2000) *Biochem. Soc. Transac.* 28(4):430-434).

2777 is known to be widely distributed in cells and tissues throughout the body. In particular, high levels of 2777 have been localized to the brain, pituitary and testis, with lower levels in other tissues such as the liver, kidney, spleen and lung (Smith, A.I., *et al.* (2000) *Biochem. Soc. Transac.* 28(4):430-434). The distribution of 2777 in areas rich in

neuropeptide content is consistent with a role for this enzyme in the processing/metabolism of bioactive peptides. In fact, studies have shown that 2777 hydrolyzes the biologically active neuropeptide, neurotensin ("NT"), *in vitro* and *in vivo* experiments have shown that NT degradation can be blocked by 2777 inhibitors (Oliveira, V., *et al.* (2001) *Anal. Biochem.* 292:257-265).

However, the ubiquitous distribution of 2777 supports a general function of this enzyme in oligopeptidase metabolism, *i.e.*, a role in both the central and peripheral modulation of a number of biologically important peptides. Studies have shown that 2777 is capable of *in vitro* degradation or generation of a number of biologically active peptides (other than NT), including dynorphins, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and Substance P. (McCool, S. Pierotti, A. (2000) *DNA Cell Biol.* 19(12):729-738). 2777 has also been implicated in several physiologically important processes. For example, a number of opioid peptides are substrates for this enzyme, including the novel opioid receptor ligand nociceptin (McCool, S. Pierotti, A. (2000) *DNA Cell Biol.* 19(12):729-738).

The present invention is based, at least in part, on the heretofore unknown expression of 2777 in hematopoietic cells. Specifically, the present invention demonstrates that 2777 is expressed at high levels in cells of erythroid lineage both *in vitro* and *in vivo*. Erythroid cell cultures show increasing levels of 2777 expression up to Day 6 of development (see Figure 1). 2777 is also expressed at high levels in erythroid progenitor ("BFU-E") cells and Glycophorin A positive-lo ("GPA-lo") *in vivo* cell populations, but at low levels GPA-hi *in vivo* cell populations. In organ recital experiments, 2777 was expressed at high levels in the brain, HUVEC cells and erythroid cells (see Figure 1). Glycophorin A protein is known as a late erythroid lineage specific protein. The marked expression of 2777 in GPA-lo cell populations, and the relative non-expression of 2777 in GPA-hi cell populations, indicates that 2777 degrades peptide hormones that stimulate erythropoiesis. Since modulation of erythropoiesis is an important aspect of hematological disorders, modulation of 2777 is an important therapeutic avenue in the treatment of these disorders. Accordingly, the present invention provides methods and compositions for the diagnosis and treatment of hematological disorders.

As used herein, a "hematological disorder" includes a disease, disorder, or condition which affects a hematopoietic cell or tissue. Hematological disorders include diseases, disorders, or conditions associated with aberrant hematological content or

function. Hematological disorders can be characterized by a misregulation (*e.g.*, downregulation or upregulation) of 2777 activity. Examples of hematological disorders include disorders resulting from bone marrow irradiation or chemotherapy treatments for cancer, disorders such as Pernicious Anemia, Hemorrhagic Anemia, Hemolytic Anemia, Aplastic Anemia, Sickle Cell Anemia, Sideroblastic Anemia, Anemia associated with chronic infections such as Malaria, Trypanosomiasis, HIV, Hepatitis virus or other viruses, Myelophthisic Anemias caused by marrow deficiencies, renal failure resulting from Anemia, Anemia, Polycethemia, Infectious Mononucleosis (IM), Acute Non-Lymphocytic Leukemia (ANLL), Acute Myeloid Leukemia (AML), Acute Promyelocytic Leukemia (APL), Acute Myelomonocytic Leukemia (AMMoL), Polycethemia Vera, Lymphoma, Acute Lymphocytic Leukemia (ALL), Chronic Lymphocytic Leukemia, Wilm's Tumor, Ewing's Sarcoma, Retinoblastoma, Hemophilia, disorders associated with an increased risk of Thrombosis, Herpes, Thalessemia, antibody-mediated disorders such as transfusion reactions and Erythroblastosis, mechanical trauma to red blood cells such as micro-angiopathic hemolytic anemias, Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and disseminated intravascular coagulation, infections by parasites such as Plasmodium, chemical injuries from, *e.g.*, lead poisoning, and Hypersplenism.

As used herein, "2777" encompasses proteins characterized by their ability to modulate signal transduction to thereby modulate hematopoietic cell proliferation or apoptosis *in vitro* or *in vivo*. A representative human 2777 cDNA sequence is shown herein in SEQ ID NO:1, and the corresponding amino acid sequence is shown in SEQ ID NO:2. The coding sequence is shown in SEQ ID NO:3. Those skilled in the art will recognize that the illustrated sequences correspond to a single allele of the human 2777 gene, and that allelic variation is expected to exist. Allelic variants include those containing silent mutations and those in which mutations result in amino acid sequence changes. It will also be evident that one skilled in the art could create additional variants, such as by engineering sites that would facilitate manipulation of the nucleotide sequence using alternative codons, by substitution of codons to produce conservative changes in amino acid sequence, etc. The use of allelic and engineered variant 2777s is contemplated by the present invention. The use of 2777 molecules from non-human species are also contemplated by the present invention.

The present invention provides methods and compositions for the diagnosis and treatment of hematological disorders. The 2777 modulators identified according to the methods of the invention can be used to modulate hematopoietic cell proliferation and are,

therefore, useful in treating or diagnosing hematological disorders. For example, inhibition of the activity of a 2777 molecule (*e.g.*, using a 2777 modulator identified using the screening assays described herein) can cause increased hematopoietic cell proliferation and, therefore, increased blood cell production in a subject, thereby preventing hematological disorders such as aplastic anemia or sickle cell anemia in a subject.

Alternatively, stimulation of the activity of a 2777 molecule (*e.g.*, using a 2777 modulator identified using the screening assays described herein) can cause decreased hematopoietic cell proliferation and, therefore, decreased blood cell production in a subject, thereby preventing hematological disorders such as hemorrhagic anemia, polycethemia, infectious mononucleosis or leukemia in a subject.

As used interchangeably herein, "2777 activity," "biological activity of 2777" or "functional activity of 2777," includes an activity exerted by a 2777 protein, polypeptide or nucleic acid molecule on a 2777 responsive cell or tissue, *e.g.*, a hematopoietic cell, or on a 2777 protein substrate, as determined *in vivo*, or *in vitro*, according to standard techniques. 2777 activity can be a direct activity, such as an association with a 2777-target molecule. As used herein, a "substrate" or "target molecule" or "binding partner" is a molecule with which a 2777 protein binds or interacts in nature, such that 2777-mediated function, *e.g.*, modulation of apoptosis or modulation of cell proliferation, is achieved. A 2777 target molecule can be a non-2777 molecule or a 2777 protein or polypeptide. Examples of such target molecules include proteins in the same signaling path as the 2777 protein, *e.g.*, proteins which may function upstream (including both stimulators and inhibitors of activity) or downstream of the 2777 protein in a pathway involving regulation of hematopoietic cell proliferation or apoptosis. Alternatively, a 2777 activity is an indirect activity, such as a cellular signaling activity mediated by interaction of the 2777 protein with a 2777 target molecule. The biological activities of 2777 are described herein. For example, the 2777 proteins can have one or more of the following activities: (1) they modulate hematopoietic cell proliferation; (2) they modulate apoptosis of hematopoietic cells; and (3) they modulate degradation of peptide hormones involved in erythropoiesis.

As used herein, the term "hematopoietic cell" includes yolk sac stem cells, primitive erythroid cells, fetal liver cells, fetal spleen cells, fetal bone marrow cells, non-fetal bone marrow cells, megakaryocytes, stem cells, lymphoid stem cells, myeloid stem cells, progenitor cells, progenitor lymphocytes, progenitor T lymphocytes, progenitor B lymphocytes, progenitor erythrocytes, progenitor neutrophils, progenitor eosinophils, progenitor basophils, progenitor monocytes, progenitor mast cells, progenitor platelets,

committed lymphocytes, committed T lymphocytes, committed B lymphocytes, committed erythrocytes, committed neutrophils, committed eosinophils, committed basophils, committed monocytes, committed mast cells, committed platelets, differentiated lymphocytes, differentiated T lymphocytes, differentiated B lymphocytes, differentiated erythrocytes, differentiated neutrophils, differentiated eosinophils, differentiated basophils, differentiated monocytes, differentiated mast cells, differentiated platelets, mature lymphocytes, mature T lymphocytes, mature B lymphocytes, mature erythrocytes, mature neutrophils, mature eosinophils, mature basophils, mature monocytes, mature mast cells, and mature platelets.

As used herein, the term "progenitor cell" includes any somatic cell which has the capacity to generate fully differentiated, functional progeny by differentiation and proliferation. Progenitor cells include progenitors from any tissue or organ system, including, but not limited to, blood, nerve, muscle, skin, gut, bone, kidney, liver, pancreas, thymus, and the like. Progenitor cells are distinguished from "committed cells" and "differentiated cells," which are defined as those cells which may or may not have the capacity to proliferate, *i.e.*, self-replicate, but which are unable to undergo further differentiation to a different cell type under normal physiological conditions. Moreover, progenitor cells are further distinguished from abnormal cells such as cancer cells, especially leukemia cells, which proliferate (self-replicate) but which generally do not further differentiate, despite appearing to be immature or undifferentiated.

Progenitor cells include all the cells in a lineage of differentiation and proliferation prior to the most differentiated or the fully mature cell. Thus, for example, progenitors include the skin progenitor in the mature individual, which is capable of differentiation to only one type of cell, but which is itself not fully mature or fully differentiated. Production of mature, functional blood cells results from proliferation and differentiation of "unipotential progenitors," *i.e.*, those progenitors which have the capacity to make only one type of one type of blood cell. For red blood cell production, a progenitor called a "CFU-E" (colony forming unit-erythroid) has the capacity to generate two to 32 progeny cells.

Various other hematopoietic progenitors have been characterized. For example, hematopoietic progenitor cells include those cells which are capable of successive cycles of differentiating and proliferating to yield up to eight different mature hematopoietic cell lineages. At the most primitive or undifferentiated end of the hematopoietic spectrum, hematopoietic progenitor cells include the hematopoietic "stem cells." These rare cells,

which represent 1 in 10,000 to 1 in 100,000 of cells in the bone marrow, each have the capacity to generate a billion mature blood cells of all lineages and are responsible for sustaining blood cell production over the life of an animal. They reside in the marrow primarily in a quiescent state and may form identical daughter cells through a process called self-renewal. Accordingly, such an uncommitted progenitor can be described as being "totipotent," *i.e.*, both necessary and sufficient for generating all types of mature blood cells. Progenitor cells which retain a capacity to generate all blood cell lineages but which can not self-renew are termed "pluripotent." Cells which can produce some but not all blood lineages and can not self-renew are termed "multipotent."

As used herein, "hematopoietic cell activity" includes an activity exerted by a hematopoietic cell, or an activity that takes place in a hematopoietic cell. For example, such activities include cellular processes that contribute to the physiological role of hematopoietic cells, such as hematopoiesis, but are not limited to, cell proliferation, differentiation, growth, migration and programmed cell death.

As used herein, the term "modulate" includes alteration of, *e.g.*, by increasing or decreasing the particular parameter being described, *e.g.*, 2777 activity.

As used herein the term "apoptosis" includes programmed cell death which can be characterized using techniques which are known in the art. Apoptotic cell death can be characterized, *e.g.*, by cell shrinkage, membrane blebbing and chromatin condensation culminating in cell fragmentation. Cells undergoing apoptosis also display a characteristic pattern of internucleosomal DNA cleavage.

I. Screening Assays:

The invention provides methods (also referred to herein as "screening assays") for identifying modulators, *i.e.*, candidate or test compounds or agents (*e.g.*, peptides, peptidomimetics, small molecules, ribozymes, or 2777 antisense molecules) which bind to 2777 proteins, have a stimulatory or inhibitory effect on 2777 expression or 2777 activity, or have a stimulatory or inhibitory effect on the expression or activity of a 2777 target molecule. Compounds identified using the assays described herein may be useful for treating hematological disorders.

Candidate/test compounds include, for example, 1) peptides such as soluble peptides, including Ig-tailed fusion peptides and members of random peptide libraries (see, *e.g.*, Lam, K.S. *et al.* (1991) *Nature* 354:82-84; Houghten, R. *et al.* (1991) *Nature* 354:84-86) and combinatorial chemistry-derived molecular libraries made of D- and/or L-

configuration amino acids; 2) phosphopeptides (*e.g.*, members of random and partially degenerate, directed phosphopeptide libraries, see, *e.g.*, Songyang, Z. *et al.* (1993) *Cell* 72:767-778); 3) antibodies (*e.g.*, polyclonal, monoclonal, humanized, anti-idiotypic, chimeric, and single chain antibodies as well as Fab, F(ab')$_2$, Fab expression library fragments, and epitope-binding fragments of antibodies); and 4) small organic and inorganic molecules (*e.g.*, molecules obtained from combinatorial and natural product libraries).

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; 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).

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 Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

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 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.*).

Assays that may be used to identify compounds that modulate 2777 activity include assays for cytochrome C release from mitochondria during cell apoptosis, *e.g.*, hematopoietic cell apoptosis (as described in, for example, Bossy-Wetzel E. *et al.* (2000) *Methods in Enzymol.* 322:235-42); cytofluorometric quantitation of nuclear apoptosis induced in a cell-free system (as described in, for example, Lorenzo H.K. *et al.* (2000)

Methods in Enzymol. 322:198-201); apoptotic nuclease assays (as described in, for example, Hughes F.M. (2000) *Methods in Enzymol.* 322:47-62); analysis of apoptotic cells, *e.g.*, apoptotic hematopoietic cells, by flow and laser scanning cytometry (as described in, for example, Darzynkiewicz Z. *et al.* (2000) *Methods in Enzymol.* 322:18-39); detection of apoptosis by annexin V labeling (as described in, for example, Bossy-Wetzel E. *et al.* (2000) *Methods in Enzymol.* 322:15-18); transient transfection assays for cell death genes (as described in, for example, Miura M. *et al.* (2000) *Methods in Enzymol.* 322:480-92); and assays that detect DNA cleavage in apoptotic cells, *e.g.*, apoptotic hematopoietic cells (as described in, for example, Kauffman S.H. *et al.* (2000) *Methods in Enzymol.* 322:3-15).

Assays that may be used to identify the peptidase activity of 2777, *e.g.*, hydrolysis of biologically active peptides by 2777, include Fluorimetric enzyme assays as described in Molina *et al.* (2000) *Life Sciences* 67:509-520; HPLC analysis of hydrolyzed peptides as described in Molina *et al.* (2000) *Life Sciences* 67:509-520; peptidase assays as described in Saric, T., *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276(39):36474-36481 (2777 activity was analyzed using the quenched fluorogenic substrate); kinetic assays as described in Oliveira, V. (2001) *Biochemistry* 40:4417-4425; measurement of peptidase activity, *e.g.*, 2777 activity, and statistical analysis as described in Smith, A. I., *et al.* (2000) *Biochemical Society* 28(4):430-434; and kinetic assays, determination of bonds cleaved by 2777 and the amino acid analysis (to determine the amino acid compositions and the concentration of 2777) as described in Oliveira, V., (2001) *Anal. Biochem* 292:257-265.

Proliferation assays that may be used to identify compounds that modulate 2777 activity include assays using 32D cells (a multi-lineage murine hematopoietic cell line) as described in U.S. Patent No. 6,231,880, the contents of which are incorporated herein by reference. Cell proliferation assays which measure the growth phenotype of cells with an ablated growth regulatory gene of interest, *e.g.*, 2777 are described in Sudershan, C., *et al.* (1998) *J. Cell. Physiol.* 176:67-75. The ability of a test compound to modulate 2777 activity may also be determined by monitoring cellular processes such as cell division, protein synthesis, nucleic acid (DNA or RNA) synthesis, nucleic acid (principally DNA) fragmentation and apoptosis.

In one aspect, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses a 2777 protein, or biologically active portion thereof, that is believed to be involved in the modulation of hematopoietic cell proliferation of hematopoietic cells is contacted with a test compound and the ability of the test compound to modulate 2777 activity is

determined. In a preferred embodiment, the biologically active portion of the 2777 protein includes a domain or motif that can modulate apoptosis of hematopoietic cells and/or which can modulate hematopoietic cell proliferation. Determining the ability of the test compound to modulate 2777 activity can be accomplished by monitoring, for example, the production of one or more specific metabolites in a cell which expresses 2777 (see, *e.g.*, Saada *et al.* (2000) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 269: 382-386) or by monitoring cell death, cell proliferation, or cell differentiation in the cell. The cell, for example, can be of mammalian origin, *e.g.*, a hematopoietic cell such as a committed erythrocyte or a progenitor cell.

The ability of the test compound to modulate 2777 binding to a substrate or to bind to 2777 can also be determined. Determining the ability of the test compound to modulate 2777 binding to a substrate can be accomplished, for example, by coupling the 2777 substrate with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the 2777 substrate to 2777 can be determined by detecting the labeled 2777 substrate in a complex. Alternatively, 2777 could be coupled with a radioisotope or enzymatic label to monitor the ability of a test compound to modulate 2777 binding to a 2777 substrate in a complex. Determining the ability of the test compound to bind 2777 can be accomplished, for example, by coupling the compound with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the compound to 2777 can be determined by detecting the labeled 2777 compound in a complex. For example, 2777 substrates can be labeled with ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, or ^{3}H, either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemmission or by scintillation counting. Alternatively, compounds can 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 to interact with 2777 without the labeling of any of the interactants. For example, a microphysiometer can be used to detect the interaction of a compound with 2777 without the labeling of either the compound or the 2777 (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 2777.

The ability of a 2777 modulator to modulate, *e.g.*, inhibit or increase, 2777 activity can also be determined through screening assays which identify modulators which either increase or decrease apoptosis and cell proliferation. In one embodiment, the invention provides for a screening assay involving contacting cells which express a 2777 protein or polypeptide with a test compound, and examining the cells for the morphological features of apoptosis. For example, cells expressing a 2777 protein or polypeptide can be contacted with a test compound and nuclearly stained with acridine orange. Subsequently, nuclear DNA can be extracted and analyzed for DNA fragmentation as described in Inohora *et al.*, (1997) *EMBO J.* 16:1686-1694.

To determine whether a test compound modulates 2777 expression, *in vitro* transcriptional assays can be performed. To perform such an assay, the full length promoter and enhancer of 2777 can be linked to a reporter gene such as chloramphenicol acetyltransferase (CAT) and introduced into host cells. The same host cells can then be transfected with the test compound. The effect of the test compound can be measured by testing CAT activity and comparing it to CAT activity in cells which do not contain the test compound. An increase or decrease in CAT activity indicates a modulation of 2777 expression and is, therefore, an indicator of the ability of the test compound to modulate hematopoietic cell proliferation.

In yet another embodiment, an assay of the present invention is a cell-free assay in which a 2777 protein or biologically active portion thereof (*e.g.*, (*e.g.*, the 2777 gene without the twenty-two amino terminus amino acids) is contacted with a test compound and the ability of the test compound to bind to or to modulate (*e.g.*, stimulate or inhibit) the activity of the 2777 protein or biologically active portion thereof is determined. Preferred biologically active portions of the 2777 proteins to be used in assays of the present invention include fragments which participate in interactions with non-2777 molecules, *e.g.*, fragments with high surface probability scores. Binding of the test compound to the 2777 protein can be determined either directly or indirectly as described above. Determining the ability of the 2777 protein to bind to a test compound 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; Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). As used herein, "BIA" is a technology for 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 more than one embodiment of the above assay methods of the present invention, it may be desirable to immobilize either 2777 or a 2777 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 2777 protein, or interaction of a 2777 protein with a 2777 target molecule in the presence and absence of a test 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/2777 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 2777 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 is immobilized in the case of beads, and complex formation is determined either directly or indirectly, for example, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of 2777 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 2777 protein or a 2777 target molecule can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated 2777 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 which are reactive with 2777 protein or target molecules but which do not interfere with binding of the 2777 protein to its target molecule can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or 2777 protein is trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the 2777 protein or target molecule, as well as enzyme-linked assays which rely on detecting an enzymatic activity associated with the 2777 protein or target molecule.

In yet another aspect of the invention, the 2777 protein or fragments thereof (*e.g.*, the N-terminal region of the 2777 protein that is believed to be involved in the regulation of apoptotic activity) 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.* (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; and Brent WO94/10300), to identify other proteins, which bind to or interact with 2777 ("2777-binding proteins" or "2777-bp") and are involved in 2777 activity. Such 2777-binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the 2777 proteins or 2777 targets as, for example, downstream elements of a 2777-mediated signaling pathway. Alternatively, such 2777-binding proteins are likely to be 2777 inhibitors.

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 2777 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 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 2777-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This 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 2777 protein.

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 2777 protein can be confirmed *in vivo*, *e.g.*, in an animal such as an animal model for aplastic anemia, sickle cell anemia, thalessemia or sideroblastic anemia. Examples of animals that can be used include, for example, the C57 mouse model for testing whether a compound has *in vivo* activity in stimulating erythropoiesis as described in U.S. Patent No. 6,231,880 (also describes cell proliferation stimulation induced by hematopoietic growth factors in baboons); the transgenic mouse model for bone marrow transplantation for sickle cell

anemia as described in Iannone, R. *et al.*, (2001) *Blood* 97(12):3960-3965; the rat model for Aplastic Anemia as described in Santiago, S. *et al.* (2001) *Transplant Proc.* 33(4):2600-2602; transgenic animal models to screen for fetal hemoglobin-stimulating compounds as described in Fibach, E. (2001) *Semin Hematol* 38(4):374-381; mouse models for the treatment of autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation as described in Ikehara, S. (2001) *Experimental Hematology* 29:661-669 (specifically, mice with thrombocytic purpura, thrombocytopenia, renal failure, hemolytic anemia, systemic lupus erythematosus, hemolytic anemia, sjogren syndrome, rheumatoid arthritis, pancreatitis, sialoadentis, autoimmune hepatitis, myocardial infarcton, insulin-dependent diabetes mellitus, non-insulin-dependent diabetes mellitus and fogal segmental glomerular sclerosis are described); the three mouse models with globin gene mutations resulting in human thalessemia as described in Martinell, J., *et al.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(8):5056-5060; animal models for X-linked Sideroblastic Anemia as described in Yamamoto, M. *et al.*, (2000) *Intl. J. Hematology Review* 72:157-164; the mouse model for anemic yolk sacs as described in Martin, J.S., *et al.* (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 752:300-8; various animal models for sickle cell anemia as described in Nagel. R.L. (2001) *Brit J. Hematol.* 112:19-25 (specifically, models with a combination of murine globins and human globin chains, the NYC1 model , the S+S Antilles model, and transgenic models with exclusively human globin chains are described); and animal models of cyclic hematopoiesis as described in Jones, J.B. & Lange, R.D. (1983) *Exp. Hematol.* 11(7):571-580. Additionally, transgenic animals for the Human Beta Globin Gene Locus as described in U.S. Pat. No. 6,231, 880 may be used.

Moreover, a 2777 modulator identified as described herein (*e.g.*, an antisense 2777 nucleic acid molecule, a 2777-specific antibody, or a small molecule) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such a modulator. Alternatively, a 2777 modulator identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of action of such a modulator.

II. Predictive Medicine:

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 2777 protein and/or nucleic acid expression as well as 2777 activity, in the context of a biological

sample (*e.g.*, blood) to thereby determine whether an individual is afflicted with a hematological disorder. The invention also provides for prognostic (or predictive) assays for determining whether an individual is at risk of developing a hematological disorder. For example, mutations in a 2777 gene can be assayed for in a biological sample. Such assays can be used for prognostic or predictive purpose to thereby phophylactically treat an individual prior to the onset of a hematological disorder.

Another aspect of the invention pertains to monitoring the influence of 2777 modulators (*e.g.*, anti-2777 antibodies or 2777 ribozymes) on the expression or activity of 2777 in clinical trials.

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

A. Diagnostic Assays For Hematological Disorders

To determine whether a subject is afflicted with a hematological disorder, 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 2777 protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA or genomic DNA) that encodes a 2777 protein, in the biological sample. A preferred agent for detecting 2777 mRNA or genomic DNA is a labeled nucleic acid probe capable of hybridizing to 2777 mRNA or genomic DNA. The nucleic acid probe can be, for example, the 2777 nucleic acid set forth in SEQ ID NO:1, 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 stringent conditions to 2777 mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the diagnostic assays of the invention are described herein.

A preferred agent for detecting 2777 protein in a sample is an antibody capable of binding to 2777 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 2777 mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of 2777 mRNA include Northern hybridizations and *in situ* hybridizations. *In vitro* techniques for detection of 2777 protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations and immunofluorescence. *In vitro* techniques for detection of 2777 genomic DNA include Southern hybridizations. Furthermore, *in vivo* techniques for detection of 2777 protein include introducing into a subject a labeled anti-2777 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 2777 protein, mRNA, or genomic DNA, such that the presence of 2777 protein, mRNA or genomic DNA is detected in the biological sample, and comparing the presence of 2777 protein, mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of 2777 protein, mRNA or genomic DNA in the test sample.

B. Prognostic Assays For Hematological Disorders

The present invention further pertains to methods for identifying subjects having or at risk of developing a hematological disorder associated with aberrant 2777 expression or activity.

As used herein, the term "aberrant" includes a 2777 expression or activity which deviates from the wild type 2777 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, aberrant 2777 expression or activity is intended to include the cases in which a mutation in the 2777 gene causes the 2777 gene to be under-expressed or over-expressed and situations in which such mutations result in a non-functional 2777 protein or a protein which does not function in a wild-type fashion, *e.g.*, a protein which does not interact with a 2777 substrate, or one which interacts with a non-2777 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 hematological disorder, *e.g.*, aplastic anemia, Sickle Cell Anemia, polycythemia or leukemia. A biological sample may be obtained from a subject and tested for the presence or 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 2777 gene, 2) an addition of one or more nucleotides to a 2777 gene, 3) a substitution of one or more nucleotides of a 2777 gene, 4) a chromosomal rearrangement of a 2777 gene, 5) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of a 2777 gene, 6) aberrant modification of a 2777 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 2777 gene, 8) a non-wild type level of a 2777-protein, 9) allelic loss of a 2777 gene, and 10) inappropriate post-translational modification of a 2777-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 2777 gene. For example, a genetic alteration in a 2777 gene may be detected 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 can be particularly useful for detecting point mutations in a 2777 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 more primers which specifically hybridize to a 2777 gene under conditions such that hybridization and amplification of the 2777 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 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 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 2777 gene 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 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 2777 can be identified by hybridizing biological sample derived and control nucleic acids, *e.g.*, DNA or 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 2777 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 2777 gene in a biological sample and detect mutations by comparing the sequence of the 2777 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 2777 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 2777 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 base pair 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 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. 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 in 2777 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 on a 2777 sequence, *e.g.*, a wild-type 2777 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.

In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility will be used to identify mutations in 2777 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) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Single-stranded DNA fragments of sample and control 2777 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 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).

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 2777 modulator (*e.g.*, an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, or small molecule) to effectively treat a hematological disorder.

C. Monitoring of Effects During Clinical Trials

The present invention further provides methods for determining the effectiveness of a 2777 modulator (*e.g.*, a 2777 modulator identified herein) in treating a hematological disorder in a subject. For example, the effectiveness of a 2777 modulator in increasing 2777 gene expression, protein levels, or in upregulating 2777 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased 2777 gene expression, protein levels, or downregulated 2777 activity. Alternatively, the effectiveness of a 2777 modulator in decreasing 2777 gene expression, protein levels, or in downregulating 2777 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased 2777 gene expression, protein levels, or 2777 activity. In such clinical trials, the expression or activity of a 2777 gene, and preferably, other genes that have been implicated in, for example, a hematological disorder can be used as a "read out" or marker of the phenotype of a particular cell.

For example, and not by way of limitation, genes, including 2777, that are modulated in cells by treatment with an agent which modulates 2777 activity (*e.g.*, identified in a screening assay as described herein) can be identified. Thus, to study the effect of agents which modulate 2777 activity on subjects suffering from a hematological disorder in, for example, a clinical trial, cells can be isolated and RNA prepared and analyzed for the levels of expression of 2777 and other genes implicated in the hematological 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 2777 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 2777 activity. This response state may be determined before, and at various points during treatment of the individual with the agent which modulates 2777 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 2777 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 2777 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 2777 protein, mRNA, or genomic DNA in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the 2777 protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample with the 2777 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 2777 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 2777 to lower levels than detected, *i.e.* to decrease the effectiveness of the agent. According to such an embodiment, 2777 expression or activity may be used as an indicator of the effectiveness of an agent, even in the absence of an observable phenotypic response.

III. Methods of Treatment of Subjects Suffering From Hematological Disorders:

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 hematological disorder such as aplastic anemia, Sickle Cell Anemia, polycythemia or leukemia. 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").

Thus, another aspect of the invention provides methods for tailoring an subject's prophylactic or therapeutic treatment with either the 2777 molecules of the present invention or 2777 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 hematological disorder by administering to the subject an agent which modulates 2777 expression or 2777 activity, *e.g.*, modulation of hematopoietic cell proliferation of hematopoietic cells. Subjects at risk for a hematological disorder 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 2777 expression or activity, such that a hematological disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of 2777 aberrancy, for example, a 2777, 2777 agonist or 2777 antagonist agent can be used for treating the subject. The appropriate agent can be determined based on screening assays described herein.

B. Therapeutic Methods

Another aspect of the invention pertains to methods for treating a subject suffering from a hematological disorder. These methods involve administering to a subject an agent which modulates 2777 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 2777 protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced, aberrant, or unwanted 2777 expression or activity.

Stimulation of 2777 activity is desirable in situations in which 2777 is abnormally downregulated and/or in which increased 2777 activity is likely to have a beneficial effect, *e.g.*, a decrease in the proliferation of hematopoietic cells, thereby ameliorating hematological disorders such as polycytemia or infectious mononucleosis in a subject. Likewise, inhibition of 2777 activity is desirable in situations in which 2777 is abnormally

upregulated and/or in which decreased 2777 activity is likely to have a beneficial effect, *e.g.*, an increase in hematopoietic cell proliferation, thereby ameliorating a hematological disorder such as aplastic anemia or hemorrhagic anemia in a subject.

1. Pharmaceutical Compositions

The agents which modulate 2777 activity can be 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 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.

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 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 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 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 polyetheylene 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 2777 activity (*e.g.*, a fragment of a 2777 protein or an anti-2777 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 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 2777 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 2777 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 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 directly dependent on the unique characteristics of the agent that modulates 2777 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 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 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 2777 modulating agents lies preferably within a range of circulating 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 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.*, 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 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.

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 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 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 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 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 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. 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), cyclothosphamide, 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"), granulocyte macrophase 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.*, Arnon *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.

2. Transplantation and Transfusions

The present invention provides methods for increasing hematopoietic cells in patients, particularly patients undergoing radiation therapy and/or chemotherapy, *e.g.*, in the treatment of cancer. Such therapies kill dividing progenitor cells in the marrow and peripheral blood, limiting therapy and often requiring transfusions to restore circulating levels of platelets and other blood cells. Of particular interest are those patients receiving bone marrow and/or peripheral blood stem cell transplants following radiation therapy and patients suffering from congenital metabolic defects necessitating bone marrow transplant. Among these indications are bone marrow transplants associated with the treatment of breast cancer, leukemia, lymphoma, multiple myeloma, and congenital defects such as severe combined immune deficiency, thallasemia, and sickle cell anemia. Peripheral blood

stem cell transplantation may be preferred in conditions where a risk of tumor cells in the blood is not present.

As used herein, the term "transplantation" includes the process of removing cells from a donor subject and subsequently administering the cells to a recipient subject. The term encompasses both allogeneic transplantation, wherein the donor and recipient are different subjects of the same species; and autologous transplantation, wherein the donor and recipient are the same subject.

Methods for carrying out bone marrow and peripheral blood stem cell transplants are known in the art. (Snyder *et al.*, "Transfusion Medicine" in Benz and McArthur, eds., *Hematology* 1994, American Society of Hematology, 96-106, 1994.) For example, peripheral blood stem cells are collected by leukapheresis according to accepted clinical procedures. Hematopoietic progenitor cells can be selected on the basis of cell surface markers (*e.g.* CD34), allowing for enrichment of the desired cells and depletion of contaminating tumor cells. The collected cells are stored frozen in a suitable cryoprotectant (*e.g.* dimethyl sulfoxide, hydroxyethyl starch) until needed. Marrow cells are collected from donors by bone puncture under anesthesia. To reduce the volume, the collected marrow is usually processed to separate plasma from the cellular components. Removal of plasma can also eliminate red cell incompatibilities in allogeneic transplantation. The cell fraction can be enriched for mononuclear cells using density gradient techniques or automated separation methods and depleted of T cells using various cytotoxic agents. Collected marrow cells are cryopreserved according to established procedures that include controlled-rate freezing and the use of cryoprotectants. Stem cells are thawed in a warm water bath immediately prior to use to minimize loss associated with thawing. In the case of allogeneic transplants, donors and recipients are tissue matched to minimize the risk of graft-versus-host disease.

An increase in hematopoietic cells results from transplantation into a recipient patient of stem cells, particularly cells of the myeloid lineage, including CD34+ stem cells and cells derived from CD34+ stem cells. Of particular interest are cells in the megakaryocyte and erythrocyte lineages, which reconstitute the recipient's platelet and erythrocyte populations, respectively.

In one aspect of the invention, a donor is treated, prior to donation of marrow or peripheral blood cells, with a compound that inhibits 2777, in an amount sufficient to stimulate proliferation of hematopoietic cells and/or in an amount sufficient to inhibit apoptosis of hematopoietic cells. Treatment of the donor will be carried out for a period of

from one to several days, preferably about 2-5 days, during a period of from 3 days to 2 weeks prior to harvesting of bone marrow or peripheral blood stem cells. It is preferred to treat the donor during a period of five to ten days prior to harvesting of cells. The increase in CD34+ stem cells and other cells of the myeloid lineage in the donor will be manifested by improved recovery of hematopoietic cells in the transplant recipient. In another aspect of the invention, the recipient is treated with a compound that inhibits 2777 after transplantation to further enhance hematopoietic cell recovery.

Another aspect of the invention features a method for increasing the number of hematopoietic cells in a subject, for example, a subject undergoing radiation therapy and/or chemotherapy, *e.g.*, for the treatment of cancer. The method includes the process of removing cells from a donor and subsequently administering the cells to a recipient. In one aspect of the invention, a donor is treated, prior to donation of marrow or peripheral blood cells, with a compound that inhibits 2777, in an amount sufficient to stimulate proliferation of hematopoietic cells and/or in an amount sufficient to inhibit apoptosis of hematopoietic cells. In another aspect of the invention, the recipient is treated with a compound that inhibits 2777 after transplantation to further enhance hematopoietic cell recovery.

In another aspect, the invention provides methods for increasing hematopoietic progenitor and committed erythroid cells in a recipient subject in need of such an increase. The methods include administering to a donor subject an amount of 2777 sufficient to inhibit induction of apoptosis and prevent inhibition of cell proliferation of hematopoietic cells in the donor; collecting cells from the donor, wherein the cells are bone marrow cells or peripheral blood stem cells; and administering the bone marrow cells or peripheral blood stem cells to a recipient subject. The donor and recipient may be different or the same subject. In one embodiment of the invention, the recipient subject has been treated with chemotherapy or radiation therapy.

In another aspect, the invention provides methods of preparing cells for transplantation comprising administering to a donor subject an amount of 2777 or a 2777 modulator sufficient to inhibit induction of apoptosis and prevent inhibition of cell proliferation of hematopoietic cells in the donor subject, and collecting cells from the donor subject, *e.g.*, bone marrow cells or peripheral blood stem cells.

In another aspect, the invention provides a method of stimulating platelet recovery or erythrocyte recovery in a subject receiving chemotherapy or radiation therapy. The method includes administering to the subject an amount of 2777 or a 2777 modulator

sufficient to stimulate proliferation of cells of the myeloid lineage in the subject; collecting bone marrow cells or peripheral blood stem cells from the subject prior to chemotherapy or radiation therapy; and returning the collected cells to the subject subsequent to chemotherapy or radiation therapy. Within one embodiment this method further includes administering to the subject, after or concurrently with returning the collected cells, an amount of 2777 or a 2777 modulator sufficient to enhance platelet recovery or erythrocyte recovery.

C. 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 pharmacogenomics studies in determining whether to administer an agent which modulates 2777 activity, as well as tailoring the dosage and/or therapeutic regimen of treatment with an agent which modulates 2777 activity.

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 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 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 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 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 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.

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 2777 protein 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 2777 molecule or 2777 modulator 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 hematological disorder with an agent which modulates 2777 activity.

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

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 2777 protein (or a portion thereof). As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to 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 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 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 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, 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 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.*, 2777 proteins, mutant forms of 2777 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 2777 proteins in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, 2777 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 E binding protein, or protein A, respectively, to the target recombinant protein.

Purified fusion proteins can be utilized in 2777 activity assays, (*e.g.*, direct assays or competitive assays described in detail below), or to generate antibodies specific for 2777 proteins. In a preferred embodiment, a 2777 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 2777 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.*, 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 2777 nucleic acid molecule of the invention is introduced, *e.g.*, a 2777 nucleic acid molecule within a recombinant expression vector or a 2777 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 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 2777 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 "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, DEAE-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 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 2777 protein.

Accordingly, the invention further provides methods for producing a 2777 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 2777 protein has been introduced) in a suitable medium such that a 2777 protein is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating a 2777 protein from the medium or the host cell.

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

The coding sequence of the isolated human 2777 cDNA and the predicted amino acid sequence of the human 2777 polypeptide are shown in SEQ ID NOs:1 and 2, respectively. The amino acid sequence of the isolated human 2777 polypeptide can also be found at GenBank Accession No. P52888.

The methods of the invention include the use of isolated nucleic acid molecules that encode 2777 proteins or biologically active portions thereof, as well as nucleic acid fragments sufficient for use as hybridization probes to identify 2777-encoding nucleic acid molecules (*e.g.*, 2777 mRNA) and fragments for use as PCR primers for the amplification or mutation of 2777 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.

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, 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 as a hybridization probe, 2777 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 NO:1 can be isolated by the polymerase chain reaction (PCR) using synthetic oligonucleotide primers designed based upon the sequence of SEQ ID NO:1.

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

primers according to standard PCR amplification techniques. Furthermore, oligonucleotides corresponding to 2777 nucleotide sequences can be prepared by standard synthetic techniques, *e.g.*, using an automated DNA synthesizer.

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, a complement of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, or a portion of any of these nucleotide sequences. A nucleic acid molecule which is complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, is one which is sufficiently complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 such that it can hybridize to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 thereby forming a stable duplex.

In still another preferred embodiment, an isolated nucleic acid molecule used in the 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 or a portion of any of this nucleotide sequence.

Moreover, the nucleic acid molecules used in the methods of the invention can comprise only a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1, for example, a fragment which can be used as a probe or primer or a fragment encoding a portion of a 2777 protein, *e.g.*, a biologically active portion of a 2777 protein. The probe/primer typically comprises substantially purified oligonucleotide. The oligonucleotide typically comprises a region of 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 of an anti-sense sequence of SEQ ID NO:1 or of a naturally occurring allelic variant or mutant of SEQ ID NO:1. In one embodiment, a nucleic acid molecule 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, or more nucleotides in length and hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1.

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 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 NaH_2PO_4, 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, $T_m(°C) = 2(\#\text{ of A + T bases}) + 4(\#\text{ of G + C bases})$. For hybrids between 18 and 49 base pairs in length, $T_m(°C) = 81.5 + 16.6(\log_{10}[Na^+]) + 0.41(\%G+C) - (600/N)$, 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 NaH_2PO_4, 7% SDS at about 65°C, followed by

one or more washes at 0.02M NaH_2PO_4, 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 2777 protein, such as by measuring a level of a 2777-encoding nucleic acid in a sample of cells from a subject *e.g.*, detecting 2777 mRNA levels or determining whether a genomic 2777 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 due to degeneracy of the genetic code and thus encode the same 2777 proteins as those encoded by the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1. 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:2.

The methods of the invention further include the use of allelic variants of human 2777, *e.g.*, fuctional and non-functional allelic variants. Functional allelic variants are naturally occurring amino acid sequence variants of the human 2777 protein that maintain a 2777 activity. Functional allelic variants will typically contain only conservative substitution of one or more amino acids of SEQ ID NO:2, 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 2777 protein that do not have a 2777 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:2, 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 2777 protein. Orthologues of the human 2777 protein are proteins that are isolated from non-human organisms and possess the same 2777 activity.

The methods of the present invention further include the use of nucleic acid molecules comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 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. A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of 2777 (*e.g.*, the sequence of SEQ ID NO:2) 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 2777 proteins of the present invention and other members of the CIDE family (*e.g.*, CIDE-B, FSP-27, and DFF45) are not likely to be amenable to alteration.

Mutations can be introduced into SEQ ID NO:1 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 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.*, 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 2777 protein is preferably replaced with another amino acid residue from the same side chain family. Alternatively, in another embodiment, mutations can be introduced randomly along all or part of a 2777 coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for 2777 biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis of SEQ ID NO:1 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. 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 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 2777 coding strand, or to only a portion thereof. In one embodiment, an antisense nucleic acid molecule is antisense to a "coding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding a 2777. 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 2777. 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 2777 disclosed herein, antisense nucleic acids of the invention can be designed according to the rules of Watson and Crick base pairing. The antisense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of 2777 mRNA, but more preferably is an oligonucleotide which is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of 2777 mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of 2777 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 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, 5-iodouracil, hypoxanthine, xantine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxylmethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine. Alternatively, the antisense nucleic acid can be produced biologically using an expression vector into which a nucleic acid has been subcloned in an antisense orientation (*i.e.*, RNA transcribed from the

inserted nucleic acid will be of an antisense orientation to a target nucleic acid of interest, described further in the following subsection).

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 2777 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, the 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 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 2777 mRNA transcripts to thereby inhibit translation of 2777 mRNA. A ribozyme having specificity for a 2777-encoding nucleic acid can be designed based

upon the nucleotide sequence of a 2777 cDNA disclosed herein (*i.e.*, SEQ ID NO:1). 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 2777-encoding mRNA. See, *e.g.*, Cech *et al.* U.S. Patent No. 4,987,071; and Cech *et al.* U.S. Patent No. 5,116,742. Alternatively, 2777 mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, *e.g.*, Bartel, D. and Szostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418.

Alternatively, 2777 gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the 2777 (*e.g.*, the 2777 promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the 2777 gene in target cells. See generally, 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) *Bioassays* 14(12):807-15.

In yet another embodiment, the 2777 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.

PNAs of 2777 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 2777 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*).

In another embodiment, PNAs of 2777 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 2777 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 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-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 (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 end, the oligonucleotide may be conjugated to another molecule, (*e.g.*, a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, or hybridization-triggered cleavage agent).

VI. Isolated 2777 Proteins and Anti-2777 Antibodies Used in the Methods of the Invention

The methods of the invention include the use of isolated 2777 proteins, and biologically active portions thereof, as well as polypeptide fragments suitable for use as immunogens to raise anti-2777 antibodies. In one embodiment, native 2777 proteins can be isolated from cells or tissue sources by an appropriate purification scheme using standard protein purification techniques. In another embodiment, 2777 proteins are produced by recombinant DNA techniques. Alternative to recombinant expression, a 2777 protein or polypeptide can be synthesized chemically using standard peptide synthesis techniques.

As used herein, a "biologically active portion" of a 2777 protein includes a fragment of a 2777 protein having a 2777 activity. Biologically active portions of a 2777 protein include peptides comprising amino acid sequences sufficiently identical to or derived from the amino acid sequence of the 2777 protein, *e.g.*, the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, which include fewer amino acids than the full length 2777 proteins, and exhibit at least one activity of a 2777 protein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the 2777 protein (*e.g.*, the N-terminal region of the 2777 protein that is believed to be involved in the regulation of apoptotic activity). A biologically active portion of a 2777 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 2777 protein can be used as targets for developing agents which modulate a 2777 activity.

In a preferred embodiment, the 2777 protein used in the methods of the invention has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2. In other embodiments, the 2777 protein is substantially identical to SEQ ID NO:2, and retains the functional activity of the protein of SEQ ID NO:2, 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 2777 protein used in the methods of 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:2.

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 2777 amino acid sequence of SEQ ID NO:2 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 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.

The methods of the invention may also use 2777 chimeric or fusion proteins. As used herein, a 2777 "chimeric protein" or "fusion protein" comprises a 2777 polypeptide operatively linked to a non-2777 polypeptide. An "2777 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a 2777 molecule, whereas a

"non-2777 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein which is not substantially homologous to the 2777 protein, *e.g.*, a protein which is different from the 2777 protein and which is derived from the same or a different organism. Within a 2777 fusion protein the 2777 polypeptide can correspond to all or a portion of a 2777 protein. In a preferred embodiment, a 2777 fusion protein comprises at least one biologically active portion of a 2777 protein. In another preferred embodiment, a 2777 fusion protein comprises at least two biologically active portions of a 2777 protein. Within the fusion protein, the term "operatively linked" is intended to indicate that the 2777 polypeptide and the non-2777 polypeptide are fused in-frame to each other. The non-2777 polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the 2777 polypeptide.

For example, in one embodiment, the fusion protein is a GST-2777 fusion protein in which the 2777 sequences are fused to the C-terminus of the GST sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of recombinant 2777.

In another embodiment, this fusion protein is a 2777 protein containing a heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (*e.g.*, mammalian host cells), expression and/or secretion of 2777 can be increased through use of a heterologous signal sequence.

The 2777 fusion proteins used in the methods of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject *in vivo*. The 2777 fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a 2777 substrate. Use of 2777 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 2777 protein; (ii) mis-regulation of the 2777 gene; and (iii) aberrant post-translational modification of a 2777 protein.

Moreover, the 2777-fusion proteins used in the methods of the invention can be used as immunogens to produce anti-2777 antibodies in a subject, to purify 2777 ligands and in screening assays to identify molecules which inhibit the interaction of 2777 with a 2777 substrate.

Preferably, a 2777 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 2777-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the 2777 protein.

The present invention also pertains to the use of variants of the 2777 proteins which function as either 2777 agonists (mimetics) or as 2777 antagonists. Variants of the 2777 proteins can be generated by mutagenesis, *e.g.*, discrete point mutation or truncation of a 2777 protein. An agonist of the 2777 proteins can retain substantially the same, or a subset, of the biological activities of the naturally occurring form of a 2777 protein. An antagonist of a 2777 protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the 2777 protein by, for example, competitively modulating a 2777-mediated activity of a 2777 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 2777 protein.

In one embodiment, variants of a 2777 protein which function as either 2777 agonists (mimetics) or as 2777 antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, *e.g.*, truncation mutants, of a 2777 protein for 2777 protein agonist or antagonist activity. In one embodiment, a variegated library of 2777 variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A variegated library of 2777 variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential 2777 sequences is expressible as individual polypeptides, or alternatively, as a set of larger fusion proteins (*e.g.*, for phage display) containing the set of 2777 sequences therein. There are a variety of methods which can be used to produce libraries of potential 2777 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 2777 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) *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 2777 protein coding sequence can be used to generate a variegated population of 2777 fragments for screening and subsequent selection of variants of a 2777 protein. In one embodiment, a library of coding sequence fragments can be generated by treating a double stranded PCR fragment of a 2777 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 2777 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 2777 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 2777 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-2777 antibodies. An isolated 2777 protein, or a portion or fragment thereof, can be used as an immunogen to generate antibodies that bind 2777 using standard techniques for polyclonal

and monoclonal antibody preparation. A full-length 2777 protein can be used or, alternatively, antigenic peptide fragments of 2777 can be used as immunogens. The antigenic peptide of 2777 comprises at least 8 amino acid residues of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 and encompasses an epitope of 2777 such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with the 2777 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 2777 that are located on the surface of the protein, *e.g.*, hydrophilic regions, as well as regions with high antigenicity.

A 2777 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, recombinantly expressed 2777 protein or a chemically synthesized 2777 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 2777 preparation induces a polyclonal anti-2777 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 2777. Examples of immunologically active portions of 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 2777 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 capable of immunoreacting with a particular epitope of 2777. A monoclonal antibody composition thus typically displays a single binding affinity for a particular 2777 protein with which it immunoreacts.

Polyclonal anti-2777 antibodies can be prepared as described above by immunizing a suitable subject with a 2777 immunogen. The anti-2777 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 2777. If desired, the antibody molecules directed against 2777 can be 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-2777 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 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.* (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.* 3:231-36). Briefly, an immortal cell line (typically a myeloma) is fused to lymphocytes (typically splenocytes) from a mammal immunized with a 2777 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 2777.

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-2777 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 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 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 2777, *e.g.*, using a standard ELISA assay.

Alternative to preparing monoclonal antibody-secreting hybridomas, a monoclonal anti-2777 antibody can be identified and isolated by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library (*e.g.*, an antibody phage display library) with 2777 to thereby isolate immunoglobulin library members that bind 2777. 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) *Bio/Technology* 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) *Bio/Technology* 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-2777 antibodies, such as chimeric and humanized monoclonal antibodies, comprising both human and non-human 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. 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* 84:3439-3443; 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* 239:1534; and Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

An anti-2777 antibody can be used to detect 2777 protein (*e.g.*, in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the 2777 protein. Anti-2777 antibodies can be used diagnostically to 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 suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, □-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 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 ^{3}H.

VII. Electronic Apparatus Readable Media and Arrays

Electronic apparatus readable media comprising a 2777 modulator of the present invention is also provided. As used herein, "electronic apparatus readable media" refers to any suitable medium for storing, holding or containing data or information that can be read and accessed directly by an electronic apparatus. Such media can include, but are not limited to: magnetic storage media, such as floppy discs, hard disc storage medium, and magnetic tape; optical storage media such as compact disc; electronic storage media such as RAM, ROM, EPROM, EEPROM and the like; general hard disks and hybrids of these

categories such as magnetic/optical storage media. The medium is adapted or configured for having recorded thereon a marker of the present invention.

As used herein, the term "electronic apparatus" is intended to include any suitable computing or processing apparatus or other device configured or adapted for storing data or information. Examples of electronic apparatus suitable for use with the present invention include stand-alone computing apparatus; networks, including a local area network (LAN), a wide area network (WAN) Internet, Intranet, and Extranet; electronic appliances such as a personal digital assistants (PDAs), cellular phone, pager and the like; and local and distributed processing systems.

As used herein, "recorded" refers to a process for storing or encoding information on the electronic apparatus readable medium. Those skilled in the art can readily adopt any of the presently known methods for recording information on known media to generate manufactures comprising the 2777 modulators of the present invention.

A variety of software programs and formats can be used to store the marker information of the present invention on the electronic apparatus readable medium. For example, the nucleic acid sequence corresponding to the 2777 modulators can be represented in a word processing text file, formatted in commercially-available software such as WordPerfect and MicroSoft Word, or represented in the form of an ASCII file, stored in a database application, such as DB2, Sybase, Oracle, or the like, as well as in other forms. Any number of dataprocessor structuring formats (*e.g.*, text file or database) may be employed in order to obtain or create a medium having recorded thereon the 2777 modulators of the present invention.

By providing the 2777 modulators of the invention in readable form, one can routinely access the marker sequence information for a variety of purposes. For example, one skilled in the art can use the nucleotide or amino acid sequences of the present invention in readable form to compare a target sequence or target structural motif with the sequence information stored within the data storage means. Search means are used to identify fragments or regions of the sequences of the invention which match a particular target sequence or target motif.

The present invention therefore provides a medium for holding instructions for performing a method for determining whether a subject has a hematological disorder or a pre-disposition to a hematological disroder, wherein the method comprises the steps of determining the presence or absence of a 2777 modulator and based on the presence or absence of the 2777 modulator, determining whether the subject has a hematological

disorder or a pre-disposition to a hematological disorder and/or recommending a particular treatment for the hematological disorder or pre-hematological disorder condition.

The present invention further provides in an electronic system and/or in a network, a method for determining whether a subject has a hematological disorder or a pre-disposition to a hematological disorder associated with a 2777 modulator wherein the method comprises the steps of determining the presence or absence of the 2777 modulator, and based on the presence or absence of the 2777 modulator, determining whether the subject has a hematological disorder or a pre-disposition to a hematological disorder, and/or recommending a particular treatment for the hematological disorder or pre-hematological disorder condition. The method may further comprise the step of receiving phenotypic information associated with the subject and/or acquiring from a network phenotypic information associated with the subject.

The present invention also provides in a network, a method for determining whether a subject has a hematological disorder or a pre-disposition to a hematological disorder associated with a 2777 modulator, said method comprising the steps of receiving information associated with the 2777 modulator receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the network corresponding to the 2777 modulator and/or hematological disorder, and based on one or more of the phenotypic information, the 2777 modulator, and the acquired information, determining whether the subject has a hematological disorder or a pre-disposition to a hematological disorder. The method may further comprise the step of recommending a particular treatment for the hematological disorder or pre- hematological disorder condition.

The present invention also provides a business method for determining whether a subject has a hematological disorder or a pre-disposition to a hematological disorder, said method comprising the steps of receiving information associated with the 2777 modulator, receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the network corresponding to the 2777 modulator and/or hematological disorder, and based on one or more of the phenotypic information, the 2777 modulator, and the acquired information, determining whether the subject has a hematological disorder or a pre-disposition to a hematological disorder. The method may further comprise the step of recommending a particular treatment for the hematological disorder or pre-hematological disorder condition.

The invention also includes an array comprising a 2777 modulator of the present invention. The array can be used to assay expression of one or more genes in the array. In

one embodiment, the array can be used to assay gene expression in a tissue to ascertain tissue specificity of genes in the array. In this manner, up to about 7600 genes can be simultaneously assayed for expression. This allows a profile to be developed showing a battery of genes specifically expressed in one or more tissues.

In addition to such qualitative determination, the invention allows the quantitation of gene expression. Thus, not only tissue specificity, but also the level of expression of a battery of genes in the tissue is ascertainable. Thus, genes can be grouped on the basis of their tissue expression *per se* and level of expression in that tissue. This is useful, for example, in ascertaining the relationship of gene expression between or among tissues. Thus, one tissue can be perturbed and the effect on gene expression in a second tissue can be determined. In this context, the effect of one cell type on another cell type in response to a biological stimulus can be determined. Such a determination is useful, for example, to know the effect of cell-cell interaction at the level of gene expression. If an agent is administered therapeutically to treat one cell type but has an undesirable effect on another cell type, the invention provides an assay to determine the molecular basis of the undesirable effect and thus provides the opportunity to co-administer a counteracting agent or otherwise treat the undesired effect. Similarly, even within a single cell type, undesirable biological effects can be determined at the molecular level. Thus, the effects of an agent on expression of other than the target gene can be ascertained and counteracted.

In another embodiment, the array can be used to monitor the time course of expression of one or more genes in the array. This can occur in various biological contexts, as disclosed herein, for example development of hematological disorder, progression of hematological disorder, and processes, such a cellular transformation associated with hematological disorder.

The array is also useful for ascertaining the effect of the expression of a gene on the expression of other genes in the same cell or in different cells. This provides, for example, for a selection of alternate molecular targets for therapeutic intervention if the ultimate or downstream target cannot be regulated.

The array is also useful for ascertaining differential expression patterns of one or more genes in normal and abnormal cells. This provides a battery of genes that could serve as a molecular target for diagnosis or therapeutic intervention.

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

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

EXAMPLES

EXAMPLE 1: IDENTIFICATION OF 2777 AS A MODULATOR OF HEMATOLOGICAL DISORDERS

This example describes the distribution of 2777 in normal tissue derived from a variety of organs and, in particular, hematopoietic cells during various points of cell differentiation.

Materials and Methods

For analysis of human and murine 2777 expression in hematopoietic cells and tissue, the following methods were used:

Tissues were collected from 7 week old female C57/Bl6J mice. Total 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 detectable PCR amplification of the control RNA gene confirming efficient removal of genomic DNA contamination. 2777 expression was measured by TaqMan® quantitative PCR analysis, performed according to the manufacturer's directions (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA).

The samples included the following normal cells and tissues: heart, brain, lung, liver, fetal liver, spleen, kidney, CD3 (T cells), CD4, CD8, CD14, bone marrow, CD34, cord blodd, GPA-hi, GPA-lo, pooled neutorphils, pooled megakaryocytes, K562 (leukemia cells), stromal, Human Endothelial Cells ("HUVEC"), HCAEC (human coronary artery endothelial cells), skeletal muscle, small intestine, pancreas, sinal cord, breast, ovary, prostate, erythroid, macrophages and lymph node (see Figure 1).

PCR probes were designed by PrimerExpress software (PE Biosystems) based on the sequence of human 2777 (SEQ ID NO:1).

To standardize the results between different tissues, two probes, distinguished by different fluorescent labels, were added to each sample. The differential labeling of the probe for the 2777 gene and the probe for control RNA as an internal control thus enabled their simultaneous measurement in the same well. Forward and reverse primers and the

probes for both control RNA and human 2777 were added to the TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems). Although the final concentration of primer and probe could vary, each was internally consistent within a given experiment. A typical experiment contained 200 nM of forward and reverse primers, plus 100 nM of the probe for the control RNA, and 4500 nM of each of the forward and reverse primers, plus 150 nM of the probe for murine 2777-2. TaqMan matrix experiments were carried out using an ABI PRISM 770 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems). The thermal cycler conditions were as follows: hold for 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, followed by two-step PCR for 40 cycles of 95°C for 15 seconds, followed by 60°C for 1 minute.

The following method was used to quantitatively calculate 2777 gene expression in the tissue samples, relative to the control RNA expression in the same tissue. The threshold values at which the PCR amplification started were determined using the manufacturer's software. PCR cycle number at threshold value was designated as CT. Relative expression was calculated as:

$$2^{-((CTtest-CT18S)tissue\ of\ interest - (CTtest-CT18S)lowest\ expressing\ tissue\ in\ panel)}$$

Samples were run in duplicate and the averages of 2 relative expression determinations are shown. All probes were tested on serial dilutions of RNA from a tissue with high expression levels and only probes which gave relative expression levels that were linear to the amount of template cDNA with a slope similar to the slope for the internal control 18S were used.

For Northern Blotting, human mRNA blots (Clontech) were probed with a 520 nucleotide SacI fragment containing 420 nucleotides of the 5' coding sequence and 100 nucleotides of the 5' UTR of human 2777. Probes were labeled with ^{32}P and hybridized using the Rapid-Hyb buffer (Amersham).

Results

The expression of 2777 was examined in various tissues and in hematopoietic cells both *in vitro* and *in vivo*. As shown in Figure 1, the results of the foregoing experiments indicate that 2777 is highly expressed in cells of the erythroid lineage both *in vivo* and *in vitro*. Specifically, erythroid cultures showed increasing levels of expression up to Day 6

of differentiation. 2777 was also highly expressed in BFU-E cells and in GPA-lo cells but expressed in low levels in GPA-hi cells *in vivo*. In organ recitals, 2777 was expressed at high levels in brain, HUVEC cells and erythroid cells. To verify expression of 2777, Northern Blotting was performed using commercially available Clontech Blots.

The results described above demonstrate that 2777 is expressed in hematopoietic cells. Thus, 2777 may play an important role in modulating peptide hormones which stimulate erythropoiesis.

Equivalents

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.

What is claimed:

1. A method for identifying a compound capable of treating a hematologic disorder, comprising assaying the ability of the compound to modulate 2777 nucleic acid expression or 2777 polypeptide activity, thereby identifying a compound capable of treating a hematologic disorder.

2. A method for identifying a compound capable of modulating hematopoeisis comprising:

a) contacting a cell which expresses 2777 with a test compound; and

b) assaying the ability of the test compound to modulate the expression of a 2777 nucleic acid or the activity of a 2777 polypeptide, thereby identifying a compound capable of modulating hematopoeisis.

3. A method for modulating hematopoeisis in a cell comprising contacting a cell with a 2777 modulator, thereby modulating hematopoeisis in the cell.

4. The method of claim 2, wherein the cell is a hematopoeitic cell.

5. The method of claim 3, wherein the 2777 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.

6. The method of claim 3, wherein the 2777 modulator is capable of modulating 2777 polypeptide activity.

7. The method of claim 6, wherein the 2777 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.

8. The method of claim 6, wherein the 2777 modulator is capable of modulating 2777 nucleic acid expression.

9. A method for treating a subject having a hematologic disorder characterized by aberrant 2777 polypeptide activity or aberrant 2777 nucleic acid

expression comprising administering to the subject a 2777 modulator, thereby treating said subject having a hematologic disorder.

10. The method of claim 9, wherein said hematological disorder is selected from the group consisting of disorders resulting from bone marrow irradiation or chemotherapy treatments for cancer, Pernicious Anemia, Hemorrhagic Anemia, Hemolytic Anemia, Aplastic Anemia, Sickle Cell Anemia, Sideroblastic Anemia, Anemia associated with chronic infections such as Malaria, Trypanosomiasis, HIV, Hepatitis virus or other viruses, Myelophthisic Anemias caused by marrow deficiencies, renal failure resulting from Anemia, Anemia, Polycethemia, Infectious Mononucleosis (IM), Acute Non-Lymphocytic Leukemia (ANLL), Acute Myeloid Leukemia (AML), Acute Promyelocytic Leukemia (APL), Acute Myelomonocytic Leukemia (AMMoL), Polycethemia Vera, Lymphoma, Acute Lymphocytic Leukemia (ALL), Chronic Lymphocytic Leukemia, Wilm's Tumor, Ewing's Sarcoma, Retinoblastoma, Hemophilia, disorders associated with an increased risk of Thrombosis, Herpes, Thalessemia, antibody-mediated disorders such as transfusion reactions and Erythroblastosis, mechanical trauma to red blood cells such as micro-angiopathic hemolytic anemias, Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and disseminated intravascular coagulation, infections by parasites such as Plasmodium, chemical injuries from, *e.g.*, lead poisoning, and Hypersplenism.

11. The method of claim 9, wherein said 2777 modulator is administered in a pharmaceutically acceptable formulation.

12. The method of claim 9, wherein the 2777 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.

13. The method of claim 9, wherein the 2777 modulator is capable of modulating 2777 polypeptide activity.

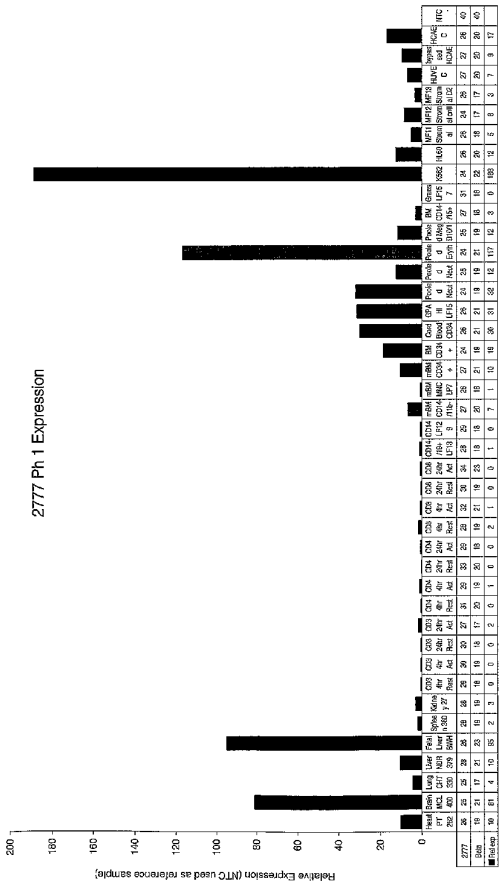

2777 Ph 1 Expression
Relative Expression (NTC used as reference sample)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
2777
Blots
Histogr.

FIGURE 1A

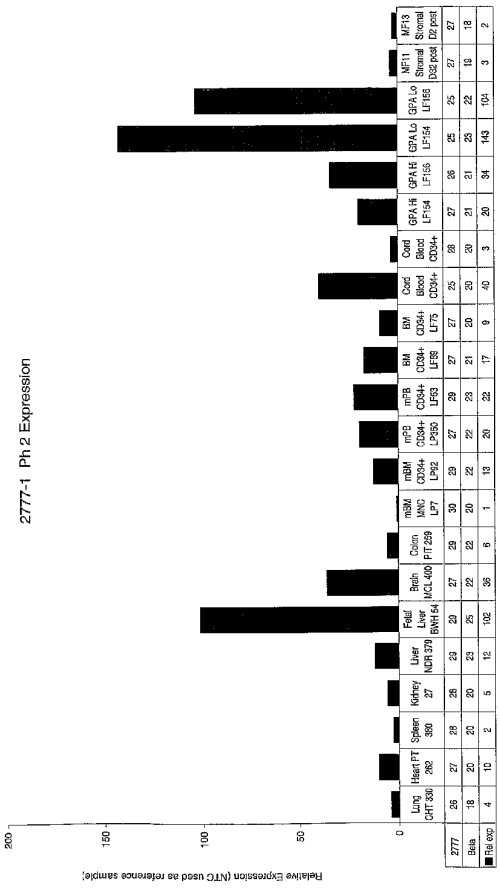

2777-1 Ph 2 Expression
Relative Expression (NTC used as reference sample)
200
150
100
50
0
2777
Beta
Fbl 6/00
Lung CHT 330
Heart PT 282
Spleen 360
Kidney 27
Liver NDR 379
Fetal Liver BWH 54
Retin MCL 400
Colon PIT 269
m3M MNC LP7
mBM CD34+ LP62
mPB CD34+ LP450
mPB CD34+ LP63
BM CD34+ LP58
BM CD34+ LP75
Cord Blood CD34+
Cord Blood CD34+
GPA Hi LP154
GPA Hi LP155
GPA Lo LP154
GPA Lo LP155
MF11 Stromal D32 post
MF13 Stromal D2 post

FIGURE 1B

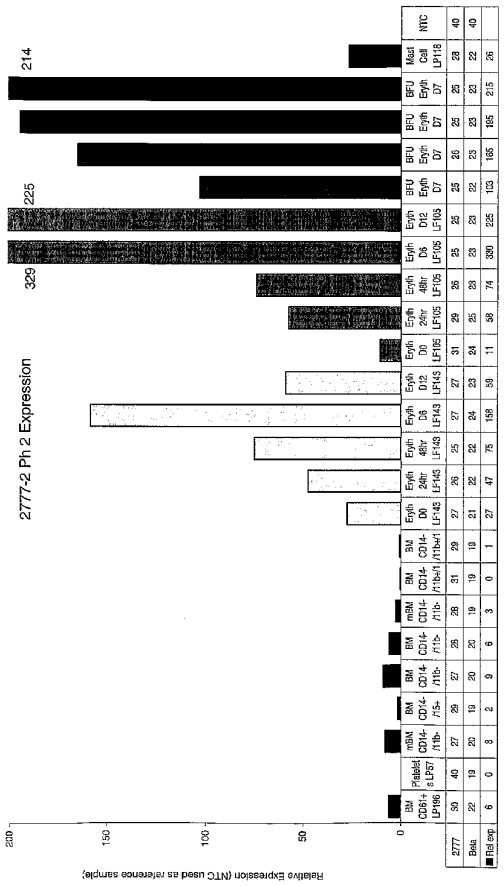

2777-2 Ph 2 Expression
Relative Expression (NTC used as reference sample)
214
225
329
200
150
100
50
0
2777
Basi
Rel exp
BM CD34+ LP196
Platelet s LP57
mBM CD14- /11b-
BM CD14- /15-
BM CD14- /11b-
BM CD14- /11b-
mBM CD14- /11b-
BM CD14- /11b+/1
BM CD14- /11bhi/1
Eryth D0 LF143
Eryth 24hr LF143
Eryth 48hr LF143
Eryth D5 LF143
Eryth D12 LF143
Eryth D0 LF105
Eryth 24hr LF105
Eryth 48hr LF105
Eryth D5 LF105
Eryth D12 LF103
BFU Eryth D7
BFU Eryth D7
BFU Eryth D7
BFU Eryth D7
BFU Eryth D7
Mast Cell LP118
NTC

FIGURE 1C

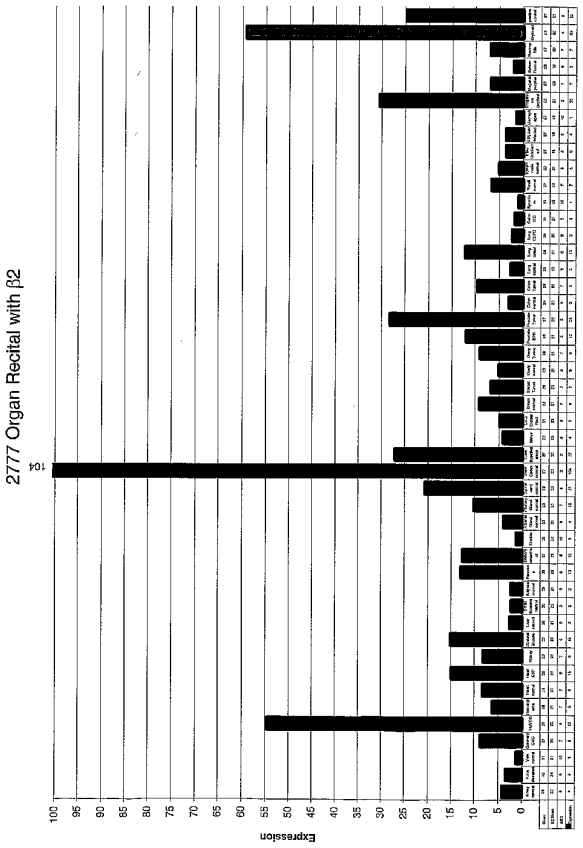

2777 Organ Recital with β2
104
Expression
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0

FIGURE 1D

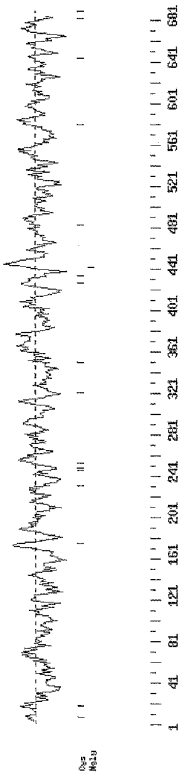

1
41
81
121
161
201
241
281
321
361
401
441
481
521
561
601
641
681

FIGURE 2

Input file Pbh2777FL1.seq; Output File 2777.trans
Sequence length 2515

```
GAATTCCGGGGCATGCTGTGGCGGCGGTTGGGCCGAGGCAGGCGGCCTCAGTGGCCGAGGTGGCTTGGACGCGTACGAG

                                                        M   K   P   P   A   A   C       7
GTGGAAGGAGGGAGGGAGCCGCAGGCGCAGACCCACAGACCACCCGCC ATG AAG CCC CCC GCA GCC TGT      21

  A   G   D   M   A   D   A   A   S   P   C   S   V   V   N   D   L   R   W   D      27
GCA GGA GAC ATG GCG GAC GCA GCA TCT CCG TGC TCT GTG GTA AAC GAC CTG CGG TGG GAC     81

  L   S   A   Q   Q   I   E   E   R   T   R   E   L   I   E   Q   T   K   R   V      47
CTG AGT GCC CAG CAG ATA GAG GAG CGC ACC AGG GAG CTC ATC GAG CAG ACC AAG CGC GTG    141

  Y   D   Q   V   G   T   Q   E   F   E   D   V   S   Y   E   S   T   L   K   A      67
TAT GAC CAG GTT GGC ACC CAG GAG TTT GAG GAC GTG TCC TAC GAG AGC ACG CTC AAG GCG    201

  L   A   D   V   E   V   T   Y   T   V   Q   R   N   I   L   D   F   P   Q   H      87
CTG GCC GAT GTG GAG GTC ACC TAC ACA GTT CAG AGG AAT ATC CTT GAC TTC CCC CAG CAT    261

  V   S   P   S   K   D   I   R   T   A   S   T   E   A   D   K   K   L   S   E     107
GTT TCC CCC TCC AAG GAC ATC CGG ACA GCC AGC ACA GAG GCC GAC AAG AAG CTC TCT GAG    321

  F   D   V   E   M   S   M   R   E   D   V   Y   Q   R   I   V   W   L   Q   E     127
TTC GAC GTG GAG ATG AGC ATG AGG GAG GAC GTG TAC CAG AGG ATC GTG TGG CTC CAG GAG    381

  K   V   Q   K   D   S   L   R   P   E   A   A   R   Y   L   E   R   L   T   K     147
AAA GTT CAG AAG GAC TCA CTG AGG CCC GAG GCT GCG CGG TAC CTG GAG CGG CTA ATC AAG    441

  L   G   R   R   N   G   L   H   L   P   R   E   T   Q   E   N   I   K   R   I     167
CTG GGC CGG AGA AAT GGG CTT CAC CTC CCC AGA GAG ACT CAG GAA AAC ATC AAA CGC ATC    501

  K   K   K   L   S   L   L   C   I   D   F   N   K   N   L   N   E   D   T   T     187
AAG AAG AAG CTG AGC CTT CTG TGC ATC GAC TTC AAC AAG AAC CTG AAC GAG GAC ACG ACC    561

  F   L   P   F   T   L   Q   E   L   G   G   L   P   E   D   F   L   N   S   L     207
TTC CTG CCC TTC ACG CTC CAG GAG CTA GGA GGG CTC CCC GAG GAC TTT CTG AAC TCC CTG    621

  E   K   M   E   D   G   K   L   K   V   T   L   K   Y   P   H   Y   F   P   L     227
GAG AAG ATG GAG GAC GGC AAG TTG AAG GTC ACC CTC AAG TAC CCC CAT TAC TTC CCC CTC    681

  L   K   K   C   H   V   P   E   T   R   R   K   V   E   E   A   F   N   C   R     247
CTG AAG AAA TGC CAC GTG CCT GAG ACC AGG AGG AAA GTG GAG GAG GCC TTC AAC TGC CGG    741

  C   K   E   E   N   C   A   I   L   K   E   L   V   T   L   R   A   Q   K   S     267
TGC AAG GAG GAG AAC TGC GCT ATC CTC AAG GAG CTG GTG ACG CTG CGG GCC CAG AAG TCC    801

  R   L   L   G   F   H   T   H   A   D   Y   V   L   E   M   N   M   A   K   T     287
CGC CTG CTG GGG TTC CAC ACG CAC GCC GAC TAT GTC CTG GAG ATG AAC ATG GCC AAG ACC    861

  S   Q   T   V   A   T   F   L   D   E   L   A   Q   K   L   K   P   L   G   E     307
AGC CAG ACC GTG GCC ACC TTC CTA GAT GAG CTG GCG CAG AAG CTG AAG CCC CTG GGG GAG    921

  Q   E   R   A   V   I   L   E   L   K   R   A   E   C   E   R   R   G   L   P     327
CAG GAG CGT GCG GTG ATT CTG GAG CTG AAG CGT GCG GAG TGC GAG CGC CGG GGC CTG CCC    981

  F   D   G   R   I   R   A   W   D   M   R   Y   Y   M   N   Q   V   E   E   T     347
TTC GAC GGC CGC ATC CGT GCC TGG GAC ATG CGC TAC TAC ATG AAC CAG GTG GAG GAG ACG   1041

  R   Y   C   V   D   Q   N   L   L   K   E   Y   F   P   V   Q   V   V   T   H     367
CGC TAC TGC GTG GAC CAG AAC CTG CTC AAG GAG TAC TTC CCC GTG CAG GTG GTC ACG CAC   1101

  G   L   L   G   I   Y   Q   E   L   L   G   L   A   F   H   H   E   E   G   A     387
GGG CTG CTG GGC ATC TAC CAG GAG CTC CTG GGG CTG GCC TTC CAC CAC GAG GAG GGC GCC   1161

  S   A   W   H   E   D   V   R   L   Y   T   A   R   D   A   A   S   G   E   V     407
AGT GCC TGG CAT GAG GAC GTG CGG CTC TAC ACC GCG AGG GAC GCG GCC TCG GGG GAG GTG   1221

  V   G   K   F   Y   L   D   L   Y   P   R   E   G   K   Y   G   H   A   A   C     427
GTC GGC AAG TTC TAC CTG GAC CTG TAC CCG CGG GAA GGA AAG TAC GGG CAC GCG GCC TGC   1281

  F   G   L   Q   P   G   C   L   R   Q   D   G   S   R   Q   I   A   I   A   A     447
TTT GGC CTG CAG CCC GGC TGC CTG CGG CAG GAT GGG AGC CGC CAG ATC GCC ATC GCG GCC   1341

  M   V   A   N   F   T   K   P   T   A   D   A   P   S   L   L   Q   H   D   E     467
ATG GTG GCC AAC TTC ACC AAG CCC ACA GCC GAC GCG CCC TCG CTG CTG CAG CAT GAC GAG   1401
```

FIGURE 3A

```
 V  E  T  Y  F  H  E  F  G  H  V  M  H  Q  L  C  S  Q  A  E   487
GTG GAG ACC TAC TTC CAT GAG TTT GGC CAC GTG ATG CAC CAG CTC TGC TCC CAG GCG GAG  1461

 F  A  M  F  S  G  T  H  V  E  R  D  F  V  E  A  P  S  Q  M   507
TTC GCC ATG TTC AGC GGG ACC CAC GTG GAG CGG GAC TTT GTG GAG GCG CCG TCG CAG ATG  1521

 L  E  N  W  V  W  E  Q  E  P  L  L  R  M  S  R  H  Y  R  T   527
CTG GAG AAC TGG GTG TGG GAG CAG GAG CCG CTG CTG CGG ATG TCG CGG CAC TAC CGC ACA  1581

 G  S  A  V  P  R  E  L  L  E  K  L  I  E  S  R  Q  A  N  T   547
GGC AGC GCC GTG CCC CGG GAG CTC CTG GAG AAG CTC ATT GAG TCC CGG CAG GCC AAC ACA  1641

 G  L  F  N  L  R  Q  I  V  L  A  K  V  D  Q  A  L  H  T  Q   567
GGC CTC TTC AAC CTG CGC CAG ATC GTC CTC GCC AAG GTG GAC CAG GCC CTG CAC ACG CAG  1701

 T  D  A  D  P  A  E  E  Y  A  R  L  C  Q  E  I  L  G  V  P   587
ACG GAC GCA GAC CCC GCC GAG GAG TAT GCG CGG CTC TGC CAG GAG ATC CTC GGG GTC CCG  1761

 A  T  P  G  T  N  M  P  A  T  F  G  H  L  A  G  G  Y  D  A   607
GCC ACG CCA GGA ACC AAC ATG CCT GCA ACC TTC GGC CAT CTG GCA GGT GGC TAC GAC GCC  1821

 Q  Y  Y  G  Y  L  W  S  E  V  Y  S  M  D  M  F  H  T  R  F   627
CAG TAC TAC GGG TAC CTG TGG AGC GAG GTG TAT TCC ATG GAC ATG TTC CAC ACG CGC TTC  1881

 K  Q  E  G  V  L  N  S  K  V  G  M  D  Y  R  S  C  I  L  R   647
AAG CAG GAG GGT GTC CTG AAC AGC AAG GTT GGC ATG GAT TAC AGA AGC TGC ATC CTG AGA  1941

 P  G  G  S  E  D  A  S  A  M  L  R  R  F  L  G  R  D  P  K   667
CCC GGC GGT TCC GAG GAT GCC AGC GCC ATG CTG AGG CGC TTC CTG GGC CGT GAC CCC AAG  2001

 Q  D  A  F  L  L  S  K  G  L  Q  V  G  G  C  E  P  E  P  Q   687
CAG GAC GCC TTC CTC CTG AGC AAG GGG CTG CAG GTC GGG GGC TGC GAG CCC GAG CCG CAG  2061

 V  C  *                                                       690
GTC TGC TGA                                                   2070

GGCCTGGCACTGCGACTGCCCAGTCTGGCCTGCGCTCCCGCCGCCCTGGTGCCTTAGCCCCCGGCACAGGATGGGGCAA

GCTCTGGCACAGTGCCTTGGGACTGGACTGGCAGGGTGGCTGAGCGGCTGTCTTGCCTCTTGTCATTGTCTGTCCCCAC

CCGGTCGTGGCCCACCCGGCTAGACGGCGTCCTCAAGGCATCTGGAGGGCTTTCGTGGCTGCCAGGGCCTGGTCTTTGT

TGCACTAACACGTCTCCTCTCTGGGAAACGTCCCTTGTCAGGAGACGGCTCTTCTTTGAAATGAGGTCATTAAAAGGAA

AC
```

FIGURE 3B

SEQUENCE LISTING

<110> Carroll, Joseph M.

<120> Methods and compositions for the diagnosis and treatment of hematologic disorders using 2777

<130> MPI01-274

<150> 60/335,251
<151> 2001-10-31

<160> 3

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 2515
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 1
gaattccggg gcatgctgtg gcggcggttg ggccgaggca ggcggcctca gtggccgagg 60
tggcttggac gcgtacgagg tggaaggagg gagggagccg caggcgcaga cccacagacc 120
acccgccatg aagccccccg cagcctgtgc aggagacatg gcggacgcag catctccgtg 180
ctctgtggta aacgacctgc ggtgggacct gagtgcccag cagatagagg agcgcaccag 240
ggagctcatc gagcagacca agcgcgtgta tgaccaggtt ggcacccagg agtttgagga 300
cgtgtcctac gagagcacgc tcaaggcgct ggccgatgtg gaggtcacct acacagttca 360
gaggaatatc cttgacttcc cccagcatgt ttcccctcc aaggacatcc ggacagccag 420
cacagaggcc gacaagaagc tctctgagtt cgacgtggag atgagcatga gggaggacgt 480
gtaccagagg atcgtgtggc tccaggagaa agttcagaag gactcactga ggcccgaggc 540
tgcgcggtac ctggagcggc taatcaagct gggccggaga aatgggcttc acctccccag 600
agagactcag gaaaacatca aacgcatcaa gaagaagctg agccttctgt gcatcgactt 660
caacaagaac ctgaacgagg acacgacctt cctgccttc acgctccagg agctaggagg 720
gctccccgag gactttctga actccctgga gaagatggag gacggcaagt tgaaggtcac 780
cctcaagtac ccccattact tcccctcct gaagaaatgc cacgtgcctg agaccaggag 840
gaaagtggag gaggccttca actgccggtg caaggaggag aactgcgcta tcctcaagga 900
gctggtgacg ctgcgggccc agaagtcccg cctgctgggg ttccacacgc acgccgacta 960
tgtcctggag atgaacatgg ccaagaccag ccagaccgtg gccaccttcc tagatgagct 1020
ggcgcagaag ctgaagcccc tgggggagca ggagcgtgcg gtgattctgg agctgaagcg 1080
tgcggagtgc gagcgccggg gcctgccctt cgacggccgc atccgtgcct gggacatgcg 1140
ctactacatg aaccaggtgg aggagacgcg ctactgcgtg gaccagaacc tgctcaagga 1200
gtacttcccc gtgcaggtgg tcacgcacgg gctgctgggc atctaccagg agctcctggg 1260
gctggccttc caccacgagg agggcgccag tgcctggcat gaggacgtgc ggctctacac 1320
cgcgagggac gcggcctcgg gggaggtggt cggcaagttc tacctggacc tgtacccgcg 1380
ggaaggaaag tacgggcacg cggcctgctt tggcctgcag cccggctgcc tgcggcagga 1440
tgggagccgc cagatcgcca tcgcggccat ggtggccaac ttcaccaagc ccacagccga 1500
cgcgccctcg ctgctgcagc atgacgaggt ggagacctac ttccatgagt ttggccacgt 1560
gatgcaccag ctctgctccc aggcggagtt cgccatgttc agcgggaccc acgtggagcg 1620
ggactttgtg gaggcgccgt cgcagatgct ggagaactgg gtgtgggagc aggagccgct 1680
gctgcggatg tcgcggcact accgcacagg cagcgccgtg ccccgggagc tcctggagaa 1740
gctcattgag tcccggcagg ccaacacagg cctcttcaac ctgcgccaga tcgtcctcgc 1800
caaggtggac caggcctgc acacgcagac ggacgcagac cccgccgagg agtatgcgcg 1860
gctctgccag gagatcctcg gggtcccggc cacgccagga accaacatgc ctgcaacctt 1920
cggccatctg gcaggtggct acgacgccca gtactacggg tacctgtgga gcgaggtgta 1980
ttccatggac atgttccaca cgcgcttcaa gcaggagggt gtcctgaaca gcaaggttgg 2040
catggattac agaagctgca tcctgagacc cggcggttcc gaggatgcca gcgccatgct 2100
gaggcgcttc ctgggccgtg accccaagca ggacgccttc ctcctgagca aggggctgca 2160
ggtcgggggc tgcgagcccg agccgcaggt ctgctgaggc ctggcactgc gactgcccag 2220

tctggcctgc gctcccgccg ccctggtgcc ttagccccg gcacaggatg gggcaagctc 2280
tggcacagtg ccttgggact ggactggcag ggtggctgag cggctgtctt gcctcttgtc 2340
attgtctgtc cccacccggt cgtggcccac ccggctagac ggcgtcctca aggcatctgg 2400
agggctttcg tggctgccag ggcctggtct ttgttgcact aacacgtctc ctctctggga 2460
aacgtccctt gtcaggagac ggctcttctt tgaaatgagg tcattaaaag gaaac 2515

<210> 2
<211> 836
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 2
Asn Ser Gly Ala Cys Cys Gly Gly Gly Trp Ala Glu Ala Gly Gly Leu
1 5 10 15
Ser Gly Arg Gly Gly Leu Asp Ala Tyr Glu Val Glu Gly Gly Arg Glu
20 25 30
Pro Gln Ala Gln Thr His Arg Pro Pro Ala Met Lys Pro Pro Ala Ala
35 40 45
Cys Ala Gly Asp Met Ala Asp Ala Ala Ser Pro Cys Ser Val Val Asn
50 55 60
Asp Leu Arg Trp Asp Leu Ser Ala Gln Gln Ile Glu Glu Arg Thr Arg
65 70 75 80
Glu Leu Ile Glu Gln Thr Lys Arg Val Tyr Asp Gln Val Gly Thr Gln
85 90 95
Glu Phe Glu Asp Val Ser Tyr Glu Ser Thr Leu Lys Ala Leu Ala Asp
100 105 110
Val Glu Val Thr Tyr Thr Val Gln Arg Asn Ile Leu Asp Phe Pro Gln
115 120 125
His Val Ser Pro Ser Lys Asp Ile Arg Thr Ala Ser Thr Glu Ala Asp
130 135 140
Lys Lys Leu Ser Glu Phe Asp Val Glu Met Ser Met Arg Glu Asp Val
145 150 155 160
Tyr Gln Arg Ile Val Trp Leu Gln Glu Lys Val Gln Lys Asp Ser Leu
165 170 175
Arg Pro Glu Ala Ala Arg Tyr Leu Glu Arg Leu Ile Lys Leu Gly Arg
180 185 190
Arg Asn Gly Leu His Leu Pro Arg Glu Thr Gln Glu Asn Ile Lys Arg
195 200 205
Ile Lys Lys Lys Leu Ser Leu Leu Cys Ile Asp Phe Asn Lys Asn Leu
210 215 220
Asn Glu Asp Thr Thr Phe Leu Pro Phe Thr Leu Gln Glu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Leu Pro Glu Asp Phe Leu Asn Ser Leu Glu Lys Met Glu Asp Gly Lys
245 250 255
Leu Lys Val Thr Leu Lys Tyr Pro His Tyr Phe Pro Leu Leu Lys Lys
260 265 270
Cys His Val Pro Glu Thr Arg Arg Lys Val Glu Glu Ala Phe Asn Cys
275 280 285
Arg Cys Lys Glu Glu Asn Cys Ala Ile Leu Lys Glu Leu Val Thr Leu
290 295 300
Arg Ala Gln Lys Ser Arg Leu Leu Gly Phe His Thr His Ala Asp Tyr
305 310 315 320
Val Leu Glu Met Asn Met Ala Lys Thr Ser Gln Thr Val Ala Thr Phe
325 330 335
Leu Asp Glu Leu Ala Gln Lys Leu Lys Pro Leu Gly Glu Gln Glu Arg
340 345 350
Ala Val Ile Leu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Cys Glu Arg Arg Gly Leu
355 360 365
Pro Phe Asp Gly Arg Ile Arg Ala Trp Asp Met Arg Tyr Tyr Met Asn
370 375 380
Gln Val Glu Glu Thr Arg Tyr Cys Val Asp Gln Asn Leu Leu Lys Glu

385 390 395 400
Tyr Phe Pro Val Gln Val Val Thr His Gly Leu Leu Gly Ile Tyr Gln
405 410 415
Glu Leu Leu Gly Leu Ala Phe His His Glu Glu Gly Ala Ser Ala Trp
420 425 430
His Glu Asp Val Arg Leu Tyr Thr Ala Arg Asp Ala Ala Ser Gly Glu
435 440 445
Val Val Gly Lys Phe Tyr Leu Asp Leu Tyr Pro Arg Glu Gly Lys Tyr
450 455 460
Gly His Ala Ala Cys Phe Gly Leu Gln Pro Gly Cys Leu Arg Gln Asp
465 470 475 480
Gly Ser Arg Gln Ile Ala Ile Ala Ala Met Val Ala Asn Phe Thr Lys
485 490 495
Pro Thr Ala Asp Ala Pro Ser Leu Leu Gln His Asp Glu Val Glu Thr
500 505 510
Tyr Phe His Glu Phe Gly His Val Met His Gln Leu Cys Ser Gln Ala
515 520 525
Glu Phe Ala Met Phe Ser Gly Thr His Val Glu Arg Asp Phe Val Glu
530 535 540
Ala Pro Ser Gln Met Leu Glu Asn Trp Val Trp Glu Gln Glu Pro Leu
545 550 555 560
Leu Arg Met Ser Arg His Tyr Arg Thr Gly Ser Ala Val Pro Arg Glu
565 570 575
Leu Leu Glu Lys Leu Ile Glu Ser Arg Gln Ala Asn Thr Gly Leu Phe
580 585 590
Asn Leu Arg Gln Ile Val Leu Ala Lys Val Asp Gln Ala Leu His Thr
595 600 605
Gln Thr Asp Ala Asp Pro Ala Glu Glu Tyr Ala Arg Leu Cys Gln Glu
610 615 620
Ile Leu Gly Val Pro Ala Thr Pro Gly Thr Asn Met Pro Ala Thr Phe
625 630 635 640
Gly His Leu Ala Gly Gly Tyr Asp Ala Gln Tyr Tyr Gly Tyr Leu Trp
645 650 655
Ser Glu Val Tyr Ser Met Asp Met Phe His Thr Arg Phe Lys Gln Glu
660 665 670
Gly Val Leu Asn Ser Lys Val Gly Met Asp Tyr Arg Ser Cys Ile Leu
675 680 685
Arg Pro Gly Gly Ser Glu Asp Ala Ser Ala Met Leu Arg Arg Phe Leu
690 695 700
Gly Arg Asp Pro Lys Gln Asp Ala Phe Leu Leu Ser Lys Gly Leu Gln
705 710 715 720
Val Gly Gly Cys Glu Pro Glu Pro Gln Val Cys Gly Leu Ala Leu Arg
725 730 735
Leu Pro Ser Leu Ala Cys Ala Pro Ala Ala Leu Val Pro Pro Pro Ala
740 745 750
Gln Asp Gly Ala Ser Ser Gly Thr Val Pro Trp Asp Trp Thr Gly Arg
755 760 765
Val Ala Glu Arg Leu Ser Cys Leu Leu Ser Leu Ser Val Pro Thr Arg
770 775 780
Ser Trp Pro Thr Arg Leu Asp Gly Val Leu Lys Ala Ser Gly Gly Leu
785 790 795 800
Ser Trp Leu Pro Gly Pro Gly Leu Cys Cys Thr Asn Thr Ser Pro Leu
805 810 815
Trp Glu Thr Ser Leu Val Arg Arg Arg Leu Phe Phe Glu Met Arg Ser
820 825 830
Leu Lys Gly Asn
835

<210> 3
<211> 2515

<212> DNA
<213> Homo sapien

<220>
<221> CDS
<222> (128)...(2197)

<400> 3
```
gaattccggg gcatgctgtg gcggcggttg ggccgaggca ggcggcctca gtggccgagg 60
tggcttggac gcgtacgagg tggaaggagg gagggagccg caggcgcaga cccacagacc 120
acccgcc atg aag ccc ccc gca gcc tgt gca gga gac atg gcg gac gca   169
       Met Lys Pro Pro Ala Ala Cys Ala Gly Asp Met Ala Asp Ala
        1               5                  10

gca tct ccg tgc tct gtg gta aac gac ctg cgg tgg gac ctg agt gcc   217
Ala Ser Pro Cys Ser Val Val Asn Asp Leu Arg Trp Asp Leu Ser Ala
 15                  20                  25                  30

cag cag ata gag gag cgc acc agg gag ctc atc gag cag acc aag cgc   265
Gln Gln Ile Glu Glu Arg Thr Arg Glu Leu Ile Glu Gln Thr Lys Arg
                 35                  40                  45

gtg tat gac cag gtt ggc acc cag gag ttt gag gac gtg tcc tac gag   313
Val Tyr Asp Gln Val Gly Thr Gln Glu Phe Glu Asp Val Ser Tyr Glu
             50                  55                  60

agc acg ctc aag gcg ctg gcc gat gtg gag gtc acc tac aca gtt cag   361
Ser Thr Leu Lys Ala Leu Ala Asp Val Glu Val Thr Tyr Thr Val Gln
         65                  70                  75

agg aat atc ctt gac ttc ccc cag cat gtt tcc ccc tcc aag gac atc   409
Arg Asn Ile Leu Asp Phe Pro Gln His Val Ser Pro Ser Lys Asp Ile
     80                  85                  90

cgg aca gcc agc aca gag gcc gac aag aag ctc tct gag ttc gac gtg   457
Arg Thr Ala Ser Thr Glu Ala Asp Lys Lys Leu Ser Glu Phe Asp Val
 95                 100                 105                 110

gag atg agc atg agg gag gac gtg tac cag agg atc gtg tgg ctc cag   505
Glu Met Ser Met Arg Glu Asp Val Tyr Gln Arg Ile Val Trp Leu Gln
                115                 120                 125

gag aaa gtt cag aag gac tca ctg agg ccc gag gct gcg cgg tac ctg   553
Glu Lys Val Gln Lys Asp Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ala Arg Tyr Leu
            130                 135                 140

gag cgg cta atc aag ctg ggc cgg aga aat ggg ctt cac ctc ccc aga   601
Glu Arg Leu Ile Lys Leu Gly Arg Arg Asn Gly Leu His Leu Pro Arg
        145                 150                 155

gag act cag gaa aac atc aaa cgc atc aag aag aag ctg agc ctt ctg   649
Glu Thr Gln Glu Asn Ile Lys Arg Ile Lys Lys Lys Leu Ser Leu Leu
    160                 165                 170

tgc atc gac ttc aac aag aac ctg aac gag gac acg acc ttc ctg ccc   697
Cys Ile Asp Phe Asn Lys Asn Leu Asn Glu Asp Thr Thr Phe Leu Pro
175                 180                 185                 190

ttc acg ctc cag gag cta gga ggg ctc ccc gag gac ttt ctg aac tcc   745
Phe Thr Leu Gln Glu Leu Gly Gly Leu Pro Glu Asp Phe Leu Asn Ser
                195                 200                 205
```

```
ctg gag aag atg gag gac ggc aag ttg aag gtc acc ctc aag tac ccc   793
Leu Glu Lys Met Glu Asp Gly Lys Leu Lys Val Thr Leu Lys Tyr Pro
            210                 215                 220

cat tac ttc ccc ctc ctg aag aaa tgc cac gtg cct gag acc agg agg   841
His Tyr Phe Pro Leu Leu Lys Lys Cys His Val Pro Glu Thr Arg Arg
        225                 230                 235

aaa gtg gag gag gcc ttc aac tgc cgg tgc aag gag gag aac tgc gct   889
Lys Val Glu Glu Ala Phe Asn Cys Arg Cys Lys Glu Glu Asn Cys Ala
    240                 245                 250

atc ctc aag gag ctg gtg acg ctg cgg gcc cag aag tcc cgc ctg ctg   937
Ile Leu Lys Glu Leu Val Thr Leu Arg Ala Gln Lys Ser Arg Leu Leu
255                 260                 265                 270

ggg ttc cac acg cac gcc gac tat gtc ctg gag atg aac atg gcc aag   985
Gly Phe His Thr His Ala Asp Tyr Val Leu Glu Met Asn Met Ala Lys
                275                 280                 285

acc agc cag acc gtg gcc acc ttc cta gat gag ctg gcg cag aag ctg  1033
Thr Ser Gln Thr Val Ala Thr Phe Leu Asp Glu Leu Ala Gln Lys Leu
            290                 295                 300

aag ccc ctg ggg gag cag gag cgt gcg gtg att ctg gag ctg aag cgt  1081
Lys Pro Leu Gly Glu Gln Glu Arg Ala Val Ile Leu Glu Leu Lys Arg
        305                 310                 315

gcg gag tgc gag cgc cgg ggc ctg ccc ttc gac ggc cgc atc cgt gcc  1129
Ala Glu Cys Glu Arg Arg Gly Leu Pro Phe Asp Gly Arg Ile Arg Ala
    320                 325                 330

tgg gac atg cgc tac tac atg aac cag gtg gag gag acg cgc tac tgc  1177
Trp Asp Met Arg Tyr Tyr Met Asn Gln Val Glu Glu Thr Arg Tyr Cys
335                 340                 345                 350

gtg gac cag aac ctg ctc aag gag tac ttc ccc gtg cag gtg gtc acg  1225
Val Asp Gln Asn Leu Leu Lys Glu Tyr Phe Pro Val Gln Val Val Thr
                355                 360                 365

cac ggg ctg ctg ggc atc tac cag gag ctc ctg ggg ctg gcc ttc cac  1273
His Gly Leu Leu Gly Ile Tyr Gln Glu Leu Leu Gly Leu Ala Phe His
            370                 375                 380

cac gag gag ggc gcc agt gcc tgg cat gag gac gtg cgg ctc tac acc  1321
His Glu Glu Gly Ala Ser Ala Trp His Glu Asp Val Arg Leu Tyr Thr
        385                 390                 395

gcg agg gac gcg gcc tcg ggg gag gtg gtc ggc aag ttc tac ctg gac  1369
Ala Arg Asp Ala Ala Ser Gly Glu Val Val Gly Lys Phe Tyr Leu Asp
    400                 405                 410

ctg tac ccg cgg gaa gga aag tac ggg cac gcg gcc tgc ttt ggc ctg  1417
Leu Tyr Pro Arg Glu Gly Lys Tyr Gly His Ala Ala Cys Phe Gly Leu
415                 420                 425                 430

cag ccc ggc tgc ctg cgg cag gat ggg agc cgc cag atc gcc atc gcg  1465
Gln Pro Gly Cys Leu Arg Gln Asp Gly Ser Arg Gln Ile Ala Ile Ala
                435                 440                 445
```

```
gcc atg gtg gcc aac ttc acc aag ccc aca gcc gac gcg ccc tcg ctg   1513
Ala Met Val Ala Asn Phe Thr Lys Pro Thr Ala Asp Ala Pro Ser Leu
            450                 455                 460

ctg cag cat gac gag gtg gag acc tac ttc cat gag ttt ggc cac gtg   1561
Leu Gln His Asp Glu Val Glu Thr Tyr Phe His Glu Phe Gly His Val
        465                 470                 475

atg cac cag ctc tgc tcc cag gcg gag ttc gcc atg ttc agc ggg acc   1609
Met His Gln Leu Cys Ser Gln Ala Glu Phe Ala Met Phe Ser Gly Thr
    480                 485                 490

cac gtg gag cgg gac ttt gtg gag gcg ccg tcg cag atg ctg gag aac   1657
His Val Glu Arg Asp Phe Val Glu Ala Pro Ser Gln Met Leu Glu Asn
495                 500                 505                 510

tgg gtg tgg gag cag gag ccg ctg ctg cgg atg tcg cgg cac tac cgc   1705
Trp Val Trp Glu Gln Glu Pro Leu Leu Arg Met Ser Arg His Tyr Arg
                515                 520                 525

aca ggc agc gcc gtg ccc cgg gag ctc ctg gag aag ctc att gag tcc   1753
Thr Gly Ser Ala Val Pro Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Ile Glu Ser
            530                 535                 540

cgg cag gcc aac aca ggc ctc ttc aac ctg cgc cag atc gtc ctc gcc   1801
Arg Gln Ala Asn Thr Gly Leu Phe Asn Leu Arg Gln Ile Val Leu Ala
        545                 550                 555

aag gtg gac cag gcc ctg cac acg cag acg gac gca gac ccc gcc gag   1849
Lys Val Asp Gln Ala Leu His Thr Gln Thr Asp Ala Asp Pro Ala Glu
    560                 565                 570

gag tat gcg cgg ctc tgc cag gag atc ctc ggg gtc ccg gcc acg cca   1897
Glu Tyr Ala Arg Leu Cys Gln Glu Ile Leu Gly Val Pro Ala Thr Pro
575                 580                 585                 590

gga acc aac atg cct gca acc ttc ggc cat ctg gca ggt ggc tac gac   1945
Gly Thr Asn Met Pro Ala Thr Phe Gly His Leu Ala Gly Gly Tyr Asp
                595                 600                 605

gcc cag tac tac ggg tac ctg tgg agc gag gtg tat tcc atg gac atg   1993
Ala Gln Tyr Tyr Gly Tyr Leu Trp Ser Glu Val Tyr Ser Met Asp Met
            610                 615                 620

ttc cac acg cgc ttc aag cag gag ggt gtc ctg aac agc aag gtt ggc   2041
Phe His Thr Arg Phe Lys Gln Glu Gly Val Leu Asn Ser Lys Val Gly
        625                 630                 635

atg gat tac aga agc tgc atc ctg aga ccc ggc ggt tcc gag gat gcc   2089
Met Asp Tyr Arg Ser Cys Ile Leu Arg Pro Gly Gly Ser Glu Asp Ala
    640                 645                 650

agc gcc atg ctg agg cgc ttc ctg ggc cgt gac ccc aag cag gac gcc   2137
Ser Ala Met Leu Arg Arg Phe Leu Gly Arg Asp Pro Lys Gln Asp Ala
655                 660                 665                 670

ttc ctc ctg agc aag ggg ctg cag gtc ggg ggc tgc gag ccc gag ccg   2185
Phe Leu Leu Ser Lys Gly Leu Gln Val Gly Gly Cys Glu Pro Glu Pro
                675                 680                 685

cag gtc tgc tga ggcctggcac tgcgactgcc cagtctggcc tgcgctcccg       2237
```

Gln Val Cys *

ccgccctggt gccttagccc ccggcacagg atggggcaag ctctggcaca gtgccttggg 2297
actggactgg cagggtggct gagcggctgt cttgcctctt gtcattgtct gtccccaccc 2357
ggtcgtggcc cacccggcta gacggcgtcc tcaaggcatc tggaggggctt tcgtggctgc 2417
cagggcctgg tctttgttgc actaacacgt ctcctctctg ggaaacgtcc cttgtcagga 2477
gacggctctt ctttgaaatg aggtcattaa aaggaaac 2515

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 May 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/037164 A3

(51) International Patent Classification[7]: C12Q 1/68, C12P 19/34, C12N 15/63, A01N 43/04, A61K 49/00, C07H 21/02, 21/04

(21) International Application Number: PCT/US02/34565

(22) International Filing Date: 28 October 2002 (28.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/335,251 31 October 2001 (31.10.2001) 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)*: **CARROLL, Joseph, M.** [US/US]; 113 Sciarappa Street, Cambridge, MA 02141 (US).

(74) Agent: **SIOUSSAT, Tracy, M.**; Intellectual Property Group, 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, 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.

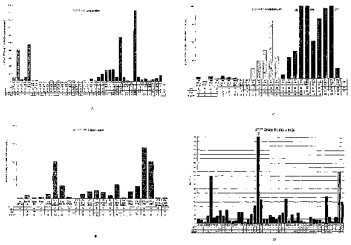
(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, 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:
18 December 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF HEMATOLOGICAL DISORDERS USING 2777



(57) Abstract: The present invention relates to methods and compositions for the diagnosis and treatment of hematological disorders, including, but not limited to, apalstic anemia, hemophilia, sickle cell anemia, thalassisemia, blood loss and other blood disorders, *e.g.*, blood disorders related to bone marrow irradiation or chemotherapy treatment or renal failure. The invention further provides methods for identifying a compound capable of treating a hematological disorder. The invention also provides methods for identifying a compound capable of modulating a hematopoietic cell activity. Yet further, the invention provides a method for modulating a hematopoietic cell activity. In addition, the invention provides a method for treating a subject having a hematological disorder characterized by aberrant 2777 polypeptide activity or aberrant 2777 nucleic acid expression. In another aspect, the invention provides methods for increasing a hematopoietic cell proliferation in a subject and methods for modulating hematopoietic cell apoptosis in a subject.

WO 03/037164 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/34565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) :Please See Extra Sheet.
US CL : 435/6, 91.31, 455; 515/1, 44; 420/9.1, 9.2; 536/23.1, 24.5
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. : 435/6, 91.31, 455; 515/1, 44; 420/9.1, 9.2; 536/23.1, 24.5

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)

West, Dialog, Seq. Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,424,205 (DOVEY et al) 13 June 1995, col. 10, line 43-col. 11, line 32; claims 1-11	1-7
X	WO 92/07068 A1 (ATHENA NEUROSCIENCES, INC.) 30 April 1992, page 16, line 17-page 17, line 2; claims 24 and 26	1-7
Y	THOMPSON, A et al. Cloning and functional expression of a metalloendopeptidase from human brain with the ability to cleave a Beta-APP substrate peptide, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1995, Vol. 213, No. 1, pages 66-73, esp. figure 1 on page 68.	1-6, 8

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document 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
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 JUNE 2003	04 SEP 2003

Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer
Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231	Jane Zara
Facsimile No. (703) 305-3230	Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)★

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/34585

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MILNER, N. et al. Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays; Nature Biotech., 1997, Vol. 15, pages 537-541, esp. figures 1, 2, 3 on pages 538-539.	1-6, 8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)★

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/34565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

C12Q 1/68; C12P 19/34; C12N 15/63; A01N 43/04; A61K 49/00; C07H 21/02, 21/04

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1998)★

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 48/00	Ａ６１Ｋ 48/00		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ 7/04	Ａ６１Ｐ 7/04		
Ａ６１Ｐ 7/06	Ａ６１Ｐ 7/06		
Ａ６１Ｐ 31/18	Ａ６１Ｐ 31/18		
Ａ６１Ｐ 31/22	Ａ６１Ｐ 31/22		
Ａ６１Ｐ 33/02	Ａ６１Ｐ 33/02		
Ａ６１Ｐ 33/06	Ａ６１Ｐ 33/06		
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 35/02	Ａ６１Ｐ 35/02		
Ｃ１２Ｑ 1/37	Ｃ１２Ｑ 1/37		
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
// Ｃ１２Ｎ 15/09	Ａ６１Ｋ 37/02		
	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	

(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,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 キャロル, ジョセフ エム.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４１, ケンブリッジ, シアラッパ ストリート １１３

Ｆターム(参考) 2G045 CB01 DA36 FA11 FB03
4B024 AA01 AA11 BA14 CA04 CA09 CA20 DA02 GA11 HA17
4B063 QA01 QQ08 QQ36 QR32 QR35 QR56 QR62 QR77 QS03 QS25 QS36 QX02 QX07
4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA02 DC50 MA13 MA17 MA23 MA28 MA35 MA37 MA52 MA55 MA56 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA512 ZA532 ZA552 ZB262 ZB272 ZB332 ZB382
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB41 BB43 CC22 CC23 GG02
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA13 MA17 MA23 MA28 MA35 MA37 MA52 MA55 MA56 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA51 ZA53 ZA55 ZB26 ZB27 ZB33 ZB38

专利名称(译)	使用2777诊断和治疗血液病的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2005507664A	公开(公告)日	2005-03-24
申请号	JP2003539514	申请日	2002-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	米伦纽姆医药公司		
申请(专利权)人(译)	千年制药公司		
[标]发明人	キャロルジョセフエム		
发明人	キャロル, ジョセフ エム.		
IPC分类号	A61K31/00 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/02 A61P33/06 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/567		
CPC分类号	A61P7/04 A61P7/06 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/02 A61P33/06 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/6893 G01N2800/00 G01N2800/22 Y02A50/58		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/02 A61P33/06 A61P35/00 A61P35/02 C12Q1/37 G01N33/15.Z G01N33/50.Z A61K37/02 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ36 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/DC50 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA512 4C084/ZA532 4C084/ZA552 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB332 4C084/ZB382 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/GG02 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA13 4C086/MA17 4C086/MA23 4C086/MA28 4C086/MA35 4C086/MA37 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/MA56 4C086/MA59 4C086/MA60 4C086/MA63 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA51 4C086/ZA53 4C086/ZA55 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB33 4C086/ZB38		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/335251 2001-10-31 US		
其他公开文献	JP2005507664A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明中，血液病（再生障碍性贫血，血友病，镰状细胞贫血，地中海贫血，失血等血液疾病（例如，与骨髓放射治疗或化疗治疗或肾衰竭相关血液病症包括但不限于炎性肠病）。本发明进一步提供了鉴定能够治疗血液病的化合物的方法。本发明还提供了鉴定能够调节造血细胞活性的化合物的方法。更进一步，本发明提供了一种调节造血细胞活性的方法。此外，本发明提供了治疗患有血液病症的受试者的方法，所述血液病症的特征在于异常的2777多肽活性或异常的2777核酸表达。另一方面，本发明提供了增加受试者中造血细胞增殖的方法，以及调节受试者中造血细胞凋亡的方法。