(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-512018
(P2004-512018A)
(43)公表日　平成16年4月22日(2004.4.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	2G045
A61K 38/44	A61K	39/00	H	4B024
A61K 39/00	A61K	45/00		4B063
A61K 45/00	A61P	1/16		4B064
A61P 1/16	A61P	3/04		4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 190 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-504287(P2002-504287)
(86)(22)出願日　平成13年6月22日(2001.6.22)
(85)翻訳文提出日　平成14年12月20日(2002.12.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/019930
(87)国際公開番号　WO2001/098332
(87)国際公開日　平成13年12月27日(2001.12.27)
(31)優先権主張番号　60/213,957
(32)優先日　平成12年6月22日(2000.6.22)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　301005050
インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４３０４・パロアルト・ポータードライブ　３１６０
(74)代理人　100089266
弁理士　大島　陽一
(72)発明者　ラル、プリーティ
アメリカ合衆国カリフォルニア州９５０５６・サンタクララ・ピーオーボックス　５１４２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】分泌性酸化還元タンパク質

(57)【要約】
本発明はヒト分泌性酸化還元タンパク質（ＳＲＰ）およびＳＲＰを同定し、コードするポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニストおよびアンタゴニストをも提供する。本発明はまた、ＳＲＰの異常発現に関連する疾患を診断、治療または予防する方法をも提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の（ａ）乃至（ｄ）からなる群から選択した単離されたポリペプチド。
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１－３（配列番号１乃至３）を有する群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド
（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも９０％が同一であるようなアミノ酸配列を含む天然のポリペプチド
（ｃ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片
（ｄ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫抗原性断片
【請求項２】
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１－３を有する群から選択した請求項１に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項３】
請求項１のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。
【請求項４】
請求項２のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。
【請求項５】
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４－６（配列番号４乃至６）を有する群から選択した請求項４に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項６】
請求項３に記載のポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。
【請求項７】
請求項６に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。
【請求項８】
請求項６に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。
【請求項９】
請求項１のポリペプチドを生産する方法であって、以下の過程を含む方法。
（ａ）前記ポリペプチドの発現に好適な条件下で、請求項１のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養する過程と、
（ｂ）そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程。
【請求項１０】
請求項１に記載のポリペプチドと特異的に結合する単離された抗体。
【請求項１１】
以下の（ａ）乃至（ｄ）からなる群から選択した単離されたポリヌクレオチド。
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４－６　を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド
（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４－６からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも９０％が同一であるような天然のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド
（ｃ）（ａ）のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド
（ｄ）（ｂ）のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド
（ｅ）（ａ）～（ｄ）のＲＮＡ等価物
【請求項１２】
請求項１１に記載のポリヌクレオチドの少なくとも６０の連続したヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１３】
請求項１１に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中

から検出する方法であって、
（ａ）前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を含む少なくとも２０の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程（ただし、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたは断片の間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする）と、
（ｂ）前記ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、 前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたは断片の間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることを特徴とする方法。
【請求項１４】
前記プローブが少なくとも６０の連続したヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
請求項１１に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、
（ａ）ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、
（ｂ）前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含むことを特徴とする方法。
【請求項１６】
請求項１のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。
【請求項１７】
前記ポリペプチドが、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３を有する群から選択したアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項１６に記載の成分。
【請求項１８】
機能的なＳＲＰの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項１６の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。
【請求項１９】
請求項１に記載のポリペプチドのアゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、
（ａ）請求項１のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、
（ｂ）前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。
【請求項２０】
請求項１９に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。
【請求項２１】
能的なＳＲＴの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項２０の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。
【請求項２２】
請求項１に記載のポリペプチドのアンタゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、
（ａ）請求項１のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、
（ｂ）前記サンプルにおいてアンタゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。
【請求項２３】
請求項２２に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容でき

る賦形剤とを含む組成物。
【請求項２４】
機能的なＳＲＰの過剰な発現に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項２３の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。
【請求項２５】
請求項１に記載のポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法であって、
（ａ）適切な条件下で請求項１に記載のポリペプチドを少なくとも１つの試験化合物に結合させるステップと、
（ｂ）請求項１に記載のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項１に記載のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。
【請求項２６】
請求項１に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、
（ａ）請求項１に記載のポリペプチドの活性が許容された条件下で、請求項１に記載のポリペプチドを少なくとも１つの試験化合物に結合させる過程と、
（ｂ）請求項１に記載のポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、
（ｃ）試験化合物の存在下での請求項１に記載のポリペプチドの活性を、試験化合物の不存在下での請求項１に記載のポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下での請求項１に記載のポリペプチドの活性の変化が、請求項１に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示することを特徴とする方法。
【請求項２７】
請求項５の配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、
（ａ）前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、
（ｂ）前記標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程と、
（ｃ）可変量の前記化合物の存在下と前記化合物の不存在下で、前記標的ポリヌクレオチドの発現を比較する過程とを含むことを特徴とする方法。
【請求項２８】
試験化合物の毒性を算定する方法であって、
（ａ）核酸を含む生物学的サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、
（ｂ）処理した前記生体サンプルの核酸と、請求項１１のポリヌクレオチドの少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含むプローブをハイブリダイズさせるステップであって、このハイブリダイゼーションゼーションが、前記プローブと前記生体サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項１１のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列またはその断片を含むポリヌクレオチドである、前記ステップと、
（ｃ）ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量するステップと、
（ｄ）前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量を、処理されていない生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示することを特徴とする方法。
【請求項２９】
生物学的サンプル中のＳＲＰの発現に関連する症状または疾患に対する診断試験法であって、
（ａ）前記抗体が前記ポリペプチドに結合し、抗体とポリペプチドとの複合体が形成されるのに適した条件下で、前記生物学的サンプルを請求項１０に記載の抗体と結合する過程と、

（ｂ）前記複合体を検出する過程とを含み、前記複合体の存在が、前記生物学的サンプル中の前記ポリペプチドの存在と相関することを特徴とする方法。
【請求項３０】
前記抗体が、
（ａ）キメラ抗体
（ｂ）単鎖抗体
（ｃ）Ｆａｂ断片
（ｄ）Ｆ（ａｂ’）$_2$ 断片
（ｅ）ヒト化抗体 のいずれかであることを特徴とする請求項１０に記載の抗体。
【請求項３１】
請求項１０に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを含む化合物。
【請求項３２】
被検者のＳＲＰの発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項３１に記載の化合物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。
【請求項３３】
前記抗体が標識されることを特徴とする請求項３１に記載の化合物。
【請求項３４】
被検者のＳＲＰの発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項３３に記載の化合物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。
【請求項３５】
請求項１０に記載の抗体の特異性を有するポリクローナル抗体を調製する方法であって、
（ａ）抗体反応を誘発する条件下で、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３を有する群から選択したアミノ酸配列含むポリペプチドまたはその免疫抗原性断片を用いて動物を免疫化する過程と、
（ｂ）前記動物から抗体を単離する過程と、
（ｃ）前記単離された抗体をポリペプチドでスクリーニングし、それによって、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するようなポリクローナル抗体を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。
【請求項３６】
請求項３５に記載の方法で産出した抗体。
【請求項３７】
請求項３６に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。
【請求項３８】
請求項１０に記載の抗体の特異性を有するモノクローナル抗体を製造する方法であって、
（ａ）抗体反応を誘発する条件下で、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３を有する群から選択したアミノ酸配列含むポリペプチドまたはその免疫抗原性断片を用いて動物を免疫化する過程と、
（ｂ）前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、
（ｃ）前記抗体産出細胞を不死化の細胞と融合して、モノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞を形成する過程と、
（ｄ）前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、
（ｅ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するような前記培養モノクローナル抗体から単離する過程とを含むことを特徴とする方法。
【請求項３９】
請求項３８に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。
【請求項４０】
請求項３９に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。
【請求項４１】
Ｆａｂ発現ライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求

項１０に記載の抗体。
【請求項４２】
組換え免疫グロブリンライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項１０に記載の抗体。
【請求項４３】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出する方法であって、
（ａ）前記抗体と前記ポリペプチドの特異結合を許容する条件下で、サンプルを用いて請求項１０に記載の抗体をインキュベートする過程と、
（ｂ）特異結合を検出する過程とを含み、 該特異結合が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドがサンプル中に存在することを標示することを特徴とする方法。
【請求項４４】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを精製する方法であって、
（ａ）前記抗体と前記ポリペプチドの特異結合を許容する条件下で、サンプルを用いて請求項１０に記載の抗体をインキュベートする過程と、
（ｂ）前記サンプルから前記抗体を分離し、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３を有する群から選択したアミノ酸配列を有する精製ポリペプチドを得る過程とを含むことを特徴とする方法。
【請求項４５】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１ のアミノ酸配列を含む請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４６】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２ のアミノ酸配列を含む請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４７】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３のアミノ酸配列を含む請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４８】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４ のポリヌクレオチド配列を有する請求項１１に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４９】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５のポリヌクレオチド配列を有する請求項１１に記載のポリヌクレオチド。
【請求項５０】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６のポリヌクレオチド配列を有する請求項１１に記載のポリヌクレオチド。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（技術分野）
本発明は、分泌性酸化還元タンパク質の核酸配列及びアミノ酸配列に関する。
本発明はまた、これらの配列を利用した細胞増殖異常、神経系疾患、および代謝疾患の診断・治療・予防に関する。 本発明はさらに、分泌性タンパク質の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の効果についての評価に関する。
【０００２】
（発明の背景）
酸化防御作用の概要
真核細胞は、まとめて好気性代謝と呼ばれる、複雑な一連の酸化還元反応によってエネルギーを抽出し高分子を生成する。好気性代謝の１つの結果は、超酸化物（O_2 －）と水酸基イオン（ＯＨ）の形で起こる遊離基（フリーラジカル）産物である。超酸化物は、細胞内で、ミトコンドリアと小胞体によって、電子伝達系の正しい経路から電子のO_2への「リーク」の結果として発生する。水酸基イオンは、電離放射線、および鉄または銅を含む

部位でO_2－と過酸化水素（H_2O_2）との反応によって発生する。フリーラジカル（特に水酸基イオン）は極めて反応性があり、タンパク質、炭水化物、ＤＮＡ、および脂質を含めたほとんどすべての分子と相互作用する。これらの相互作用によって、リン脂質ヒドロペルオキシドのような非ラジラルなヒドロペルオキシドが形成され得る。水酸基イオンとＤＮＡとの相互作用は、高齢者での癌発生に重要な寄与となっている可能性がある。サイトクロームＰ４５０仲介による酸化、平滑筋緊張力の調節、およびマクロファージと顆粒球による微生物の撲殺などのように、細胞はフリーラジカルとその誘導体を有益なように使用する場合もある（Ｂａｓｔ，Ａ．他（１９９１）Ａｍ．Ｊ．Ｍｅｄ．９１（３Ｃ）：２Ｓ－１３Ｓ）。

【０００３】

発生した超酸化物のほとんどは、スーパーオキシドジスムターゼ（ＳＯＤ）によって不均化反応が起こり、過酸化水素を発生する。過酸化水素は、また他の酸化酵素の作用によって産出されることもある。過酸化水素は分子構造が水分子に類似しており、細胞内および細胞間で非常に拡散しやすい。過酸化水素はカタラーゼによって除かれるが、ヒト細胞で過酸化水素とヒドロペルオキシドを除く最も重要な酵素は、グルタチオンペルオキシダーゼ（ＧＳＨＰｘ）である。ＧＳＨＰｘは、還元グルタチオン（ＧＳＨ）を酸化して酸化グルタチオンに変換するためにペルオキシドを使用することによって、ペルオキシドを除去する。これらの酵素が以下に考察される。

【０００４】

酸化防止系は、平衡のとれた統合システムとして存在する。この平衡が壊れると、臨床上の発症を起こす。例えば、ＧＳＨＰｘに比べてＳＯＤが過剰にある場合は、ダウン症候群として知られる臨床状態に関係があり得る。酸化防止レベルの低下、またはO_2およびH_2O_2レベルの上昇は、酸化ストレスを起こさせる。慢性炎症の部位で食細胞による酸化ストレスが生じると、関節で慢性関節リューマチを起こし、腸で炎症性腸疾患を起こす。喘息もまた、肺での炎症反応による発症であり、酸素のフリーラジカル形成に関係がある（Ｓｉｅｓ，Ｈ．（１９９１）Ａｍ．Ｊ．Ｍｅｄ．９１（３Ｃ）：３１Ｓ－３８Ｓ）。

【０００５】

グルタチオン ペルオキシダーゼ

グルタチオンペルオキシダーゼのファミリには、３種類の３量体グルタチオンペルオキシダーゼ（ＧＰｘ１－３）、および１量体のリン脂質ヒドロペルオキシド グルタチオンペルオキシダーゼ（ＰＨＧＰｘ／ＧＰｘ４）が含まれる。３量体とＧＰｘ４との間の全体的な相同性は３０％以下であるが、活性部位に関与するクラスターに著しい相同性が検出され、構造データと速度論データによって共通の触媒トライアッドが明らかになった（Ｅｐｐ，Ｏ．他（１９８３）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１３３：５１－６９）。このファミリメンバーは異なる組織分布を示す。ＧＰｘ１は広範に細胞で発現され、ＧＰｘ２は肝臓と結腸に存在し、ＧＰｘ３は血漿に存在する。ＧＰｘ４はすべての組織で低レベルで見つけられるが、精巣で高レベルに発現される。これらの組織局在パターンは、グルタチオンペルオキシダーゼ活性のレベルと標的レベルを調節する上で重要である可能性がある（Ｕｒｓｉｎｉ，Ｆ．他（１９９５）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２５２：３８－５３）。

ＧＰｘ４は、構造と活性の点でユニークである。ＧＰＸ４は、哺乳類で見つかる、唯一の１量体グルタチオンペルオキシダーゼである。ＧＰｘ４は、またリン脂質ヒドロペルオキシドに高親和性と反応性をもち、膜に結合する唯一の哺乳類グルタチオンペルオキシダーゼである。ＧＰｘ４による脂質の過酸化の阻害は、グルタチオンと生理的レベルのビタミンＥを必要とし、ＧＰｘ４とビタミンＥの酸化防止作用の連繋メカニズムを示唆する。ＧＰｘ４は、また代わりの転写部位と翻訳部位を有し、それが細胞内での局在性を決定する（Ｅｓｗｏｒｔｈｙ，Ｒ．Ｓ．他（１９９４）Ｇｅｎｅ １４４：３１７－３１８；Ｍａｉｏｒｉｎｏ，Ｍ．他（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８６：４４８－４５０）。

【０００６】
グルタチオンＳトランスフェラーゼ（ＧＳＴ）
グルタチオンＳトランスフェラーゼ（ＧＳＴ）は、二重基質特異性をもつ偏在性ファミリの酵素で、生体異物の生体内変化と解毒化、薬剤代謝、および過酸化水素性損傷に対する組織の保護等の重要な生化学的機能を果たす。これらの酵素によって触媒される基本的な反応は、求電子剤の還元型グルタチオン（ＧＳＨ）への抱合であり、その結果、その化学物質の活性化、または非活性化／解毒化が起こる。広範囲の化学物質への還元型ＧＳＨの結合の絶対的な必要性が、種々の生物および種々の細胞タイプでのＧＳＴ構造の多様性を必要とする。
【０００７】
ＧＳＴは、細胞質内に局在する、ホモ二量体またはヘテロ二量体のタンパク質である。主なイソ酵素は、共通の構造および触媒特性を有し、多くの場合においてそれらは、α、μ、π、およびθの４つの主要なクラスに分類される。２つの最も大きなクラスであるαおよびμは、それぞれの等電点（αではｐＩが約７．５～９．０、μではｐＩが約６．６）によって同定される。それぞれのＧＳＴは、ＧＳＨに対する共通の結合部位および可変性疎水性結合部位を有する。それぞれのイソ酵素における疎水性結合部位は、特定の求電子性基質に対して特異的である。ＧＳＴ内の特定のアミノ酸残基が、これらの結合部位および触媒活性に重要であるとして同定された。残基Ｑ６７、Ｔ６８、Ｄ１０１、Ｅ１０４、およびＲ１３１は、ＧＳＨの結合に重要である（Ｌｅｅ，　Ｈ－Ｃ他　（１９９５）　Ｊ．Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．　２７０：９９－１０９）。残基Ｒ１３、Ｒ２０、およびＲ６９はＧＳＴの触媒活性に重要である（Ｓｔｅｎｂｅｒｇ　Ｇ他（１９９１）　Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．　２７４：５４９－５５５）。
【０００８】
ＧＳＴは、潜在的な変異誘発性および発癌性の化学物質を不活性化し解毒するなど不可欠な機能を果たすが、ＧＳＴの機能障害や不適当な発現は有害になる。ラットおよびヒトＧＳＴの或る型は、発癌の信頼性の高い発癌前マーカーとなる。変異誘発性を調べるための良く知られたエーメス試験に用いられるネズミチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）などの細菌株におけるヒトＧＳＴの発現は、変異誘発におけるこれらの酵素の役割を決定するのに役立つ。マウスにおいて肝腫瘍を引き起こすｄｉｈａｌｏｍｅｔｈａｎｅｓは、ＧＳＴによって活性化されると考えられている。この考えは、非形質転換細胞よりもヒトＧＳＴを発現する形質転換した細菌細胞において、ｄｉｈａｌｏｍｅｔｈａｎｅｓが突然変異誘発性が高いということから支持される（Ｔｈｉｅｒ，　Ｒ．他（１９９３）　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　９０：８５６７－８５８０）。二臭化エチレンおよび二塩化エチレンの変異誘発性が、ヒトαＧＳＴ，Ａ１－１を発現する細菌細胞において上昇し、アフラトキシンＢ１の変異誘発がＧＳＴの発現が促進されることで非常に減少する（Ｓｉｍｕｌａ，　Ｔ．　Ｐ．他（１９９３）　Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎｅｓｉｓ　１４：１３７１－１３７６）。従って、ＧＳＴ活性の制御が、変異誘発および発癌の制御において有用であろう。
【０００９】
ＧＳＴは、多剤耐性（ＭＤＲ）として知られる多くの癌の薬剤治療に対する耐性獲得に関係する。ＭＤＲは、シクロホスファミドなどの細胞毒で治療を受けた癌患者に起こり、その薬剤に対する耐性を有するようになった後、更にその他の様々な細胞毒に対しても耐性を有するようになる。ＧＳＴレベルの上昇は、これらの薬剤耐性癌に関係し、薬剤に応答してＧＳＴレベルが上昇した後、ＧＳＴによって触媒されたＧＳＨ抱合反応によりその薬剤が不活化されると考えられる。次に上昇したＧＳＴレベルにより癌細胞がその他のＧＳＴと親和性を持つ細胞毒から保護される。腫瘍におけるＡ１－１のレベルの上昇は、シクロホスファミド治療によって生じた薬剤耐性に関係する（Ｄｉｒｖｅｎ　Ｈ．　Ａ．他　（１９９４）　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　５４：６２１５－６２２０）。従って、癌組織におけるＧＳＴ活性の調節は、癌患者のＭＤＲ治療に有用であろう。
【００１０】

グルタレドキシン

リボヌクレオチドがそれに対応するデオキシリボヌクレオチドへ還元されるのは、細胞増殖中、ＤＮＡ合成に必要であるが、その還元はリボヌクレオチド 二リン酸還元酵素が触媒する。グルタレドキシンはリボヌクレオチド・二リン酸還元酵素へのグルタチオン（ＧＳＨ）依存性の水素ドナーであり、活性部位コンセンサス配列－Ｃ－Ｐ－Ｙ－Ｃ－を含む。この配列は 大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ），、ワクシニアウイルス、酵母、植物、および哺乳動物細胞などの異なった生物体からのグルタレドキシンで保存されている。グルタレドキシンは、ＧＳＨ、ＮＡＤＰＨ、およびＧＳＨ－リダクターゼとの連鎖系において固有のＧＳＨ－ジスルフィドオキシドレダクターゼ（チオールトランスフェラーゼ）活性を有し、タンパク質と低分子量ジスルフィドの還元を触媒する。グルタレドキシンは、チオールレドキシンに類似の効率的なタンパク質ジスルファイド還元酵素、および特異的なＧＳＨ混合ジスルファイド還元酵素として両者の機能を持つことにより、タンパク質活性の一般的チオール酸化還元コントロールを行うと提案されている（Ｐａｄｉｌｌａ，Ｃ．Ａ．ｅｔ ａｌ（１９９６）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．３７８：６９－７３）。．

ＤＮＡ合成および細胞増殖における重要な役割に加えて、グルタレドキシンおよび他のチオプロテイン（ｔｈｉｏｐｒｏｔｅｉｎ）は酸素ラジカルや過酸化水素に対して有効な酸化防止作用を提供する（Ｓｃｈａｌｌｒｅｕｔｅｒ，Ｋ．Ｕ．ａｎｄ Ｊ．Ｍ．Ｗｏｏｄ（１９９１）Ｍｅｌａｎｏｍａ Ｒｅｓ．１：１５９－１６７）．グルタレドキシンは ｉｎ ｖｉｖｏでタンパク質のジチオレーション（ｄｅｔｈｉｏｌａｔｉｏｎ）に大きな役割を持つ主要な酵素であり、通常、ヒトの好中球に存在するデヒドロアスコルビン酸を還元する。（Ｊｕｎｇ，Ｃ．Ｈ．およびＪ．Ａ．Ｔｈｏｍａｓ（１９９６）Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．３３５：６１－７２；Ｐａｒｋ，Ｊ．Ｂ．およびＭ．Ｌｅｖｉｎｅ（１９９６）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．３１５：９３１－９３８）。

【００１１】

ペルオキシソームβ酸化酵素

細胞代謝における酸化還元反応の重要な別の例として、ミトコンドリアとペルオキシソームのベータ酸化酵素による飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の分解があり、これらの酵素は、補酵素Ａ（ＣｏＡ）活性化脂肪酸から２個の炭素のユニットを次々に除く。主要なベータ酸化経路は飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の両方を分解するが、補助経路は不飽和脂肪酸の分解に必要な付加的ステップを行う。

【００１２】

ミトコンドリアとペルオキシソームのベータ酸化経路は同様の酵素を使用するが、異なる基質特異性と機能をもつ。ミトコンドリアは短鎖、中鎖、長鎖の脂肪酸を酸化して、細胞のためのエネルギーを産生する。ミトコンドリアのベータ酸化は心筋と骨格筋の主要なエネルギー源となっている。飢餓、持久運動、及び糖尿病の場合のようにグルコースレベルが低くなった時は、肝臓でのベータ酸化がケトン体を末梢の循環へ提供する（Ｅａｔｏｎ，Ｓ．他（１９９６）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．３２０：３４５－３５７）。ペルオキシソームは短鎖、中鎖、長鎖の脂肪酸、ジカルボン脂肪酸、分岐脂肪酸、プロスタグランジン、生体異物、胆汁酸中間物を酸化する。ペルオキシソームのベータ酸化の主な役割は、毒性の脂肪親和性カルボン酸を短くしてそれらの分泌を促進させ、ミトコンドリアのベータ酸化の前に非常に長い長鎖脂肪酸を短くすることにある（Ｍａｎｎａｅｒｔｓ，Ｇ．Ｐ．及びＰ．Ｐ．Ｖａｎ Ｖｅｌｄｈｏｖｅｎ（１９９３）Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ ７５：１４７－１５８）。

【００１３】

補助ベータ酸化酵素である、２．４－ジエノイル－ＣｏＡ還元酵素は以下の反応を触媒する。

【００１４】

ｔｒａｎｓ－２，ｃｉｓ／ｔｒａｎｓ－４－ｄｉｅｎｏｙｌ－ＣｏＡ ＋ ＮＡＤＰＨ ＋ H^+ －－－＞ ｔｒａｎｓ－３－ｅｎｏｙｌ－ＣｏＡ ＋ $NADP^+$

この反応は、不飽和脂肪酸が主要なβ酸化経路に入っていく前に、不飽和脂肪酸から偶数の数の二重結合を除く（Ｋｏｉｖｕｒａｎｔａ，Ｋ．Ｔ．他（１９９４）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．３０４：７８７－７９２）。この酵素は不飽和脂肪酸から奇数の数の二重結合を除去することもある（Ｓｍｅｌａｎｄ，Ｔ．Ｅ．ら（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：６６７３－６６７７）。

【００１５】

ラットの２．４－ジエノイル－ＣｏＡ還元酵素はミトコンドリアおよびペルオキシソームの両方に存在する。（１９８１）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５６：８２５９－８２６２）。ラットのミトコンドリア酵素の二つの免疫学的に異なる型は、分子量が一方は６０ｋＤａで他方は１２０ｋＤａである（Ｈａｋｋｏｌａ，Ｅ．Ｈ．ａｎｄ Ｈｉｌｔｕｎｅｎ，Ｊ．Ｋ．（１９９３）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２１５：１９９－２０４）．。１２０ｋＤａのミトコンドリアのラット酵素は、２９アミノ酸のＮ末端リーダーペプチドが付いた３３５アミノ酸の前駆体として合成され、そのリーダーペプチドは切断されて成熟型酵素を形成する（Ｈｉｒｏｓｅ，Ａ．他（１９９０）Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ １０４９：３４６－３４９）。．ラット酵素に８３％類似したヒトのミトコンドリア酵素は１９アミノ酸のＮ末端リーダーペプチドの付いた３３５アミノ酸残基前駆体として合成される（前述のＫｏｉｖｕｒａｎｔａ）。これらのクローンされたヒトおよびラットのミトコンドリア酵素はホモ四量体として機能する（前述のＫｏｉｖｕｒａｎｔａ）。発芽酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のペルオキシソーム２．４－ジエノイル－ＣｏＡ還元酵素は全長２９５のアミノ酸であり、Ｃ末端ペルオキシソームの標識シグナルを含み、ホモニ量体として機能する（Ｃｏｅ，Ｊ．Ｇ．Ｓ．他（１９９４）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２４４：６６１－６７２；ａｎｄ Ｇｕｒｖｉｔｚ，Ａ．ら．（１９９７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２：２２１４０－２２１４７）。全ての２．４－ジエノイル－ＣｏＡ還元酵素は、相当に保存されたＮＡＤＰＨ結合部位の配列モチーフを有する。

【００１６】

主要経路ベータ酸化酵素エノイル－ＣｏＡヒドラターゼは以下の反応を触媒する。

【００１７】

２－ｔｒａｎｓ－ｅｎｏｙｌ－ＣｏＡ ＋ H_2O ＜－－－＞ ３－ｈｙｄｒｏｘｙａｃｙｌ－ＣｏＡ

この反応により飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸から生成された２－ｔｒａｎｓ－ｅｎｏｙｌ－ＣｏＡのＣ－２とＣ－３間の二重結合が水和される。（Ｅｎｇｅｌ，Ｃ．Ｋ．ら（１９９６）ＥＭＢＯ Ｊ．１５：５１３５－５１４５）。このステップは２．４－ジエノイル還元酵素によって触媒されたステップの下流にある。異なるエノイル－ＣｏＡヒドロターゼは短鎖、中鎖、長鎖の脂肪酸に作用する（前述のＥａｔｏｎ）。ミトコンドリアおよびペルオキシソームのエノイル－ＣｏＡヒドロターゼは、単機能酵素および多機能酵素複合体の一部として存在する。ヒト肝臓ミトコンドリアの短鎖エノイル－ＣｏＡヒドロターゼは、２９アミノ酸Ｎ末端リーダーペプチドの付いた２９０アミノ酸前駆体として合成される（Ｋａｎａｚａｗａ，Ｍ．ら．（１９９３）Ｅｎｚｙｍｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ ４７：９－１３；Ｊａｎｓｓｅｎ，Ｕ．ら．（１９９７）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ４０：４７０－４７５）．。ラットの短鎖エノイル－ＣｏＡヒドロターゼは、タンパク質の成熟した領域でヒト配列に８７％相同性があり、ホモ六量体として機能する。（前述のＫａｎａｚａｗａ，Ｍ、前述のＥｎｇｅｌ）。．ミトコンドリアに３種類の機能をもつタンパク質が存在し、長鎖エノイル－ＣｏＡヒドロターゼ、３ヒドロキシアシルＣｏＡ脱水素酵素、および長鎖３－ｏｘｏｔｈｉｏｌａｓｅ活性をもつ（前述のＥａｔｏｎ，）．。ヒトペルオキシソームでは、エノイル－ＣｏＡヒドラターゼ活性は、３２７アミノ酸残基の単機能酵素、および多機能酵素（二機能酵素とも知られる）の一部として両酵素に見られ、その多機能酵素は、エノイル－ＣｏＡヒドラターゼ、エノイル－ＣｏＡイソメラーゼ、および３ヒドロキシアシルＣｏＡヒドロゲナーゼ活性を有する（ＦｉｔｚＰａｔｒｉｃｋ，Ｄ．Ｒ．ら．（１９９５）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ２７：４５７－４６６；Ｈｏｅｆｌｅ

ｒ，Ｇ．ら（１９９４）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ １９：６０－６７）．。短鎖エノイル－ＣｏＡヒドラターゼ活性をもつ、３３９アミノ酸残基ヒトタンパク質は、ＡＵ－特異性ＲＮＡ結合タンパク質としても作用する（Ｎａｋａｇａｗａ，Ｊ．ら（１９９５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９２：２０５１－２０５５）。全てのエノイル－ＣｏＡヒドラターゼは、高度に保存された１７のアミノ酸残基と共に、二つの活性部位グルタミン酸残基を共有する（Ｗｕ，Ｗ．－Ｊ．ら（１９９７）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３６：２２１１－２２２０）。

【００１８】

ミトコンドリアおよびペルオキシソームベータ酸化酵素の遺伝的欠損は重症な病気と関与し、中には生後すぐに発症し、その後２～３年内に死に至らすものがある。ミトコンドリアのベータ酸化は、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損症、カルニチン欠損症、極長鎖アシルＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、中鎖アシルＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、短鎖アシルＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、電子伝達フラボプロテインおよび電子伝達フラボプロテインユビキノン酸化還元酵素欠損症、３頭酵素欠損症（ｔｒｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ）、および短鎖 ３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡ デヒドロゲナーゼ欠損症などを含んだ欠損症に関与する（Ｅａｔｏｎ，前出）。ミトコンドリアの３頭酵素（エノイル－ＣｏＡヒドロターゼを含む）欠損症の患者は長鎖エノイル－ＣｏＡヒドロターゼ活性が減少し、非ケトン症性低血糖症、乳児突然死症候群、心筋症、肝臓機能不全、および筋力低下をこうむり、若年死に至ることもある（前述のＥａｔｏｎ，）．。ミトコンドリア２．４－ジエノイルＣｏＡ還元酵素の欠損症をもつある患者には、生後すぐに低張性が見られ、飲乳が困難であり、呼吸性アシドーシスが原因で４ヶ月後に死亡した（Ｒｏｅ，Ｃ．Ｒ．ら（１９９０）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．８５：１７０３－１７０７を参照）。．

ミトコンドリアベータ酸化系の欠損は、ライ症候群に関連しており、ライ症候群は、肝機能不全、および小児で時折、ウイルス感染を伴う肝腎症候群によって特徴付けられる。ライ症候群患者は、血清に遊離脂酸のレベルが高まっていた可能性がある（Ｃｏｔｒａｎ，Ｒ．Ｓ．ら（１９９４）Ｒｏｂｂｉｎｓ Ｐａｔｈｏｌｏｇｉｃ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｄｉｓｅａｓｅ，Ｗ．Ｂ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ Ｃｏ．，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ＰＡ，８６６頁）。ミトコンドリア短鎖３－ヒドロキシアシルＣｏＡ脱水素酵素欠損症および中鎖３－ヒドロキシアシルＣｏＡ脱水素酵素欠損症を伴う患者はライ様疾患が見られる（前述のＥａｔｏｎ，Ｒ．Ｊ．ら（１９８９）Ａｍ．Ｆａｍ．Ｐｈｙｓｉｃｉａｎ ３９：２２１－２２６）。

【００１９】

ペルオキソームベータ酸化に関与する遺伝的な条件はツェルヴェーガー症候群、新生児の副腎脳白質ジストロフィー症、幼児のレフサム病、アシルＣｏＡ酸化酵素欠損症、ペルオキシソームチオラーゼ欠損症、および２頭酵素（ｂｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ）欠損症を含む（Ｓｕｚｕｋｉ，Ｙ．ら．（１９９４）Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．５４：３６－４３；前述のＨｏｅｆｌｅｒ）。．エノイル－ＣｏＡヒドラターゼを含むペルオキシソーム２頭酵素欠損症の患者は、筋弛緩、発作、精神運動欠陥、欠陥性神経移動（ｄｅｆｅｃｔｉｖｅ ｎｅｕｒｏｎａｌ ｍｉｇｒａｔｉｏｎ）をこうむり、極長鎖脂肪酸を堆積し、通常生後数年内に死亡する（Ｗａｔｋｉｎｓ，Ｐ．Ａ．ら（１９８９）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．８３：７７１－７７７を参照）。．

ペルオキソームベータ酸化作用は癌組織で正常に作用しない。腫瘍性ヒト乳上皮細胞では正常の細胞と同数のペルオキシソームを有するが、脂肪アシル－ＣｏＡオキシダーゼ活性は対照組織よりも低い（ｅｌ Ｂｏｕｈｔｏｕｒｙ，Ｆ．，ら（１９９２）Ｊ．Ｐａｔｈｏｌｌ １６６：２７－３５）。ヒトの結腸癌組織は正常結腸組織よりもペルオキシソームが少なく、正常組織よりも脂肪アシル－ＣｏＡオキシダーゼおよび２頭酵素（エノイル－ＣｏＡヒドラターゼを含む）活性が少ない（Ｃａｂｌｅ，Ｓ．，ら（１９９２）Ｖｉｒｃｈｏｗｓ Ａｒｃｈ．Ｂ Ｃｅｌｌ Ｐａｔｈｏｌ．Ｉｎｃｌ．Ｍｏｌ．Ｐａｔｈｏｌ．６２：２２１－２２６）。

【００２０】

タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、チオルレドキシンおよびグルタレドキシン

細胞には、ジスルフィド結合の形成を調整することにより、タンパク質の２次および３次構造の形成を助けるいくつかの特別な分子が含まれる。決められた比の酸化チオールと還元チオールの入ったバッファー中で、還元されたフォールドされてないタンパク質をインキュベーションすると、本来のコンフォーメーションが形成されるが、フォールディングの速度は遅く、本来のコンフォーメーションへの到達がサイズとタンパク質内のシステイン数に比例して減少する。真核細胞の小胞体や原核細胞のペリプラズム空間のような細胞内区画は、そのまわりの細胞質より酸化された状態に維持されている。これらの区画では正しいジスルフィド形成が起こり得るが、通常の細胞プロセスには不十分な速度で起こり、分泌タンパク質を合成するには不適当である。プロテイン ジスルフィド イソメラーゼ、チオレドキシン、およびグルタレドキシンは、ジスルフィド結合形成を触媒し、細胞内の酸化還元環境を調節して必要なチオール ジスルフィド交換を可能にする（Ｌｏｆｅｒ，Ｈ．（１９９５）Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２７０：２６１７８－２６１８３）。

【００２１】

これらのタンパク質のそれぞれは、いくぶん異なった機能をもつが、すべては、保存された活性部位配列を含み、真核生物と原核生物に偏在的に分布する、ジスルフィド含有酸化還元タンパク質のグループに属する。プロテインジスルフィドイソメラーゼは、真核生物の小胞体、および原核生物のペリプラズム空間に見つかる。これらは、フォールディング中のペプチド鎖のチオールを自身のジスルフィドと交換することによって機能する。対照的に、還元されたチオレドキシンとグルタレドキシンは、一般的に細胞質内に見つかり、基質タンパク質内のジスルフィドを直接還元することによって機能する。

【００２２】

これらの触媒分子は、ジスルフィド形勢を促進するだけでなく、広範囲の生理学的プロセスを調節し、関与する。例えば、チオレドキシン系は、リボヌクレオチド還元酵素の水素ドナーとして、また酸化還元コントロールによる酵素の調節因子として、機能する。チオレドキシン系は、またＮＦ－κＢ、ＡＰ－１、およびステロイド受容体のような転写因子の活性を調節する。

【００２３】

分泌型酸化還元タンパク質

酸化還元ポリペプチドは、また細胞外にも放出され、その細胞内の相同体と比較して同様な機能または異なる機能を有し得る。Ｔ細胞白血病由来因子、３Ｂ６インターロイキン－１、Ｔ－ハイブリドーマ由来（ＭＰ－６）Ｂ細胞刺激因子、および早期妊娠因子等の、いくつかのサイトカインまたは分泌性サイトカイン様因子は、チオレドキシンと同一であると報告されている（Ｈｏｌｍｇｒｅｎ，Ａ．（１９８５）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５４：２３７－２７１；Ａｂａｔｅ，Ｃ．他（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１１５７－１１６１；Ｔａｇａｙａ，Ｙ．他（１９８９）ＥＭＢＯ Ｊ．８：７５７－７６４；Ｗａｋａｓｕｇｉ，Ｈ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：８０４－８０８；Ｒｏｓｅｎ，Ａ．他（１９９５）Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．７：６２５－６３３）。刺激されたリンパ球によって分泌されたチオレドキシン（Ｙｏｄｏｉ，Ｊ．および Ｔｕｒｓｚ，Ｔ．（１９９１）Ａｄｖ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５７：３８１４１１；Ｔａｇａｙａ，Ｎ．他（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：８２８２８２８６）は、細胞成長の調節因子や免疫系での媒介体としての役割を含む細胞外作用をもつ（Ｍｉｒａｎｄａ－Ｖｉｚｕｅｔｅ，Ａ．他（１９９６）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：１９０９９－１９１０３；Ｙａｍａｕｃｈｉ，Ａ．他（１９９２）Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９：２６３－２７０）。

【００２４】

セレノプロテイン チオレドキシン還元酵素は、正常細胞と腫瘍細胞の両者において分泌

され、成長因子およびアポトーシスに関与するポリペプチドとして関与している（Ｓｏｄｅｒｂｅｒｇ，Ａ．他（２０００）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６０：２２８１２２８９）。ハムスターの卵巣細胞によって分泌される細胞外プラスミン還元酵素は、プラスミンからのアンギオスタチンの生成に関与することが示されている。この場合、プラスミンジスルフィド血ふぉウの還元が、プラスミンのタンパク質分解性切断を引き起こし、それによって脈管形成阻害剤であるアンギオスタチンを生み出す（Ｓｔａｔｈａｋｉｓ，Ｐ．他（１９９７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２：２０６４１２０６４５）。血漿での低いレベルの還元メルカプト基は、慢性関節リューマチに関連していると考えられている。これらのメルカプト基が活性作用のある酸素種（例えば、活性化された好中球によって発生する過酸化水素）を除去しないと、周囲の組織に酸化的損傷が起こり、炎症をもたらす（Ｈａｌｌ，Ｎ．Ｄ．他（１９９４）Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．Ｉｎｔ．４：３５３８）。

【００２５】

新規のヒトのグルタチオンペルオキシダーゼ、チオレドキシン、β酸化酵素、グルタレドキシンβ、および、細胞内または細胞外空間で正しい酸化的潜在能力を維持し、重要な酸化還元反応を制御することに関与するその他の分子、およびそれらをコードするポリヌクレオチドの発見により、新規の組成物を提供することで当分野の要望に応えることができる。 この新規の組成物は、細胞増殖異常、神経系疾患、および代謝疾患の疾患の診断・治療・予防において有用であり、また、分泌性酸化還元タンパク質の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の効果についての評価にも有用である。

【００２６】

（発明の概要）

本発明は、総称して「ＳＲＰ」、個別にはそれぞれ「ＳＲＰ－１」、「ＳＲＰ－２」、及び「ＳＲＰ－３」と呼ぶ分泌性酸化還元タンパク質である精製されたポリペプチドを提供する。或る実施態様において本発明は、（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ を有する群から選択したポリペプチド、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも９０％が同一である天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、（ｃ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または（ｄ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫抗原性断片を含む群から選択した実質上単離されたポリペプチドを提供する。 一実施態様では、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ を有する群から選択したアミノ酸配列を含む実質上単離されたポリペプチドを提供する。

【００２７】

また、本発明は（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、（ｃ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、および（ｄ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片からなる群から選択したポリペプチドをコードするような実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。 一実施態様では、ポリヌクレオチドはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したポリペプチドをコードする。 別の実施態様では、ポリヌクレオチドはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる群から選択される。

【００２８】

本発明は更に、（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチド、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも９０％が同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、（ｃ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、および（ｄ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫抗原性断片からなる群から選択したポリペプチドをコードするようなポリヌクレオチドと機能的に結合したプロモーター配列を有する組換えポ

リヌクレオチドを提供する。 一実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。別の実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体を提供する。

【００２９】

また、本発明は（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３を有する群から選択したアミノ酸配列、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも９０％の相同性を有する天然のアミノ酸配列、（ｃ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または（ｄ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含む実質上単離されたポリペプチドを製造する方法を提供する。 製造方法は、（ａ）組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、（ｂ）そのように発現したポリペプチドを受容する過程とを有し、組換えポリヌクレオチドはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモーター配列を有する。

【００３０】

本発明は更に、（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチド、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、（ｃ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、および（ｄ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫抗原性断片から構成される群から選択されたポリペプチドに特異結合するような実質上単離された抗体を提供する。

【００３１】

本発明は更に、（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる群から選択したポリヌクレオチド配列、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、（ｃ）（ａ）に相補的なポリヌクレオチド配列、（ｄ）（ｂ）に相補的なポリヌクレオチド配列、および（ｅ）（ａ）～（ｄ）のＲＮＡ等価物からなる群から選択された単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドは少なくとも６０の連続したヌクレオチドを有する。

本発明は更に、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。

ここで、標的ポリヌクレオチドは（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、（ｃ）（ａ）に相補的なポリヌクレオチド、（ｄ）（ｂ）に相補的なポリヌクレオチド配列、および（ｅ）（ａ）～（ｄ）のＲＮＡ等価物からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む。検出方法は、（ａ）サンプル中の標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を含む少なくとも２０の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて該サンプルをハイブリダイズする過程と、（ｂ）ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、プローブと標的ポリヌクレオチドあるいはその断片の間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、プローブは標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。一実施態様では、プローブは少なくとも６０の連続したヌクレオチドを含む。

【００３２】

本発明はまた、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。 ここで、標的ポリヌクレオチドは、（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６ からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６ からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、（ｃ）（ａ）のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、（ｄ）（ｂ）のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、お

よび（ｅ）（ａ）～（ｄ）のＲＮＡ等価物からなる群から選択された配列のポリヌクレオチドを有する。

【００３３】

検出方法は、（ａ）ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、（ｂ）標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含む。

【００３４】

本発明は更に、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とを含む成分を提供する。 有効量のポリペプチドは、（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、（ｃ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドの生物学的活性断片、および（ｄ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片からなる群れから選択される。一実施態様では、成分は ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ を有する群から選択したアミノ酸配列を含む。 更に本発明は、機能性ＳＲＰの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して成分を投与する過程を有する方法を提供する。

【００３５】

本発明はまた、（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ からなる群から選択したアミノ酸配列、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有する天然のアミノ酸配列、（ｃ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、および（ｄＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片からなる群から選択されたポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。 スクリーニング方法は、（ａ）ポリペプチドを有するサンプルを化合物に曝す過程と、（ｂ）サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的 ＳＲＰ の発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【００３６】

本発明は更に、（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、（ｃ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、および（ｄ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列のポリペプチドの免疫抗原性断片からなる群から選択されたポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。 スクリーニング方法は、（ａ）ポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、（ｂ）サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程とを含む。一実施態様で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む成分を提供する。別の実施態様では、機能的ＳＲＰの過剰発現に関連する疾患や病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して成分を投与する過程を含む方法を提供する。

【００３７】

本発明は更に、（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、（ｃ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または（ｄ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供

する。 スクリーニング方法は、（ａ）ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも１つの試験化合物に結合させる過程と、（ｂ）試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによってポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

【００３８】

この方法は、（ａ）このポリペプチドを好適な条件下で少なくとも１つの化合物と結合させるステップと、（ｂ）このポリペプチドとこの試験化合物との結合を検出して、このポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定するステップとを含む。

【００３９】

本発明は更に、（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、（ｃ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、および（ｄ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドからなる群れから選択したポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。 スクリーニング方法は、（ａ）ポリペプチドの活性が許容された条件下で、ポリペプチドを少なくとも１つの試験化合物と混合させる過程と、（ｂ）ポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、（ｃ）試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性を試験化合物の不存在下でのポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性の変化は、ポリペプチドの活性を調節する化合物であることを意味する。

【００４０】

更に本発明は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる一群から選択された配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、（ａ）この標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、（ｂ）この標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップとを含む、該スクリーニング方法を提供する。

【００４１】

本発明は更に、（ａ）核酸を含む生物学的サンプルを試験化合物で処理する過程と、（ｂ）（ｉ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、（ｉｉ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、（ｉｉｉ）（ｉ）に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、（ｉｖ）（ｉｉ）のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、（ｖ）（ｉ）～（ｉｖ）のＲＮＡ等価物からなる群から選択したポリヌクレオチドの少なくとも２０の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて、処理した生物学的サンプルの核酸をハイブリダイズする過程とを含む試験化合物の毒性の算定方法を提供する。ハイブリダイゼーションは、上記プローブと生物学的サンプル中の標的ポリヌクレオチドの間に特定のハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で発生し、上記標的ポリヌクレオチドは、（ｉ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、（ｉｉ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、（ｉｉｉ）（ｉ）のポリヌクレオチドに相補的な配列を有するポリヌクレオチド、（ｉｖ）（ｉｉ）のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、および（ｖ）（ｉ）～（ｉｖ）のＲＮＡ等価物からなる群から選択する。或いは、標的ポリヌクレオチドは、上記（ｉ）～（ｖ）からなる群から選択したポリヌクレオチド配列の断片と、（ｃ）ハイブリダイゼーション複合体の量を定量する過程と、（ｄ）処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量を、非処理の生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程を含み、処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量の差は、試験化合物の毒性を示す。

【００４２】

（発明を実施するための形態）
本発明のタンパク質、ヌクレオチド配列及び方法について説明するが、その前に、説明した特定の装置、材料及び方法に本発明が限定されるものではなく、改変し得ることを理解されたい。また、ここで使用する専門用語は特定の実施例を説明する目的で用いたものに過ぎず、特許請求の範囲にのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図したものではないことも併せて理解されたい。
【００４３】
請求の範囲及び明細書中で用いている単数形の「或る」及び「その（この）」の表記は、文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数のものを指す場合もあることに注意しなければならない。従って、例えば「或る宿主細胞」と記されている場合にはそのような宿主細胞が複数あることもあり、「或る抗体」と記されている場合には単数または複数の抗体、及び、当業者に公知の抗体の等価物等についても言及しているのである。
【００４４】
本明細書中で用いる全ての専門用語及び科学用語は、特に定義されている場合を除き、当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書で説明するものと類似あるいは同等の任意の装置、材料及び方法を用いて本発明の実施または試験を行うことができるが、ここでは好適な装置、材料、方法について説明する。本発明で言及する全ての刊行物は、刊行物中で報告されていて且つ本発明に関係があるであろう細胞、プロトコル、試薬及びベクターについて説明及び開示する目的で引用しているものである。本明細書のいかなる開示内容も、本発明が先行技術の効力によってこのような開示に対して先行する権利を与えられていないことを認めるものではない。
【００４５】
定義
用語「ＳＲＰ」は、天然、合成、半合成或いは組換え体など全ての種（特にウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマ及びヒトを含む哺乳動物）から得られる実質的に精製されたＳＲＰのアミノ酸配列を指す。
【００４６】
用語「アゴニスト」は、ＳＲＰの生物学的活性を強めたり、模倣する分子を指す。アゴニストの例として、タンパク質、核酸、糖質、小分子その他の任意の化合物や成分を挙げることができるが、これらはＳＲＰと直接相互作用することによって、或いはＳＲＰが関与する生物学的経路の構成エレメントに作用することによって、ＳＲＰの活性を調節する。
【００４７】
用語「対立遺伝子変異配列」は、ＳＲＰをコードする遺伝子の別の形を指す。対立遺伝子変異体は、核酸配列における少なくとも１の突然変異から作製し得る。 また、変異ＲＮＡまたはポリペプチドからも作製し得る。 ポリペプチドの構造または機能は、変異することもしないこともある。遺伝子は、天然の対立遺伝子変異体を全く有しないか、１個若しくは数個の天然の対立遺伝子変異体を有し得る。一般に対立遺伝子変異体を生じさせる通常の突然変異性変化は、ヌクレオチドの自然欠失、付加または置換に帰するものである。これら各変化は、単独或いは他の変化と共に、所定の配列内で１回若しくは数回生じ得る。
【００４８】
ＳＲＰをコードする「変異」核酸配列は、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換が起こっても、ＳＲＰと同じポリペプチド或いはＳＲＰの機能特性の少なくとも１つを備えるポリペプチドを指す。この定義には、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチド配列の正常な染色体の遺伝子座ではない位置での対立遺伝子変異配列との不適当或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにＳＲＰをコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な或いは検出困難な多形性を含む。コードされたタンパク質も変異され得り、サイレント変化を生じＳＲＰと機能的に等価となるアミノ酸残基の欠失、挿入、或いは置換を含み得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にＳＲＰの活性が保持される範囲で、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親

水性、及び／または両親媒性についての類似性に基づいて成され得る。例えば、負に帯電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸があり、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンがある。親水性値が近似している非荷電極性側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギンとグルタミン、セリンとスレオニンがある。親水性値が近似している非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、フェニルアラニンとチロシンがある。

【００４９】

「アミノ酸」または「アミノ酸配列」の語は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質の配列またはその断片を指し、天然または合成分子を指す。ここで、「アミノ酸配列」は天然のタンパク質分子のアミノ酸配列を指すものであり、「アミノ酸配列」及び類似の語は、アミノ酸配列を、列挙したタンパク質分子に関連する完全な本来のアミノ酸配列に限定しようとするものではない。

【００５０】

「増幅」は、核酸配列の追加複製に関連する。増幅は通常、当業者によく知られたポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術を用いて行う。

【００５１】

用語「アンタゴニスト」は、ＳＲＰの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子である。アンタゴニストは、ＳＲＰに直接相互作用するか、或いはＳＲＰが関与する生物学的経路の成分と作用して、ＳＲＰの活性を調節する抗体、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物などのタンパク質を含み得る。

【００５２】

用語「抗体」は、エピトープの決定基と結合することができる、そのままの免疫グロブリンやその断片、例えばＦａ、Ｆ（ａｂ’）２ 及びＦｖ断片を指す。ＳＲＰポリペプチドと結合する抗体は、免疫抗原として、そのままのポリペプチド、または関心のある小ペプチドを含む断片を用いて作製可能である。動物（マウス、ラット、ウサギ等）を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、ＲＮＡの翻訳、または化学合成によって得られるポリペプチドまたはオリゴペプチドに由来し得るもので、好みに応じて担体タンパク質に抱合することも可能である。通常用いられる担体であってペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びスカイガイのヘモシアニン（ＫＬＨ）等がある。結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。

【００５３】

「抗原決定基」の語は、特定の抗体と接触している分子の領域（即ちエピトープ）を指す。タンパク質またはタンパク質断片を用いて宿主動物を免疫化する場合、タンパク質の多数の領域が、抗原決定基（タンパク質の特定の領域または３次元構造）に特異結合する抗体の産生を誘導し得る。抗原決定基は、抗体への結合において無損傷抗原（即ち免疫応答を誘導するために用いられる免疫原）と競合し得る。

【００５４】

「アンチセンス」の語は、特定の核酸配列の「センス」（コーディング）鎖と塩基対を形成することが可能な任意の成分を指す。アンチセンス成分には、ＤＮＡや、ＲＮＡや、ペプチド核酸（ＰＮＡ）や、ホスホロチオ酸、メチルホスホン酸またはベンジルホスホン酸等の修飾されたバックボーン連鎖を有するオリゴヌクレオチドや、２’－メトキシエチル糖または２’－メトキシエトキシ糖等の修飾された糖類を有するオリゴヌクレオチドや、或いは５－メチルシトシン、２－デオキシウラシルまたは７－デアザ－２’－デオキシグアノシン等の修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドが含まれうる。アンチセンス分子は、化学合成または転写を含む任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、ひとたび細胞に導入されたら、細胞が形成した天然の核酸配列と塩基対を形成し、転写または翻訳を妨害する二重鎖を形成する。「負」または「マイナス」という表現は、ある参考ＤＮＡ分子のアンチセンス鎖を意味し、「正」または「プラス」という表現は同センス鎖を意味することがある。

【００５５】

「生物学的に活性」の語は、天然分子の構造的機能、調節機能または生化学的機能を有するタンパク質を指す。同様に、用語「免疫学的に活性」または「免疫原性」は、天然或いは組換え体のＳＲＰ、合成のＳＲＰまたはそれらの任意のオリゴペプチドが、適当な動物或いは細胞の特定の免疫応答を誘発して特定の抗体と結合する能力を指す。

【００５６】

「相補（的）」または「相補性」の語は、塩基対形成によってアニーリングする２つの一本鎖核酸の間の関係を指す。例えば、配列「５’Ａ－Ｇ－Ｔ３’」は、相補配列「３’Ｔ－Ｃ－Ａ５’」と対を形成する。

【００５７】

「所定のポリヌクレオチド配列を含む成分」及び「所定のアミノ酸配列を含む成分」は、所定のポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を含む広範囲の任意の成分を指す。この成分には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。ＳＲＰ若しくはＳＲＰの断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。このプローブは、凍結乾燥状態で保存可能であり、糖質などの安定化剤と結合させることが可能である。ハイブリダイゼーションにおいては、塩（例えばＮａＣｌ）、界面活性剤（例えばドデシル硫酸ナトリウム；ＳＤＳ）及びその他の構成エレメント（例えばデンハート液、脱脂粉乳、サケの精子のＤＮＡ等）を含む水溶液中にプローブを分散させることができる。

【００５８】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにＤＮＡ配列の解析を繰り返し行い、ＸＬ－ＰＣＲキット（ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ ＣＡ）を用いて５’及び／または３’の方向に伸長され、再度シークエンシングされた核酸配列、またはＧＥＬＶＩＥＷ 断片構築システム（ＧＣＧ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）またはＰｈｒａｐ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｓｅａｔｔｌｅ ＷＡ）等の断片構築用のコンピュータプログラムを用いて１つ或いはそれ以上の重複するｃＤＮＡやＥＳＴ、またはゲノムＤＮＡ断片から構築された核酸配列を指す。伸長及び構築の両方を行ってコンセンサス配列を決定する配列もある。

【００５９】

「保存的なアミノ酸置換」は、置換がなされた時に元のタンパク質の特性を殆ど損なわないと予測されるような置換、即ちタンパク質の構造と特に機能が保存され、そのような置換による大きな変化がない置換を指す。下表は、タンパク質中で元のアミノ酸と置換可能で、保存アミノ酸置換と認められるアミノ酸を示している。

【００６０】

元の残基	保存的な置換
Ala	Gly, Set
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Gln, His
Gly	Ala
His	Asn, Arg, Gln, Glu
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile. Leu, Thr

【００６１】
保存アミノ酸置換では通常、（ａ）置換領域におけるポリペプチドのバックボーン構造、例えばβシートやαヘリックス構造、（ｂ）置換部位における分子の電荷または疎水性、及び／または（ｃ）側鎖の大部分を保持する。
【００６２】
「欠失」は、結果的に１個若しくは数個のアミノ酸またはヌクレオチドが失われてなくなるようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。
【００６３】
「誘導体」の語は、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の化学修飾を指す。例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基またはアミノ基による水素の置換は、ポリヌクレオチド配列の化学修飾に含まれ得る。ポリヌクレオチド誘導体は、天然分子の生物学的または免疫学的機能を少なくとも１つは保持しているポリペプチドをコードする。ポリペプチド誘導体は、グリコシル化、ポリエチレングリコール化（ｐｅｇｙｌａｔｉｏｎ）、或いは任意の同様なプロセスであって誘導起源のポリペプチドから少なくとも１つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持しているプロセスによって、修飾されたポリペプチドである。
【００６４】
「検出可能な標識」は、測定可能な信号を発生することができ、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに共有結合または非共有結合するようなレポーター分子または酵素を指す。「示差発現」は少なくとも２つの異なったサンプルを比較することによって決められる、増加（上方調節）、あるいは減少（下方調節）、または欠損遺伝子またはタンパク発現の欠損を指す。このような比較は例えば、治療後サンプルと未治療のサンプルまたは病態のサンプルと正常サンプルの間で行われ得る。
【００６５】
用語「断片」は、ＳＲＰまたはＳＲＰをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列（ｐａｒｅｎｔ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）と同一であるがその配列より長さが

短いものを指す。断片は、画定された配列の全長から１ヌクレオチド／アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、５～１０００の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも５、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７５、１００、１５０、２５０若しくは５００の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さであり得る。断片は、分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示すような最初の２５０または５００アミノ酸（またはポリペプチドの最初の２５％または５０％）から選択された或る長さの連続したアミノ酸を有し得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施例では、配列表、表及び図面を含む明細書に裏付けされた任意の長さであってよい。

【００６６】

ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６を明確に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を含む。ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６のある断片は、例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術、またはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６を関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法に有用である。ある断片と一致するＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に測定できる。

【００６７】

ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ の断片は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６の断片によってコードされる。 ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ の断片には、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域が含まれている。 例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ の断片は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３を特異認識する抗体を産出するための免疫抗原性ペプチドとして有用である。 ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ の断片及び断片に対応するＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３ の領域の正確な長さは、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【００６８】

「完全長」ポリヌクレオチド配列とは、少なくとも１つの翻訳開始コドン（例えばメチオニン）、オープンリーディングフレーム及び翻訳終止コドンを有する配列である。「完全長」ポリヌクレオチド配列は、「完全長」ポリペプチド配列をコードする。

【００６９】

「相同性」の語は、配列類似性即ち２つ以上のポリヌクレオチド配列または２つ以上のポリペプチド配列の配列間で互換可能な配列同一性である。

【００７０】

ポリヌクレオチド配列に適用される「一致率」または「一致％」の語は、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも２つ以上のポリヌクレオチド配列間で一致する残基の割合を意味する。このようなアルゴリズムは、２配列間のアラインメントを最適化するために比較する配列において、標準化された再現性のある方法でギャップを挿入するので、２つの配列をより有意に比較できる。

【００７１】

ポリヌクレオチド配列間の一致率は、ＭＥＧＡＬＩＧＮ ｖｅｒｓｉｏｎ ３．１２ｅ配列アラインメントプログラムに組込まれているようなＣＬＵＳＴＡＬ Ｖアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる。このプログラムは、ＬＡＳＥＲＧＥＮＥ ソフトウエアパッケージ（一組の分子生物学的分析プログラム）（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｍａｄｉｓｏｎ ＷＩ）の一部である。このＣＬＵＳＴＡＬ Ｖは、Ｈｉｇｇｉｎｓ，Ｄ．Ｇ．及びＰ．Ｍ．Ｓｈａｒｐ（１９８９）ＣＡＢＩＯＳ ５：１５１－１５３、Ｈｉｇｇｉｎｓ，Ｄ．Ｇ．他（１９９２）ＣＡＢＩＯＳ ８：１８９－１９１に記載されている。ポリペプチド配列を２つ１組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ｋｔｕｐｌｅ＝２、ｇａｐ ｐｅｎａｌｔｙ＝５、ｗｉｎｄｏｗ＝４、「ｄｉａｇｏｎａｌｓ ｓａｖｅｄ」＝４と設定する。残基「重み付け」表をデフォルトとして選択する。Ｃ

ＬＵＳＴＡＬ Ｖは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。

【００７２】

或いは、米国国立バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）のＢａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ（ＢＬＡＳＴ）が一般的に用いられ、且つ、無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式を提供している（Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．ら（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０）。このアルゴリズムは、幾つかの情報源から入手可能であり、メリーランド州ベセスダにあるＮＣＢＩ及びインターネット（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ／）からも入手可能である。ＢＬＡＳＴソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「ｂｌａｓｔｎ」もその１つである。その他にも、２つのヌクレオチド配列を対で直接比較するために用いる「ＢＬＡＳＴ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」と称されるツールも利用可能である。「ＢＬＡＳＴ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」は、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｏｒｆ／ｂｌ２．ｈｔｍｌにアクセスして対話形式で利用することが可能である。「ＢＬＡＳＴ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」ツールは、ｂｌａｓｔｎ と ｂｌａｓｔｐ（後述）の両方に用いることができる。ＢＬＡＳＴプログラムは、一般的には、ギャップ及びデフォルト設定に設定された他のパラメータと共に用いる。例えば、２つのヌクレオチド配列を比較するために、デフォルトパラメータとして設定された「ＢＬＡＳＴ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」ツールＶｅｒｓｉｏｎ ２．０．１２（２０００年４月２１日）を用いてｂｌａｓｔｎを実行してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

【００７３】

Matrix: BLOSUM62
Reward for match: 1
Penalty for mismatch: -2
Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties
Gap x drop-off: 50
Expect: 10
Word Size: 11
Filter: on

【００７４】

一致率は、完全に画定された（例えば特定の配列番号で画定された）配列長さと比較して測定し得る。 或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定された配列から得られた断片（例えば少なくとも２０、３０、４０、５０、７０、１００または２００の連続したヌクレオチドの断片）の長さと比較して一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、一致率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

【００７５】

高度の相同性を示さない核酸配列が、それにもかかわらず遺伝子コードの縮重が原因で類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。この縮重を利用して核酸配列内で変化を生じさせて、全ての核酸配列が実質上同一のタンパク質をコードするような多数の核酸配列を生成し得ることを理解されたい。

ポリペプチド配列に適用される「一致率」または「一致％」の語は、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも２以上のポリペプチド配列間で一致する残基の割合を意味する。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は

通常、置換部位の電荷及び疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を（従って機能も）保存する。

【００７６】

ポリペプチド配列間の一致率は、ＭＥＧＡＬＩＧＮ ｖｅｒｓｉｏｎ ３．１２ｅ配列アラインメントプログラムに組込まれているようなＣＬＵＳＴＡＬ Ｖアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる（既に説明したのでそれを参照されたい）。ＣＬＵＳＴＡＬ Ｖを用いて、ポリペプチド配列を２つ１組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ｋｔｕｐｌｅ＝１、ｇａｐ ｐｅｎａｌｔｙ＝３、ｗｉｎｄｏｗ＝５、「ｄｉａｇｏｎａｌｓ ｓａｖｅｄ」＝５と設定する。デフォルトの残基重み付け表としてＰＡＭ２５０マトリクスを選択する。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、ＣＬＵＳＴＡＬ Ｖは、アラインメントされたポリペプチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。

【００７７】

或いは、ＮＣＢＩ ＢＬＡＳＴソフトウェア一式を用いてもよい。例えば、２つのポリペプチド配列を対で比較をする場合、ある者は、デフォルトパラメータで設定された「ＢＬＡＳＴ ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」ツールＶｅｒｓｉｏｎ ２．０．１２（Ａｐｒ－２１－２０００）でｂｌａｓｔｐを使用するであろう。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

【００７８】

Matrix: BLOSUM62
Open Gap: 11 and Extension Gap: 1 penalties
Gap x drop-off: 50
Expect: 10
Word Size: 3
Filter: on

【００７９】

一致率は、完全に画定された（例えば特定の配列番号で画定された）ポリペプチド配列の長さと比較して測定し得る。 一致率は、配列或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定されたポリペプチド配列から得られた断片（例えば少なくとも１５、２０、３０、４０、５０、７０または１５０の連続した残基の断片）の長さと比較して一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、或る長さであってその長さに対して一致率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

【００８０】

「ヒト人工染色体（ＨＡＣ）」は、約６ｋｂ（キロベース）～１０Ｍｂのサイズの ＤＮＡ配列を含み得る、染色体の複製、分離及び維持に必要な全てのエレメントを含む直鎖状の小染色体である。

【００８１】

「ヒト化抗体」の語は、非抗体結合領域におけるアミノ酸配列はヒト抗体により近づくように変異させた抗体分子であって、本来の結合能力はそのまま保持しているような抗体分子を指す。

【００８２】

「ハイブリダイゼーション」は、所定のハイブリダイゼーション条件下で塩基対を形成することによって、一本鎖ポリヌクレオチドが相補的鎖とアニーリングするプロセスを指す。特異的ハイブリダイゼーションは、２つの核酸配列が高い相同性を共有することを示すものである。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、更にストリンジェントな条件では、非特異結合（即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合

）が減少する。核酸配列のアニーリングに対する許容条件は、本技術分野における当業者が慣例的に決定する。 許容条件はハイブリダイゼーション実験の間は一定でよいが、洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異性も得るように実験中に変更することができる。アニーリングが許容される条件は、例えば、温度が６８℃で、約６×ＳＳＣ、約１％（ｗ／ｖ）のＳＤＳ、並びに約１００μｇ／ｍｌのせん断して変性したサケ精子ＤＮＡが含まれる。

【００８３】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは或る程度、洗浄ステップを実行する温度を基準にして表すことができる。このような洗浄温度は通常、所定のイオン強度及びｐＨにおける特定の配列の融点（Ｔｍ）より約５～２０℃低くなるように選択する。このＴｍは、所定のイオン強度及びｐＨの下で、完全に一致するプローブに標的配列の５０％がハイブリダイズする温度である。T_m を計算する式及び核酸のハイブリダイゼーション条件はよく知られており、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ら （１９８９） Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第２版，１－３巻，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ ＮＹに記載されており、特に２巻の９章を参照されたい。

【００８４】

本発明のポリヌクレオチド間の高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションでは、約０．２ｘ ＳＳＣ及び約０．１％のＳＤＳの存在の下、約６８℃で１時間の洗浄過程を含む。別法では、６５℃、６０℃、５５℃、４２℃の温度で行う。ＳＳＣ濃度は、約０．１％のＳＤＳ存在下で、約０．１～２×ＳＳＣの範囲で変化し得る。通常は、ブロッキング剤を用いて非特異ハイブリダイゼーションを阻止する。このような遮断剤には、例えば、約１００～２００μｇ／ｍｌの変性サケ精子ＤＮＡがある。特定条件下で、例えばＲＮＡとＤＮＡのハイブリダイゼーションに有機溶剤、例えば約３５～５０％ｖ／ｖの濃度のホルムアミドを用いることもできる。洗浄条件の有用なバリエーションは、当業者には自明であろう。 ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、ヌクレオチド間の進化的な類似性を示唆し得る。このような類似性は、ヌクレオチド及びヌクレオチドにコードされるポリペプチドに対する類似の役割を強く示唆している。

【００８５】

「ハイブリダイゼーション複合体」の語は、相補的塩基対間の水素結合の形成力によって２つの核酸配列間に形成された複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は、溶解状態で形成し得る（C_0t または R_0t 解析等）。 或いは、一方の核酸配列が溶解状態で存在し、もう一方の核酸配列が固体支持体（例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラススライド、或いは他の適切な基質であって細胞若しくはその核酸が固定される基質）に固定されているような２つの核酸配列間に形成され得る。

【００８６】

「挿入」及び「付加」の語は、１個若しくは数個のアミノ酸残基またはヌクレオチド配列を各々付加するようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。

【００８７】

「免疫応答」は、炎症、外傷、免疫異常症、伝染性疾患または遺伝性疾患に関連する症状を指し得る。 これらの症状は、細胞及び全身の防御系に作用し得る種々の因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、その他のシグナル伝達分子の発現によって特徴づけることができる。

【００８８】

用語「免疫原性断片」は、例えば哺乳動物などの生きている動物に導入すると、免疫反応を引き起こすＳＲＰのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を指す。用語「免疫原性断片」はまた、本明細書で開示するまたは当分野で周知のあらゆる抗体生産方法に有用なＳＲＰのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を含む。

【００８９】

「マイクロアレイ」の語は、基質上の複数のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその

他の化合物の構成を指す。

【００９０】

「エレメント」または「アレイエレメント」の語は、マイクロアレイ上に定義された固有の位置にあるハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド、ポリペプチドその他の化合物を指す。

用語「調節」は、ＳＲＰの活性の変化を指す。例えば、調節によって、ＳＲＰのタンパク質活性、或いは結合特性、またはその他の生物学的特性、機能的特性或いは免疫学的特性の変化が起こる。

【００９１】

「核酸」及び「核酸配列」の語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたはこれらの断片を指す。「核酸」及び「核酸配列」の語は、ゲノム起源または合成起源のＤＮＡまたはＲＮＡであって一本鎖または二本鎖であるか或いはセンス鎖またはアンチセンス鎖を表し得るようなＤＮＡまたはＲＮＡや、ペプチド核酸（ＰＮＡ）や、任意のＤＮＡ様またはＲＮＡ様物質を指すこともある。

【００９２】

「機能的に結合した」は、第１核酸配列が第２核酸配列と機能的な関係があるように配置された状態を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合には、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に結合している。機能的に結合したＤＮＡ配列は非常に近接するか、或いは連続し得る。そして、２つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合は、同一のリーディングフレーム内にある。

【００９３】

「ペプチド核酸」（ＰＮＡ）は、アンチセンス分子または抗遺伝子物質であって、リジンを末端とするアミノ酸残基のペプチドバックボーンに結合した、少なくとも約５ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドからなるものを指す。末端のリジンは、成分に溶解性を与える。ＰＮＡは、相補的一本鎖ＤＮＡまたはＲＮＡに優先的に結合して転写の拡張を停止するものであり、ポリエチレングリコール化して細胞におけるＰＮＡの寿命を延長し得る。

【００９４】

ＳＲＰの「翻訳後修飾」には、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、蛋白分解性切断及びその他の当分野で既知の修飾を含まれ得る。 これらのプロセスは、合成或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、ＳＲＰの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なり得る。

【００９５】

「プローブ」とは、同一配列或いは対立遺伝子核酸配列、関連する核酸配列の検出に用いる、ＳＲＰやそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードする核酸配列のことである。プローブは、単離されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであって、検出可能な標識またはレポーター分子に結合したものである。典型的な標識には、放射性アイソトープ、リガンド、化学発光試薬及び酵素がある。「プライマー」は、短い核酸、通常はＤＮＡオリゴヌクレオチドであり、相補的塩基対を形成することで標的ポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。プライマーは次に、ＤＮＡポリメラーゼ酵素によって標的ＤＮＡ鎖に延在し得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）による核酸配列の増幅（及び同定）に用い得る。

【００９６】

本発明に用いるようなプローブ及びプライマーは通常、既知の配列の少なくとも１５の連続したヌクレオチドを含んでいる。特異性を高めるために長めのプローブ及びプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００または１５０の連続したヌクレオチドからなるようなプローブ及びプライマーを用いてもよい。これよりもかなり長いプローブ及びプライマーもある。 表、図面及び配列リストを含む本明細書に裏付けされた任意の長さのヌクレオチドを用いることができるものと理解されたい。

【００９７】
プローブ及びプライマーの調製及び使用方法については、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．ら（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第２版，１－３巻，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ ＮＹ、Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ら、（１９８７）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｉ．Ａｓｓｏｃ．＆Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ、Ｉｎｎｉｓら（１９９０）ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ ＣＡ等を参照されたい。ＰＣＲプライマー対は、その目的のためのコンピュータプログラム、例えばＰｒｉｍｅｒ（Ｖｅｒｓｉｏｎ ０．５，１９９１，Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ ＭＡ）を用いるなどして既知の配列から得ることができる。

【００９８】
プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野でよく知られているソフトウェアを用いて行う。例えばＯＬＩＧＯ ４．０６ソフトウェアは、各１００ヌクレオチドまでのＰＣＲプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチド及び最大５，０００までの大きめのポリヌクレオチドであって３２キロベースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得たものを分析するのにも有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、ＰｒｉｍＯＵプライマー選択プログラム（テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能）は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、従ってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Ｐｒｉｍｅｒ３プライマー選択プログラム（マサチューセッツ州ケンブリッジのＷｈｉｔｅｈｅａｄ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ／ＭＩＴゲノム研究センターから一般向けに入手可能）ではユーザーが「ミスプライミング・ライブラリ」をインプットすることができ、ここでプライマー結合部位として避けたい配列はユーザーが指定する。Ｐｒｉｍｅｒ３は特に、マイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドの選択に有用である。（後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、各自のソースから得てユーザー固有のニーズを満たすように変更してもよい。）ＰｒｉｍｅｒＧｅｎプログラム（英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクトーリソースセンターから一般向けに入手可能）は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計し、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域または最小保存領域の何れかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。従って、このプログラムは、固有な、および保存されたオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばＰＣＲまたはシークエンシングプライマーとして、マイクロアレイエレメントとして、或いは核酸のサンプルにおいて完全または部分的相補的ポリヌクレオチドを同定する特異プローブとして有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記の方法に限定されるものではない。

【００９９】
「組換え核酸」は天然配列ではない配列であるか或いは人為的に組み合わせなければ離隔しているような配列の２以上のセグメントを人為的に組み合わせて産出した配列を有する配列である。この人為的組合せはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばのＳａｍｂｒｏｏｋらの文献（前出）に記載されているような遺伝子工学的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部を付加、置換または欠失した変異核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモーター配列に機能的に結合した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、ベクターの不可欠なエレメントであって例えばある細胞を形質転換するために用いられるようなものであり得る。

【０１００】
或いはこのような組換え核酸は、ウイルスベクターの不可欠なエレメントであって例えばワクシニアウイルスに基づくものであり得る。 ワクシニアウイルスは哺乳動物のワクチン接種に用いることが可能で、その際に組換え核酸が発現して哺乳動物の防御免疫応答を誘導する。
【０１０１】
「調節エレメント」は、通常は遺伝子の未翻訳領域に由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロン及び５’及び３’の未翻訳領域（ＵＴＲ）を含む。調節エレメントは、転写、翻訳またはＲＮＡ安定性を調節する宿主またはウイルスタンパク質と相互作用する。
【０１０２】
「レポーター分子」とは、核酸、アミノ酸または抗体を標識するのに用いられる化学的または生化学的成分である。レポーター分子には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、補助因子、阻害因子、磁気粒子及びその他の当分野で既知の成分がある。
【０１０３】
ＤＮＡ配列に関する「ＲＮＡ等価物」は、窒素塩基チミンが全てウラシルに置換されていることと、糖のバックボーンがデオキシリボースではなくリボースから構成されていることを除いて、参照ＤＮＡ配列と同一のヌクレオチド線形配列から構成されている。
【０１０４】
「サンプル」の語は、その最も広い意味で用いられる。ＳＲＰ、ＳＲＰをコードする核酸、またはその断片を含むと推定されるサンプルは、体液と、細胞からの抽出物や細胞から単離された染色体や細胞内小器官、膜と、細胞と、溶液中に存在するまたは基板に固定されたゲノムＤＮＡ、ＲＮＡ、ｃＤＮＡと、組織と、組織プリント等を含み得る。
【０１０５】
「特異結合」または「特異的に結合する」の語は、タンパク質またはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、任意の天然成分または合成結合成分との間の相互作用を指す。この相互作用は、タンパク質の特定の構造（例えば抗原決定基即ちエピトープ）であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存している。例えば、抗体がエピトープ「Ａ」に対して特異的である場合、標識された遊離したＡ及びその抗体を含む反応において、エピトープＡ（つまり遊離し、標識されていないＡ）を含むポリペプチドの存在が、抗体に結合している標識されたＡの量を低減させる。
【０１０６】
「実質上精製された」の語は、自然環境から取り除かれ、或いは単離または分離された核酸またはアミノ酸配列であって、自然に会合するその他の構成エレメントの少なくとも約６０％、好ましくは少なくとも約７５％、最も好ましいのは少なくとも約９０％が遊離しているものを指す。
【０１０７】
「置換」は、１個若しくは数個のアミノ酸またはヌクレオチドを各々別のアミノ酸またはヌクレオチドに置換することを意味する。
【０１０８】
「基質」は、任意の好適な固体または半固体の支持体を指すものであって、膜、フィルタ、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁性または非磁性ビーズ、ゲル、管、プレート、ポリマー、微細粒子、毛管が含まれる。基質は、凹み、溝、ピン、チャネル、孔等、様々な表面形態を有することができ、基質表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。
【０１０９】
「転写イメージ」は、所与の時間、条件での固有の細胞タイプまたは組織による遺伝子発現の集合的パターンを指す。
【０１１０】

「形質転換」は、外来性のＤＮＡが受入細胞に入り込むプロセスを表す。形質転換は、本技術分野で知られている種々の方法に従って自然条件または人工条件下で生じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核または真核宿主細胞に挿入する任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。 限定するものではないが形質転換方法には、バクテリオファージまたはウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法がある。「形質転換された」細胞には、導入されたＤＮＡが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主染色体の一部として複製可能である安定的に形質転換された細胞が含まれる。 さらに、限られた時間に一時的に導入ＤＮＡ若しくは導入ＲＮＡを発現する細胞も含まれる。

【０１１１】

ここで用いる「遺伝形質転換体」とは任意の有機体であり、限定するものではないが動植物を含み、有機体の１個若しくは数個の細胞が、ヒトの関与によって、例えば本技術分野でよく知られている形質転換技術によって導入された異種核酸を有する。 核酸の細胞への導入は、直接または間接的に、細胞の前駆物質に導入することによって、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によって或いは組換えウイルスの導入によって行う。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種或いはｉｎ ｖｉｔｒｏ受精を指すものではなく、組換えＤＮＡ分子の導入を指すものである。本発明に基づいて予期される遺伝形質転換体には、バクテリア、シアノバクテリア、真菌及び動植物がある。本発明の単離されたＤＮＡは、本技術分野で知られている方法、例えば感染、形質移入、形質転換またはトランス接合によって宿主に導入することができる。本発明のＤＮＡをこのような有機体に移入する技術はよく知られており、Ｓａｍｂｒｏｏｋ 等の参考文献に記載されている。

【０１１２】

特定の核酸配列の「変異体」は、核酸配列１本全部の長さに対して特定の核酸配列と少なくとも４０％の相同性を有する核酸配列であると定義する。 その際、デフォルトパラメータに設定した「ＢＬＡＳＴ ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」ツールＶｅｒｓｉｏｎ ２．０．９（１９９９年５月７日）を用いてｂｌａｓｔｎを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上の相同性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体（前述）、「スプライス」変異体、「種」変異体または「多形性」変異体として説明し得る。スプライス変異体は参照分子とかなりの相同性を有し得るが、ｍＲＮＡプロセッシング中のエキソンの交互スプライシングによって通常多数の或いは僅かな数のポリヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメインを有するか或いは参照分子に存在するドメインが欠落していることがある。種変異体は、種相互に異なるポリヌクレオチド配列である。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互にかなりのアミノ酸相同性を有する。多形性変異体は、与えられた種の個体間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。また、多形性変異体は、１つのヌクレオチド塩基によってポリヌクレオチド配列が変化する「１塩基性ヌクレオチド多形性」（ＳＮＰ）を含み得る。ＳＮＰの存在は、例えば特定の個体群、病状または病状性向を示し得る。

【０１１３】

特定のポリペプチド配列の「変異体」は、ポリペプチド配列の１本の長さ全体で特定のポリペプチド配列に対して少なくとも４０％の相同性を有するポリペプチド配列として画定される。 ここで、デフォルトパラメータに設定した「ＢＬＡＳＴ ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」ツールＶｅｒｓｉｏｎ ２．０．９（１９９９年５月７日）を用いてｂｌａｓｔｐを実行する。このようなポリペプチド対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上の配列同一性を示し得る。

【０１１４】

発明

本発明は、新規のヒトの分泌性酸化還元タンパク質（ＳＲＰ） 及びＳＲＰをコードするポリヌクレオチドの発見に基づき、これらの組成物を利用した細胞増殖異常、自己免疫／炎症性の疾患の診断、治療、及び予防に関する。

【０１１５】

表１は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の命名の概略である。各ポリヌクレオチド及びその対応するポリペプチドは、１つのＩｎｃｙｔｅプロジェクト識別番号（ＩｎｃｙｔｅプロジェクトＩＤ）と相関する。各ポリペプチド配列は、ポリペプチド配列識別番号（ポリペプチドＳＥＱ ＩＤ ＮＯ）とＩｎｃｙｔｅポリペプチド配列番号（ＩｎｃｙｔｅポリペプチドＩＤ）によって表示した。各ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド配列識別番号（ポリヌクレオチドＳＥＱ ＩＤ ＮＯ）とＩｎｃｙｔｅポリヌクレオチド配列番号（ＩｎｃｙｔｅポリヌクレオチドＩＤ）によって表示した。

【０１１６】

表２は、ＧｅｎＢａｎｋタンパク質（ｇｅｎｐｅｐｔ）データベースに対するＢＬＡＳＴ分析によって同定されたような、本発明のポリペプチドとの相同性を有する配列を示している。列１と２は発明したポリペプチドをポリペプチド配列識別番号（ポリペプチドＳＥＱ ＩＤ ＮＯ）と対応するＩｎｃｙｔｅポリペプチド配列番号（ＩｎｃｙｔｅポリペプチドＩＤ）によって表示した。列３は、ＧｅｎＢａｎｋの最も近い相同体のＧｅｎＢａｎｋの識別番号（Ｇｅｎｂａｎｋ ＩＤ ＮＯ ：）を示す。列４は、各ポリペプチドとそのＧｅｎＢａｎｋ相同体との間の一致を表す確率スコアを示す。列５は、ＧｅｎＢａｎｋ相同体のアノテーションを示し、更に該当箇所には適当な引用文も示す。 これらを引用することを以って本明細書の一部とする。

【０１１７】

表３は、本発明のポリペプチドの様々な構造的特徴を示す。列１と２は発明した個々のポリペプチドをポリペプチド配列識別番号（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ）と対応するＩｎｃｙｔｅポリペプチド配列番号（ＩｎｃｙｔｅポリペプチドＩＤ）を示す。列３は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列４および列５はそれぞれ、ＧＣＧ配列分析ソフトウェアパッケージのＭＯＴＩＦＳプログラム（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｍａｄｉｓｏｎ ＷＩ）によって決定された、リン酸化およびグリコシル化の可能性のある部位を示す。列６は、シグネチャ（ｓｉｇｎａｔｕｒｅ）配列、ドメイン、およびモチーフを含むアミノ酸残基を示す。列７は、タンパク質の構造／機能の分析のための分析方法を示し、該当箇所にはさらに分析方法に利用した検索可能なデータベースを示す。表２及び３は共に、本発明の各々のポリペプチドの特性を要約しており、それら特性が請求の範囲に記載されたポリペプチドが分泌性酸化還元タンパク質であることを確立している。例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２は線虫（Ｃａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ ｅｌｅｇａｎｓ）グリセリン－３－リン酸塩デヒドロゲナーゼ（ＧｅｎＢａｎｋ ＩＤ ｇ７３３１８８８）と５４％の同一性を有することがＢａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ （ＢＬＡＳＴ）によって示された。（表２参照）ＢＬＡＳＴ確率スコアは１．５ｅ－１２３であり、これは観測されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。ＢＬＩＭＰＳ 解析から得られたデータによって、さらにＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２がグリセリン－３－リン酸塩デヒドロゲナーゼであることが裏付けられた。ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３は同様の方法で解析してアノテーションを付けた。ＳＰＳｃａｎ分析に基づくと、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３はすべてシグナルペプチドを含んでいる。ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－３の解析のためのアルゴリズムおよびパラメータを表７に記載する。

【０１１８】

表４に示すように、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列は、ｃＤＮＡ配列またはゲノムＤＮＡ由来のコード（エキソン）配列を用いて、或いはこれら２種類の配列を任意に組み合わせて構築した。列１と２は本発明のポリヌクレオチドをポリヌクレオチド配列識別番号（Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ）と対応するＩｎｃｙｔｅポリヌクレオチド コンセンサス配列番号（ＩｎｃｙｔｅポリヌクレオチドＩＤ）を示す。列３

は、各ポリヌクレオチド配列の長さ（塩基対単位）を示す。列４は、例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６を同定するため、或いはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６と関連するポリヌクレオチド配列とを区別するためのハイブリダイゼーションまたは増幅技術に有用なポリヌクレオチド配列の断片を示す。列５はｃＤＮＡ配列、ゲノムＤＮＡから予想されたコード配列（エキソン）及び／またはｃＤＮＡ及びゲノムＤＮＡを共に有する配列集合に対応する識別番号を示している。これらの配列は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列を構築するのに用いた。表４の列６および列７はそれぞれ、列５の配列に対応するｃＤＮＡ配列およびゲノム配列の開始ヌクレオチド（５’）位置および終了ヌクレオチド（３’）位置を示す。

【０１１９】

表４の列５の識別番号は、特に例えばＩｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡとそれに対応するｃＤＮＡライブラリを指す場合もある。例えば、６７０９４０８Ｆ８ はＩｎｃｙｔｅｃＤＮＡ配列の識別番号であり、ＨＥＡＡＤＩＲ０１ はそれが由来するｃＤＮＡライブラリの識別番号である。ｃＤＮＡライブラリが示されていないＩｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡは、プールされているｃＤＮＡライブラリ（例えば、７０５１８５２３Ｄ１）に由来する。或いは列５の識別番号は、完全長ポリヌクレオチド配列のアセンブリに寄与するＧｅｎＢａｎｋ ｃＤＮＡまたはＥＳＴを指す場合もある。

【０１２０】

場合によっては、最終コンセンサスポリヌクレオチド配列を確認するための列５に示すような配列の適用範囲と重複するＩｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡの適用範囲が得られたが、関連するＩｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ識別番号は示さなかった。

【０１２１】

表５は、Ｉｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ配列を用いて構築された完全長ポリヌクレオチド配列のための代表的なｃＤＮＡライブラリを示している。代表的なｃＤＮＡライブラリは、上記のポリヌクレオチド配列を構築及び確認するために用いられるＩｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ配列によって最も頻繁に表されるＩｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡライブラリである。ｃＤＮＡライブラリを作製するために用いた組織及びベクターを表５に示し、表６で説明している。

【０１２２】

本発明はまた、ＳＲＰの変異体も含む。好適なＳＲＰの変異体は、ＳＲＰの機能的或いは構造的特徴の少なくとも一つを有し、かつＳＲＰアミノ酸配列に対して少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％のアミノ酸配列同一性、更には少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性を有する。

【０１２３】

本発明はまた、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドを提供する。特定の実施例において、本発明は、ＳＲＰをコードするＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を提供する。配列表に示したＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６のポリヌクレオチド配列は、窒素系塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の背骨がデオキシリボースではなくリボースからなる等価ＲＮＡ配列を含む。

【０１２４】

本発明には、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列も含まれる。詳細には、このようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも７０％のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも８５％のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも９５％ものポリヌクレオチド配列同一性を有する。本発明の或る実施態様では、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる群から選択された核酸配列と少なくとも約７０％、或いは少なくとも約８５％、または少なくとも約９５％もの一致率を有するようなＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。上記の任意のポリヌクレオチドの変異体は、ＳＲＰの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも１つ有するアミノ酸配列をコードし得る。

【０１２５】

遺伝暗号の縮重により作り出され得るＳＲＰをコードする種々のポリヌクレオチド配列には、既知の自然発生する任意の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最小の類似性しか有しないものも含まれることを、当業者は理解するであろう。したがって本発明には、可能コドン選択に基づく組合せの選択によって産出し得るようなありとあらゆる可能性のあるポリヌクレオチド配列変異体を網羅し得る。これらの組み合わせは、天然のＳＲＰのポリヌクレオチド配列に適用される標準的なトリプレット遺伝暗号を基に作られ、全ての変異が明確に開示されていると考慮する。

【０１２６】

ＳＲＰをコードするヌクレオチド配列及びその変異配列は一般に、好適に選択されたストリンジェントな条件下で、天然のＳＲＰのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、非天然のコドンを含めるなどの実質的に異なった使い方のコドンを有するＳＲＰ或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作ることは有利となり得る。宿主が特定のコドンを利用する頻度に基づいて、特定の真核又は原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようにコドンを選択することが可能である。コードされたアミノ酸配列を変えないで、ＳＲＰ 及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に変更する別の理由は、天然の配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備えるＲＮＡ転写物を作ることにある。

【０１２７】

本発明はまた、ＳＲＰ及びその誘導体をコードするＳＲＰ配列またはそれらの断片を完全に合成化学によって作り出すことも含む。作製後にこの合成配列を、当分野で良く知られた試薬を用いて、種々の入手可能な発現ベクター及び細胞系の何れの中にも挿入可能である。更に、合成化学を用いてＳＲＰＥまたはその任意の断片をコードする配列に突然変異を誘導し得る。

【０１２８】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６ 及びそれらの断片とハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列が含まれる （例えば、Ｗａｈｌ，Ｇ．Ｍ．及びＳ．Ｌ．Ｂｅｒｇｅｒ（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５２：３９９－４０７；Ｋｉｍｍｅｌ，Ａ．Ｒ．（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５２：５０７－５１１．）。アニーリング及び洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載されている。

【０１２９】

ＤＮＡシークエンシングの方法は当分野でよく知られており、本発明の何れの実施例もＤＮＡシークエンシング方法を用いて実施可能である。ＤＮＡシークエンシング方法には酵素を用いることができ、例えばＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片、ＳＥＱＵＥＮＡＳＥ（ＵＳ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ，Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ ＯＨ）、Ｔａｑポリメラーゼ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）、熱安定性Ｔ７ポリメラーゼ（Ａｍｅｒｓｈａｍ，Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ ＮＪ）を用いることができる。 或いは、例えばＥＬＯＮＧＡＳＥ増幅システム（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ ＭＤ）において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼを併用することができる。好適には、ＭＩＣＲＯＬＡＢ２２００液体転移システム（Ｈａｍｉｌｔｏｎ，Ｒｅｎｏ，ＮＶ）、ＰＴＣ２００サーマルサイクラー（ＭＪ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｗａｔｅｒｔｏｗｎ ＭＡ）及びＡＢＩ ＣＡＴＡＬＹＳＴ ８００サーマルサイクラー（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）等の装置を用いて配列の調製を自動化する。次に、ＡＢＩ ３７３ 或いは ３７７ ＤＮＡシークエンシングシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）、ＭＥＧＡＢＡＣＥ １０００ ＤＮＡシークエンシングシステム（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｙｎａｍｉｃｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ ＣＡ）または当分野でよく知られている他の方法を用いてシークエンシングを行う。 結果として得られた配列を当分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する。（Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．（１９９７）Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃ

ｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ, Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ, ｕｎｉｔ ７．７、Ｍｅｙｅｒｓ, Ｒ．Ａ．（１９９５）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ, Ｗｉｌｅｙ ＶＣＨ, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ, ｐｐ．８５６－８５３．等を参照）。

【０１３０】

当分野で周知のＰＣＲ法をベースにした種々の方法で、部分的なヌクレオチド配列を利用して、ＳＲＰをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節エレメントなどの上流にある配列を検出する。例えば、使用し得る方法の１つである制限部位ＰＣＲ法は、ユニバーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムＤＮＡから未知の配列を増幅する方法である（Ｓａｒｋａｒ, Ｇ．（１９９３）ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌｉｃ．２：３１８３２２．） 別の方法に逆ＰＣＲ法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列を含む制限酵素断片から得る（Ｔｒｉｇｌｉａ, Ｔ．他（１９８８）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：８１８６．） 第３の方法としてキャプチャＰＣＲ法があり、これはヒト及び酵母菌人工染色体ＤＮＡの既知の配列に隣接するＤＮＡ断片をＰＣＲ増幅する方法に関与している。（Ｌａｇｅｒｓｔｒｏｍ, Ｍ．他（１９９１）ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌｉｃ．１：１１１１１９．） この方法では、ＰＣＲを行う前に複数の制限酵素の消化及び連結反応を用いて未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、未知の配列を検索するために用い得る別の方法については当分野で知られている。（Ｐａｒｋｅｒ, Ｊ．Ｄ．ら（１９９１）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９：３０５５３０６０）。更に、ＰＣＲ、ネステッドプライマー及びＰｒｏｍｏｔｅｒＦｉｎｄｅｒ（商標）ライブラリ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ, Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ ＣＡ）を用いてゲノムＤＮＡをウォーキングすることができる。この手順は、ライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン／エキソン接合部を見付けるのに有用である。全てのＰＣＲベースの方法に対して、市販されているソフトウェア、例えばＯＬＩＧＯ ４．０６プライマー分析ソフトウェア（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ, Ｐｌｙｍｏｕｔｈ ＭＮ）或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約２２～３０ヌクレオチド、ＧＣ含有率が約５０％以上、温度約６８℃～７２℃で鋳型に対してアニーリングするようにプライマーを設計し得る。

【０１３１】

完全長ｃＤＮＡをスクリーニングする際は、より大きなｃＤＮＡを含むようにサイズ選択されたライブラリを用いるのが好ましい。更に、ランダムプライマーのライブラリは、しばしば遺伝子の５’領域を有する配列を含み、オリゴｄ（Ｔ）ライブラリが完全長ｃＤＮＡを作製できない状況に対して好適である。ゲノムライブラリは、５’非転写調節領域への配列の伸長に有用であろう。

【０１３２】

市販されているキャピラリー電気泳動システムを用いて、シークエンシングまたはＰＣＲ産物のサイズを分析し、またはそのヌクレオチド配列を確認することができる。具体的には、キャピラリーシークエンシングは、電気泳動による分離のための流動性ポリマーと、４つの異なるヌクレオチドに特異的であるような、レーザで活性化される蛍光色素と、放出された波長の検出に利用するＣＣＤカメラとを有し得る。出力／光の強度は、適切なソフトウェア（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社のＧＥＮＯＴＹＰＥＲ、ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＮＡＶＩＧＡＴＯＲ等）を用いて電気信号に変換し得る。 サンプルのロードからコンピュータ分析及び電子データ表示までの全プロセスがコンピュータ制御可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しないようなＤＮＡ小断片のシークエンシングに特に適している。

【０１３３】

本発明の別の実施例では、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を組換えＤＮＡ分子にクローニングして、適切な宿主細胞内にＳＲＰ、その断片または機能的

等価物を発現させることが可能である。遺伝暗号固有の宿重に起因して、実質的同一或いは機能的等価のアミノ酸配列をコードするような別のＤＮＡ配列を作製してＳＲＰの発現に利用し得る。

【０１３４】

種々の目的でＳＲＰをコードする配列を変えるために、当分野で一般的に知られている方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列を組換えることができる。 この目的には、遺伝子産物のクローン化、プロセッシング及び／または発現の調節が含まれるが、これらに限定されるものではない。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテーション及びＰＣＲ再アセンブリによるＤＮＡシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組み換えることが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド仲介特定部位突然変異誘導を利用して、新規な制限部位の生成、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成等を行う突然変異を導入し得る。

【０１３５】

本発明のヌクレオチドは、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲＢＲＥＥＤＩＮＧ（Ｍａｘｙｇｅｎ Ｉｎｃ．，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ ＣＡ；米国特許第５，８３７，４５８号；Ｃｈａｎｇ，Ｃ．－Ｃ．他（１９９９）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１７：７９３－７９７；Ｃｈｒｉｓｔｉａｎｓ，Ｆ．Ｃ．他（１９９９）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１７：２５９－２６４；Ｃｒａｍｅｒｉ，Ａ．他（１９９６）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１４：３１５－３１９）などのＤＮＡシャフリング技術の対象となり得るもので、生物学的または酵素的な活性、或いは他の分子や化合物と結合する能力などのＳＲＰの生物学的特性を変更或いは改良することができる。ＤＮＡシャッフリングは、遺伝子断片のＰＣＲ仲介再組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを生成するプロセスである。ライブラリはその後、その遺伝子変異体を所望の特性に同定するような選択またはスクリーニングにかける。次にこれらの好適な変異体をプールし、更に反復してＤＮＡシャッフリング及び選択／スクリーニングを行ってもよい。このように、遺伝の多様性は「人為的」品種改良及び急速な分子の進化を経て創生される。例えば、ランダムポイント突然変異を有する単一の遺伝子の断片を組み換えて、スクリーニングし、その後所望の特性が最適化されるまでシャッフリングすることができる。或いは、所定の遺伝子を同種または異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子と組み換えて、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝多様性を、指図された制御可能な方法で最大化させることができる。

【０１３６】

別の実施例によれば、ＳＲＰをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である（例えば、Ｃａｒｕｔｈｅｒｓ．Ｍ．Ｈ．ら（１９８０）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．Ｓｙｍｐ．Ｓｅｒ ７：２１５－２２３；及びＨｏｒｎ，Ｔ．他（１９８０）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．Ｓｙｍｐ．Ｓｅｒ７．２２５－２３２を参照）。（１９８０）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．Ｓｙｍｐ．Ｓｅｒ ７：２１５－２２３；及びＨｏｒｎ，Ｔ．他（１９８０）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．Ｓｙｍｐ．Ｓｅｒ．７：２２５－２３２を参照）。別法として、化学的方法を用いてＳＲＰ自体またはその断片を合成することが可能である。例えば、種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる（Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｔ．（１９８４）Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，ＷＨ Ｆｒｅｅｍａｎ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ，５５－６０ページ、Ｒｏｂｅｒｇｅ，Ｊ．Ｙ．ら（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６９：２０２－２０４等を参照）。自動合成はＡＢＩ ４３１Ａペプチドシンセサイザ（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）を用いて達成し得る。更にＳＲＰのアミノ酸配列または任意のその一部は、直接的な合成の際の変更、及び／または化学的方法を用いた他のタンパク質または任意のその一部からの配列との組み合わせにより、天然のポリペプチド配列を有するポリペプチドまたは変異体ポリペプチドを作製することが可能である。

【０１３７】

ペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィーを用いて実質上精製可能である（Ｃｈｉｅｚ，Ｒ．Ｍ．ａｎｄ Ｆ．Ｚ．Ｒｅｇｎｉｅｒ（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８２：３９２－４２１等を参照）。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシークエンシングによって確認することができる（前出のＣｒｅｉｇｈｔｏｎ，２８－５３ページ等を参照）。

【０１３８】

生物学的に活性なＳＲＰを発現させるために、ＳＲＰをコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入する。この発現ベクターは、好適な宿主に挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要なエレメントを含む。必要な要素には、ベクター及びＳＲＰをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型プロモーター、５’及び３’の非翻訳領域などの調節配列がある。このような要素は、長さ及び特異性が様々である。特定の開始シグナルによって、ＳＲＰをコードする配列のより効果的な翻訳を達成することが可能である。このようなシグナルには、ＡＴＧ開始コドンと、コザック配列などの近傍の配列が含まれる。ＳＲＰをコードする配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。しかしながら、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、インフレームのＡＴＧ開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現ベクターに含まれるようにすべきである。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である。（Ｓｃｈａｒｆ，Ｄ．ら（１９９４）Ｒｅｓｕｌｔｓ Ｐｒｏｂｌ．Ｃｅｌｌ Ｄｉｆｆｅｒ．２０：１２５－１６２．等を参照）。

【０１３９】

当業者に周知の方法を用いて、ＳＲＰをコードする配列、好適な転写及び翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法には、ｉｎ ｖｉｔｒｏ組換えＤＮＡ技術、合成技術、及びｉｎ ｖｉｖｏ遺伝子組換え技術が含まれる。（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．他．（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ．Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ ＮＹ，４章及び８章，及び１６－１７章；及びＡｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．他．（１９９５）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ，ｃｈ．９章、１３章及び１６章を参照）

種々の発現ベクター／宿主系を利用して、ＳＲＰをコードする配列を保持及び発現し得る。限定するものではないがこのような発現ベクター／宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌や、ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルスＣａＭＶまたはタバコモザイクウイルスＴＭＶ）または細菌発現ベクター（例えばＴｉまたはｐＢＲ３２２プラスミド）で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系などの微生物等がある。（前出のＳａｍｂｒｏｏｋ、前出のＡｕｓｕｂｅｌ、Ｖａｎ Ｈｅｅｋｅ，Ｇ．ａｎｄ Ｓ．Ｍ．Ｓｃｈｕｓｔｅｒ（１９８９）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６４：５５０３－５５０９、；Ｅｎｇｅｌｈａｒｄ、Ｅ．Ｋ．ら（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：３２２４－３２２７、Ｓａｎｄｉｇ，Ｖ．ら（１９９６）Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．７：１９３７－１９４５、Ｔａｋａｍａｔｓｕ，Ｎ．（１９８７）ＥＭＢＯＪ．６：３０７－３１１、；『マグローヒル科学技術年鑑』（Ｔｈｅ ＭｃＧｒａｗ Ｈｉｌｌ Ｙｅａｒｂｏｏｋ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）（１９９２）ＭｃＧｒａｗ Ｈｉｌｌ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ，１９１－１９６ページ、Ｌｏｇａｎ，Ｊ．ａｎｄ Ｔ．Ｓｈｅｎｋ（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：３６５５－３６５９、Ｈａｒｒｉｎｇｔｏｎ，Ｊ．Ｊ．ら（１９９７）Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．１

５：３４５－３５５等を参照）。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ輸送することができる（Ｄｉ Ｎｉｃｏｌａ，Ｍ．他（１９９８）Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎ．Ｔｈｅｒ．５（６）：３５０－３５６、Ｙｕ，Ｍ．他（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０（１３）：６３４０－６３４４、Ｂｕｌｌｅｒ，Ｒ．Ｍ．他（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１７（６０４０）：８１３－８１５；ＭｃＧｒｅｇｏｒ，Ｄ．Ｐ．他（１９９４）Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３１（３）：２１９－２２６、Ｖｅｒｍａ，Ｉ．Ｍ．ａｎｄ Ｎ．Ｓｏｍｉａ（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ ３８９：２３９－２４２等を参照）（１９９８）ＣＡＢＩＯＳ ５：６３５０；Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｍ．他（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０（１３）：６３４０－６３４４；Ｂｕｌｌｅｒ，Ｒ．Ｍ．ら（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１７（６０４０）：８１３－８１５；ＭｃＧｒｅｇｏｒ，Ｄ．Ｐ．ら（１９９４）Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３１（３）：２１９－２２６；およびＶｅｒｍａ，Ｉ．Ｍ．およびＮ．Ｓｏｍｉａ（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ ３８９：２３９－２４２．）本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

【０１４０】

細菌系では、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて多数のクローニングベクター及び発現ベクターを選択し得る。例えば、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング及び増殖には、ＰＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ ＣＡ）またはＰＳＰＯＲＴ１プラスミド（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）などの多機能大腸菌ベクターを用いることができる。ベクターの多数のクローニング部位にＳＲＰをコードする配列をライゲーションするとｌａｃＺ遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更にこれらのベクターは、クローニングされた配列における<u>ｉｎ ｖｉｔｒｏ</u>転写、ジデオキシのシークエンシング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう（例えば、Ｖａｎ Ｈｅｅｋｅ，Ｇ．およびＳ．Ｍ．Ｓｃｈｕｓｔｅｒ（１９８９）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６４：５５０３５５０９を参照）。例えば、抗体の産生のためなどに多量のＳＲＰが必要な場合は、ＳＲＰの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力な誘導Ｔ５バクテリオファージプロモーターまたは誘導Ｔ７バクテリオファージプロモーターを含むベクターが使用できる。

【０１４１】

ＳＲＰの発現に酵母の発現系の使用が可能である。α因子、アルコールオキシダーゼ、ＰＧＨプロモーター等の構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多数のベクターが、酵母菌サッカロミセスーセレビジエまたは<u>Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ</u>に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の分泌か細胞内への保持のどちらかを誘導し、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列を組み込む。（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ，１９９５，前出、Ｂｉｔｔｅｒ，Ｇ．Ａ．ら（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１６－５４４、及びＳｃｏｒｅｒ．Ｃ．Ａ．ら（１９９４）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １２：１８１－１８４．を参照）（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１６－５４４；Ｓｃｏｒｅｒ，Ｃ．Ａ．他。（１９９４）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １２：１８１－１８４．）

植物系を使用してＳＲＰを発現することも可能である。ＳＲＰ をコードする配列の転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独或いはＴＭＶ（Ｔａｋａｍａｔｓｕ，Ｎ．（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ ６：３０７－３１１）由来のオメガリーダー配列と組み合わせて用いられるようなＣａＭＶ由来の３５Ｓ及び１９Ｓプロモーターによって促進される。或いは、ＲＵＢＩＳＣＯの小サブユニット等の植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを用いてもよい（例えば、Ｃｏｒｕｚｚｉ，Ｇ．ら．（１９８４）ＥＭＢＯ Ｊ．３：１６７１－１６８０；Ｂｒｏｇｌｉｅ，Ｒ．ら（１９８４）Ｓｃｉｅｎ

ｃｅ２２４：８３８－８４３；およびＷｉｎｔｅｒ，Ｊ．ら（１９９１）Ｒｅｓｕｌｔｓ Ｐｒｏｂｌ．Ｃｅｌｌ Ｄｉｆｆｅｒ．１７：８５－１０５を参照）これらの構成物は、直接ＤＮＡ形質転換または病原体を媒介とする形質移入によって、植物細胞内に導入可能である。（『マグローヒル科学技術年鑑』（Ｔｈｅ ＭｃＧｒａｗ Ｈｉｌｌ Ｙｅａｒｂｏｏｋ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）（１９９２）ＭｃＧｒａｗ Ｈｉｌｌ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ，ｐｐ．１９１－１９６等を参照。）哺乳動物細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、後発プロモーター及び３連リーダー配列からなるアデノウイルス転写物／翻訳複合体にＳＲＰ をコードする配列を結合し得る。可欠Ｅ１またはＥ３領域へウイルスのゲノムを挿入し、宿主細胞でＳＲＰを発現する感染ウイルスを得ることが可能である。（例えば、Ｌｏｇａｎ，Ｊ．およびＴ．Ｓｈｅｎｋ（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：３６５５３６５９を参照）。更に、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）エンハンサー等の転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させ得る。ＳＶ４０またはＥＢＶをベースにしたベクターを用いてタンパク質を高レベルで発現させることもできる。

【０１４２】

ヒト人工染色体（ＨＡＣ）を用いて、プラスミドに含まれ且つプラスミドから発現するものより大きなＤＮＡの断片を輸送することもできる。治療のために約６ｋｂ～１０ＭｂのＨＡＣｓを作製し、従来の輸送方法（リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル）で供給する。（Ｈａｒｒｉｎｇｔｏｎ，Ｊ．Ｊ．ら（１９９７）Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ．１５：３４５－３５５、Ｐｒｉｃｅ，Ｃ．Ｍ．（１９９３）Ｂｌｏｏｄ Ｒｅｖ．７：１２７－１３４、Ｔｒａｓｋ，Ｂ．Ｊ．（１９９１）Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．７：１４９－１５４等を参照）。

【０１４３】

哺乳動物系の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、株化細胞におけるＳＲＰの安定した発現が望ましい。例えば、発現ベクターであって複製発現因子、内在性発現因子、或いはその両者のウイルス起源を含むものと、同一或いは別のベクター上の選択可能マーカー遺伝子とを用いて、ＳＲＰをコードする配列を細胞株に形質転換することが可能である。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約１～２日間細胞を増殖させることができる。選択可能マーカーの目的は選択培地への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーが存在することにより、導入された配列をうまく発現するような細胞の成長及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖可能である。

【０１４４】

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものではないがこのような選択系には、ｔｋ－単純細胞のために用いられるヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子と、ａｐｒ－細胞のために用いられるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある（例えば、Ｗｉｇｌｅｒ，Ｍ．他（１９７７）Ｃｅｌｌ １１：２２３－２３２；Ｌｏｗｙ，Ｉ．他。（１９８０）Ｃｅｌｌ ２２：８１７－８２３を参照）。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を用いることができる。例えばｄｈｆｒはメトトレキセートに対する耐性を与え、ｎｅｏはアミノグリコシッドネオマイシン及びＧ－４１８に対する耐性を与え、ａｌｓはクロルスルフロンに対する耐性を、ｐａｔはホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える（例えば、Ｗｉｇｌｅｒ，Ｍ．他（１９８０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：３５６７３５７０；ＣｏｌｂｅｒｅＧａｒａｐｉｎ，Ｆ．他（１９８１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１１４を参照｝｝。この他の選択可能な遺伝子、例えば、代謝のための細胞の必要条件を変えるｔｒｐＢ及びｈｉｓＤは、文献に記載されている（Ｈａｒｔｍａｎ，Ｓ．Ｃ．及びＲ．Ｃ．Ｍｕｌｌｉｇａｎ（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：８０４７８０５１を参照．）。可視マーカー、例えばアントシアニン、緑色蛍光タンパク質（

ＧＦＰ；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）、βグルクロニダーゼ及びその基質βグルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である（Ｒｈｏｄｅｓ，Ｃ．Ａ．（１９９５）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．５５：１２１１３１等を参照）。

【０１４５】

マーカー遺伝子発現の存在／不存在によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在及び発現の確認が必要な場合もある。例えば、ＳＲＰをコードする配列がマーカー遺伝子配列の中に挿入された場合、ＳＲＰをコードする配列を含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により特定可能である。または、１つのプロモーターの制御下でマーカー遺伝子がＳＲＰをコードする配列と一列に配置することも可能である。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子の発現も示す。

【０１４６】

一般に、ＳＲＰをコードする核酸配列を含み且つＳＲＰを発現する宿主細胞は、当業者によく知られている種々の方法を用いて同定することが可能である。限定するものではないが当業者によく知られている方法には、ＤＮＡ－ＤＮＡ或いはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリダイゼーション、ＰＣＲ法、核酸或いはタンパク質の検出、定量、或いはその両方を行うための膜系、溶液ベース或いはチップベースの技術を含むタンパク質の生物学的検定法または免疫学的検定法がある。

特異的ポリクローナル抗体または特異的モノクローナル抗体を用いてＳＲＰの発現の検出及び計測を行うための免疫学的方法は、当分野で公知である。 このような技術の例としては、酵素に結合したイムノソルベントアッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）などが挙げられる。ＳＲＰ上の２つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、２部位のモノクローナルベースイムノアッセイ（ｔｗｏ－ｓｉｔｅ，ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ－ｂａｓｅｄ ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）が好ましいが、競合の結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ及びこれ以外のアッセイは、当分野で公知である（Ｈａｍｐｔｏｎ．Ｒ．ら（１９９０）Ｓｅｒｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ，ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．ＡＰＳ Ｐｒｅｓｓ．Ｓｔ Ｐａｕｌ．ＭＮ，Ｓｅｃｔ．ＩＶ、Ｃｏｌｉｇａｎ，Ｊ．Ｅ．ら（１９９７）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ、Ｐｏｕｎｄ，Ｊ．Ｄ．（１９９８）Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｈｕｍａｎｓ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ ＮＪ等を参照）。

【０１４７】

多岐にわたる標識方法及び結合方法が、当業者に知られており、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブ或いはＰＣＲプローブを生成する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化、または標識されたヌクレオチドを用いるＰＣＲ増幅が含まれる。別法として、ＳＲＰをコードする配列、またはその任意の断片をｍＲＮＡプローブの生成のためのベクターにクローニングすることも可能である。このようなベクターは、当分野において知られており、市販もされており、Ｔ７、Ｔ３またはＳＰ６等の好適なＲＮＡポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドを加えて、ｉｎ ｖｉｔｒｏでＲＮＡプローブの合成に用いることができる。このような方法は、例えばＡｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｐｒｏｍｅｇａ（ＭａｄｉｓｏｎＷＩ）、Ｕ．Ｓ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ等から市販されている種々のキットを用いて実行することができる。検出を容易にするために用い得る好適なレポーター分子或いは標識には、基質、補助因子、インヒビター、磁気粒子のほか、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤等がある。

【０１４８】

ＳＲＰをコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、細胞培地でのこのタンパク質の発現及び回収に好適な条件下で培養される。形質転換細胞から製造されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用される配列、ベクター、或いはその両者に依存する。ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核細胞膜及び真核細胞膜を透過するＳＲＰの分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計できることは、当業者には理解されよう。

【０１４９】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現したタンパク質を所望の形に処理する能力によって行い得る。限定するものではないがこのようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化及びアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断するような翻訳後処理を利用して、タンパク質のターゲティング、折りたたみ及び／または活性を特定することも可能である。翻訳後の活性のための固有の細胞装置及び特徴のある機構を有する種々の宿主細胞（例えばＣＨＯ、ＨｅＬａ、ＭＤＣＫ、ＭＥＫ２９３、ＷＩ３８等）は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＶＡ）から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾及び処理を確実にするように選択し得る。

【０１５０】

本発明の別の実施例では、ＳＲＰをコードする自然或いは変更された、または組換えの核酸配列を上記した任意の宿主系の融合タンパク質の翻訳となる異種配列に結合させる。例えば、市販されている抗体を用いて認識可能な異種部分を含むキメラＳＲＰタンパク質は、ＳＲＰ活性阻害剤に対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分も、市販されている親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。限定されるものではないがこのような部分には、グルタチオンＳトランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、チオレドキシン（Ｔｒｘ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）、６－Ｈｉｓ、ＦＬＡＧ、ｃ－ｍｙｃ、赤血球凝集素（ＨＡ）がある。ＧＳＴは固定化グルタチオン上で、ＭＢＰはマルトース上で、Ｔｒｘはフェニルアルシンオキシド上で、ＣＢＰはカルモジュリン上で、そして６－Ｈｉｓは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。ＦＬＡＧ、ｃ－ｍｙｃ及び赤血球凝集素（ＨＡ）は、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販されているモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、ＳＲＰをコードする配列と異種タンパク質配列との間にあるタンパク質分解切断部位を融合タンパク質が含むように遺伝子操作すると、ＳＲＰが精製の後に異種部分から切断され得る。融合タンパク質の発現及び精製方法は、前出のＡｕｓｕｂｅｌ（１９９５）１０章に記載されている。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現及び精製を促進することもできる。

【０１５１】

本発明の別の実施例では、ＴＮＴウサギ網状赤血球可溶化液またはコムギ胚芽抽出系（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いてｉｎ ｖｉｔｒｏで放射能標識したＳＲＰの合成が可能である。これらの系は、Ｔ７、Ｔ３またはＳＰ６プロモーターと機能的に結合したタンパク質コード配列の転写及び翻訳を結合する。翻訳は、例えば^{35}Ｓメチオニンのような放射能標識したアミノ酸前駆体の存在下で起こる。

【０１５２】

本発明のＳＲＰまたはその断片を用いて、ＳＲＰに特異結合する化合物をスクリーニングすることができる。少なくとも１つまたは複数の試験化合物を用いて、ＳＲＰへの特異的な結合をスクリーニングすることが可能である。試験化合物の例には、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質（例えば受容体）または小分子が挙げられる。

【０１５３】

一実施例では、このように同定された化合物は、例えばリガンドやその断片などのＳＲＰの天然のリガンド、または天然の基質、構造的または機能的な擬態性または自然結合パー

トナーに密接に関連している（Ｃｏｌｉｇａｎ，Ｊ．Ｅ．他（１９９１）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １（２）の５章等を参照）。同様に、化合物は、ＳＲＰが結合する天然受容体、或いは例えばリガンド結合部位などの少なくとも受容体のある断片に密接に関連し得る。何れの場合も、既知の技術を用いてこの化合物を合理的に設計することができる。一実施例では、このような化合物に対するスクリーニングには、分泌タンパク質或いは細胞膜上のタンパク質の何れか一方としてＳＲＰを発現する好適な細胞の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、ショウジョウバエ、大腸菌からの細胞が含まれる。ＳＲＰ を発現する細胞またはＳＲＰ を含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、ＳＲＰ または化合物の何れかの結合、刺激または活性の阻害を分析する。

【０１５４】

あるアッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに実験的に結合させ、結合を、蛍光色素、放射性同位体、酵素抱合体またはその他の検出可能な標識により検出することができる。例えば、このアッセイは、少なくとも１つの試験化合物を、溶液中の或いは固体支持物に固定されたＳＲＰと結合させるステップと、ＳＲＰとこの化合物との結合を検出するステップを含み得る。別法では、標識された競合物の存在下での試験化合物の結合の検出及び測定を行うことができる。更にこのアッセイでは、無細胞再構成標本、化学ライブラリまたは天然の生成混合物を用いて実施することができ、試験化合物は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定させる。

【０１５５】

本発明のＳＲＰまたはその断片を用いて、ＳＲＰの活性を調整する化合物をスクリーニングすることが可能である。このような化合物には、アゴニスト、アンタゴニスト、或るいは部分的または逆アゴニスト等が含まれる。一実施例では、ＳＲＰが少なくとも１つの試験化合物と結合する、ＳＲＰの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、試験化合物の存在下でのＳＲＰの活性が試験化合物不在下でのＳＲＰの活性と比較する。試験化合物の存在下でのＧＣＲＥＣの活性の変化は、ＧＣＲＥＣの活性を調整する化合物の存在を示唆する。別法では、試験化合物をＳＲＰの活性に適した条件下でＳＲＰを含むｉｎ ｖｉｔｒｏまたは細胞遊離系と結合させてアッセイを実施する。これらアッセイの何れかにおいて、ＳＲＰの活性を調整する試験化合物は間接的に結合することが可能であり、試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも１つから複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

【０１５６】

別の実施例では、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）における相同組換えを用いて動物モデル系内で、ＳＲＰまたはその哺乳動物相同体をコードするポリヌクレオチドを「ノックアウト」する。このような技術は当技術分野において周知であり、ヒト疾患動物モデルの作製に有用である（米国特許第５，１７５，３８３号及び第５，７６７，３３７号等を参照）。例えば１２９／ＳｖＪ細胞株等のマウスＥＳ細胞は初期のマウス胚に由来し、培地で増殖させることができる。このＥＳ細胞は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（ｎｅｏ：Ｃａｐｅｃｃｈｉ，Ｍ．Ｒ．（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４４：１２８８－１２９２）等のマーカー遺伝子で破壊した目的の遺伝子を含むベクターで形質転換する。このベクターは、相同組換えにより宿主ゲノムの対応する領域に組み込まれる。別法では、Ｃｒｅ－ｌｏｘＰ系を用いて相同組換えを行い、組織特異的または発生段階特異的に目的遺伝子をノックアウトする（Ｍａｒｔｈ，Ｊ．Ｄ．（１９９６）Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９７：１９９９－２００２；Ｗａｇｎｅｒ，Ｋ．Ｕ．他（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：４３２３－４３３０）。形質転換したＥＳ細胞を同定し、例えばＣ５７ＢＬ／６マウス系等から採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入し、得られるキメラ子孫の遺伝形質を決め、これを交配させてヘテロ接合性系またはホモ接合性系を作製する。このようにして作製した遺伝子組換え動物は、可能性のある治療薬や毒性薬剤で検査することができる。

【０１５７】

ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドをｉｎ ｖｉｔｒｏでヒト胚盤胞由来のＥＳ細胞において操作することが可能である。ヒトＥＳ細胞は、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞の種類を含む少なくとも８つの別々の細胞系統に分化する可能性を有する。これらの細胞系統は、例えば神経細胞、造血系統及び心筋細胞に分化する（Ｔｈｏｍｓｏｎ，Ｊ．Ａ．他（１９９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８２：１１４５－１１４７参照）。

【０１５８】

ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドを用いて、ヒト疾患をモデルとした「ノックイン」ヒト化動物（ブタ）または遺伝子組換え動物（マウスまたはラット）を作製することが可能である。ノックイン技術を用いて、ＳＲＰ をコードするポリヌクレオチドの或る領域を動物ＥＳ細胞に注入し、注入した配列を動物細胞ゲノムに組み込ませる。形質転換細胞を胞胚に注入し、胞胚を上記のように移植する。遺伝子組換え子孫または近交系について研究し、可能性のある医薬品を用いて処理し、ヒトの疾患の治療に関する情報を得る。別法では、例えばＳＲＰを乳汁内に分泌するなどＳＲＰを過剰に発現する哺乳動物近交系は、便利なタンパク質源となり得る（Ｊａｎｎｅ，Ｊ．他（１９９８）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．４：５５－７４を参照）。

【０１５９】

（治療）

ＳＲＰのある領域と分泌性蛋白のある領域との間に、例えば配列及びモチーフの文脈における化学的及び構造的類似性が存在する。更に、ＳＲＰの発現は、罹患組織に密接に関連する。従って、ＳＲＰは、細胞異常増殖、神経障害または新陳代謝障害に関与すると考えられる。ＳＲＰの発現若しくは活性の増大に関連する疾患の治療においては、ＳＲＰの発現または活性を低下させることが望ましい。また、ＳＲＰの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、ＳＲＰの発現または活性を増大させることが望ましい。

【０１６０】

従って、一実施例において、ＳＲＰの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、患者にＳＲＰまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患には；細胞増殖異常の中には日光性角化症、動脈硬化、アテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病（ＭＣＴＤ）、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頚部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれ、神経の疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側策硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー及びクロイツフェルト‐ヤコブ病、ゲルストマン症候群、Ｇｅｒｓｔｍａｎｎ－Ｓｔｒａｕｓｓｌｅｒ－Ｓｃｈｅｉｎｋｅｒ症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫（ｃｅｒｅｂｅｌｌｏｒｅｔｉｎａｌ ｈｅｍａｎｇｉｏｂｌａｓｔｏｍａｔｏｓｉｓ）、脳３叉神経血管症候群、ダウン症を含む中枢神経系性精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分性及び不安性の障害、分裂病性疾患を含む精神病と、季節性障害（ＳＡＤ）と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、及びトゥーレット病と、進行性核上麻痺、皮質基部変性（ｃｏｒｔｉｃｏｂａｓａｌ ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ）及び家族性の前頭側頭性健忘症とが含まれ、 遺伝的障害の中には、副腎白質萎縮症、アルポート症候群、コロイデレミア、デュシェンヌ‐ベッカー型筋ジストロフィー

、ダウン症候群、嚢胞性線維症、慢性肉芽腫症、ゴーシェ病、ハンチントン舞踏病、マルファン症候群、筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、濃化異骨症、レフサム症候群、網膜芽細胞腫、鎌状赤血球貧血、地中海貧血症、Ｗｅｒｎｅｒ症候群、フォンウイルブランド病、Ｗｉｌｍｓ腫瘍、ツェルウェガー症候群、ペルオキシソームアシルＣｏＡ酸化酵素欠損症、ペルオキシソーム・チオラーゼ欠損症、ペルオキシソーム・チオラーゼ・プロテイン欠損症、、ミトコンドリアル・カルニチン・パルミトイル・トランスフェラーゼおよびカルニチン欠損症、ミトコンドリアル極長鎖アシルＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリアル中鎖アシルＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリアル短鎖アシルＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリアル電子伝達フラボプロテインおよび電子伝達フラボプロテイン・ユビキノン酸化還元酵素欠損症、ミトコンドリアル・トリファンクショナル・プロテイン欠損症、およびミトコンドリアル短鎖ｈｙｄｒｏｘｙａｃｙｌデヒドロゲナーゼ欠損症が含まれ、 平滑筋異常の中には狭心症、アナフィラキシー性ショック、不整脈、喘息、心臓血管性ショック、クッシング症候群、高血圧、低血糖症、心筋梗塞、偏頭痛、およびクロム親和細胞腫（褐色細胞腫）、および心筋症、脳疾患、癲癇、カーンズ・セイヤー症候群、乳酸アシドーシス、筋クローヌス性疾患、および眼筋麻痺が含まれ、代謝異常の中にはアンモニア過剰血症， トリメチルアミヌリア（魚臭症候群）、３－ヒドロキシダイカルボキシリック酸尿症、ダイカルボキシリック酸尿症、キサンチン尿症、先天性リポイド副腎過形成 （ＣＬＡＨ），ａｌｂｉｎｉｓｍ ｔｙｐｅ ＩＩＩ白皮症ＩＩＩ型、インシュリン過剰－アンモニア過剰血症候群（ＨＨＳ）、グルタル酸尿症Ｉ型、，家族性再発性ミオグロビン尿、インシュリン耐性、突発性シデレオブラスティック貧血（ＡＩＳＡ） 、新生児型副腎脳白質ジストロフィー、低酸素症、損傷による組織への障害増進、放射線および紫外線被曝、肝機能不全、，顕著な肥満、メトヘモグロビン血症（ＨＭ１， ＨＭ２， およびＨＭ３）、無月経を伴う発毛異常およびハーマンスキー・プゥドラック症候群が含まれる。別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むＳＲＰの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、ＳＲＰまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与することも可能である。

【０１６１】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むＳＲＰの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、実質的に精製されたＳＲＰを含む組成物を好適な医薬用担体と共に患者に投与することも可能である。

【０１６２】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むＳＲＰの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、ＳＲＰの活性を調節するアゴニストを患者に投与することも可能である。

【０１６３】

更なる実施例では、ＳＲＰの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、患者にＳＲＰのアンタゴニストを投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の例には、上記した細胞増殖異常、自己免疫／炎症性の疾患が含まれる。一実施態様においては、アンタゴニストとして直接的に、或いはＳＲＰを発現する細胞または組織に薬剤を輸送するターゲティングまたは輸送機構として間接的にＳＲＰと特異結合する抗体を用いることができる。

【０１６４】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むＳＲＰの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドの相補配列を発現するベクターを患者に投与することも可能である。

【０１６５】

別の実施例では、本発明の任意のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補配列、またはベクターを、別の好適な治療薬と組み合わせて投与することもできる。併用療法で用いる好適な治療薬は、当業者が従来の医薬原理に従ってを選択し得る。治療薬と

組み合わせることにより、上記した種々の疾患の治療または予防に相乗効果をもたらし得る。この方法を用いることにより少量の各薬剤で医薬効果をあげることが可能となり、それによって副作用の可能性を低減し得る。

【０１６６】

ＳＲＰのアンタゴニストは、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。詳しくは、精製されたＳＲＰを用いて抗体を作ったり、治療薬のライブラリをスクリーニングしてＳＲＰと特異的に結合するものの同定が可能である。ＳＲＰの抗体も、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。 このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖、Ｆａｂ断片、及びＦａｂ発現ライブラリによって作られた断片が含まれる。 但し、これらに限定されるものではない。中和抗体（即ち二量体の形成を阻害する抗体）は通常、治療用に好適である。

【０１６７】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト及びその他のものを含む種々の宿主が、ＳＲＰまたは任意の断片、または免疫原性の特性を備えるそのオリゴペプチドの注入によって免疫化され得る。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることもできる。限定するものではないがこのようなアジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウム等のミネラルゲルアジュバントと、リゾレシチン、プルロニックポリオル、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール等の界面活性剤とがある。ヒトに用いられるアジュバントの中では、ＢＣＧ（カルメット‐ゲラン杆菌）及びコリネバクテリウム‐パルヴムが特に好ましい。

【０１６８】

ＳＲＰに対する抗体を誘導するために用いるオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、少なくとも約５のアミノ酸からなり、一般的には少なくとも約１０のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するものが好ましい。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であり且つ小さな天然の分子の全アミノ酸配列を含むことが望ましい。ＳＲＰアミノ酸の短いストレッチは、ＫＬＨなどの別のタンパク質の配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

【０１６９】

ＳＲＰに対するモノクローナル抗体は、培地内の連続した細胞株によって、抗体分子を産生する任意の技術を用いて作製することが可能である。限定するものではないがこのような技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術及びＥＢＶ－ハイブリドーマ技術がある（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ，Ｇ．他（１９７５）Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５４９７；Ｋｏｚｂｏｒ，Ｄ．他（１９８５）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ８１：３１－４２；Ｃｏｔｅ，Ｒ．Ｊ．他．（１９８３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０：２０２６－２０３０；及びＣｏｌｅ，Ｓ．Ｐ．．他（１９８４）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．を参照）。

【０１７０】

更に、「キメラ抗体」作製のために発達したヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を備える分子を得るために用いられる（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓ．Ｌ．他（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：６８５１－６８５５；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，Ｍ．Ｓ．他（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ ３１２：６０４－６０８；及びＴａｋｅｄａ，Ｓ．他（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１４：４５２４５４．を参照）。別法では、当分野で周知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、ＳＲＰ特異性一本鎖抗体を生成する。関連特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる（Ｂｕｒｔｏｎ Ｄ．Ｒ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：１０１３４－１０１３７等を参照）。

【０１７１】

抗体の産生は、リンパ球集団におけるｉｎ ｖｉｖｏ産生の誘導によって、或いは免疫グロブリンライブラリのスクリーニングまたは文献に開示されているような高特異結合試薬のパネルのスクリーニングによっても行い得る（例えば、Ｏｒｌａｎｄｉ，Ｒ 他（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：３８３３－３８３７；Ｗｉｎｔｅｒ，Ｇ．．．他（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３４９：２９３－２９９．を参照）。

【０１７２】

ＳＲＰに対する特異的な結合部位を含む抗体も得ることができる。例えば、限定するものではないが、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって作製されるＦ（ａｂ’）$_2$ 断片と、Ｆ（ａｂ’）$_2$ 断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製されるＦａｂ断片とがある。或いは、Ｆａｂ発現ライブラリを作製することによって、モノクローナルＦａｂ断片を所望の特異性と迅速且つ容易に同定することが可能となる（例えば、Ｈｕｓｅ，Ｗ．Ｄ．他（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５－１２８１等を参照）。

【０１７３】

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定することができる。隔離された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる競合的な結合、または免疫放射線活性のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。 通常このようなイムノアッセイには、ＳＲＰとその特異性抗体との間の複合体形成の計測が含まれる。２つの非干渉性ＳＲＰエピトープに反応するモノクローナル抗体を用いるような、２部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合結合アッセイを利用してもよい（前出のＰｏｕｎｄの文献）。

【０１７４】

ラジオイムノアッセイ技術と共にＳｃａｔｃｈａｒｄ分析などの様々な方法を用いて、ＳＲＰに対する抗体の親和性を評価する。親和性を結合定数Ｋａで表すが、このＫａは、平衡状態の下でＳＲＰ抗体複合体のモル濃度を遊離抗体と遊離抗原のモル濃度で除して得られる値である。ポリクローナル抗体は多様なＳＲＰエピトープに対する親和性が不均一であり、ポリクローナル抗体試薬のために決定したＫａは、ＳＲＰ抗体の平均親和性または結合活性を表す。特定のＳＲＰエピトープに単一特異的なモノクローナル抗体医薬のＫａは、親和性の真の測定値を表す。Ｋａ値が約10^9～10^{12} Ｌ／ｍｏｌの範囲にあるような高親和性抗体試薬は、ＳＲＰ抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。Ｋａ値が10^6～10^7 Ｌ／ｍｏｌの低親和性抗体医薬は、ＳＲＰが抗体から最終的に活性化状態で解離する必要がある免疫精製（ｉｍｍｕｎｏｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ）及び類似の処理に用いるのが好ましい。（Ｃａｔｔｙ，Ｄ．（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｖｏｌｕｍｅ Ｉ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ．ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ；Ｌｉｄｄｅｌｌ，Ｊ．Ｅ．及びＣｒｙｅｒ，Ａ．（１９９１）Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ）。

【０１７５】

ポリクローナル抗体試薬の抗体価及び結合活性を更に評価して、後に使う或る適用例に対するこのような試薬の品質及び適性を決定することができる。例えば、少なくとも１～２ｍｇ／ｍｌの特異的な抗体、好ましくは５～１０ｍｇ／ｍｌの特異的な抗体を含むポリクローナル抗体医薬は一般に、ＳＲＰ抗体複合体を沈殿させなければならない処理に用いられる。抗体の特異性、抗体価、結合活性、様々な適用例における抗体の品質や使用に対する指針については、一般に入手可能である。（前出のＣａｔｔｙの文献、同Ｃｏｌｉｇａｎ らの文献等を参照）。

【０１７６】

本発明の別の実施例では、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片や相補配列が、治療目的で使用することができる。ある実施態様では、ＳＲＰをコードす

る遺伝子のコーディング領域や調節領域に相補的な配列やアンチセンス分子（ＤＮＡ及びＲＮＡ、修飾ヌクレオチド）を設計して遺伝子発現を変更することができる。このような技術は当分野では周知であり、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きな断片が、ＳＲＰをコードする配列の制御領域から、またはコード領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である。（Ａｇｒａｗａｌ，Ｓ．，ｅｄ．（１９９６）Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ．，Ｔｏｔａｗａ ＮＪを参照。）

治療に用いる場合、アンチセンス配列を好適な標的細胞に導入するのに好適な任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を発現する発現プラスミドの形で細胞内に輸送することが可能である（Ｓｌａｔｅｒ，Ｊ．Ｅ．ら（１９９８）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０２（３）：４６９－４７５及びＳｃａｎｌｏｎ，Ｋ．Ｊ．ら（１９９５）９（１３）：１２８８－１２９６．等を参照）（１９９８）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０２（３）：４６９－４７５；ａｎｄ Ｓｃａｎｌｏｎ，Ｋ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．（１９９５）９（１３）：１２８８－１２９６．）。アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる（Ｍｉｌｌｅｒ，Ａ．Ｄ．（１９９０）Ｂｌｏｏｄ ７６：２７１、前出のＡｕｓｕｂｅｌ、Ｕｃｋｅｒｔ，Ｗ．ａｎｄ Ｗ．Ｗａｌｔｈｅｒ（１９９４）Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．６３（３）：３２３－３４７等を参照）。その他の遺伝送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープ及び当分野で公知のその他の系が含まれる（Ｒｏｓｓｉ，Ｊ．Ｊ．（１９９５）Ｂｒ．Ｍｅｄ．Ｂｕｌｌ．５１（１）：２１７－２２５；Ｂｏａｄｏ、Ｒ．Ｊ．ら（１９９８）Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．８７（１１）：１３０８－１３１５、Ｍｏｒｒｉｓ，Ｍ．Ｃ．ら（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５（１４）：２７３０－２７３６．等を参照）。

【０１７７】

本発明の別の実施例では、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞の遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療を行うことにより、（ｉ）遺伝子欠損症（例えばＸ染色体鎖遺伝（Ｃａｖａｚｚａｎａ－Ｃａｌｖｏ，Ｍ．他（２０００）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８８：６６９－６７２）により特徴付けられる重度の複合型免疫欠損症（ＳＣＩＤ）－Ｘ１の場合）、先天性アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）欠損症に関連する重度の複合型免疫欠損症（Ｂｌａｅｓｅ，Ｒ．Ｍ．他（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４７５－４８０、Ｂｏｒｄｉｇｎｏｎ，Ｃ．他（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４７０－４７５）、嚢胞性繊維症（Ｚａｂｎｅｒ，Ｊ．他（１９９３）Ｃｅｌｌ ７５：２０７－２１６：Ｃｒｙｓｔａｌ、Ｒ．Ｇ．他（１９９５）Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６：６４３－６６６、Ｃｒｙｓｔａｌ，Ｒ．Ｇ．他．（１９９５）Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６：６６７－７０３）、サラセミア（ｔｈａｌａｓｓａｍｉａ）、家族性高コレステロール血症、第ＶＩＩＩ因子若しくは第ＩＸ因子欠損に起因する血友病（Ｃｒｙｓｔａｌ，３５ Ｒ．Ｇ．（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４０４－４１０、Ｖｅｒｍａ，Ｉ．Ｍ．およびＳｏｍｉａ．Ｎ．（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ ３８９：２３９－２４２）を治療し、（ｉｉ）条件的致死性遺伝子産物を発現させ（例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合）、（ｉｉｉ）細胞内の寄生生物（例えばヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）（Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｄ．（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ ３３５：３９５－３９６、Ｐｏｅｓｃｂｌａ，Ｅ．他（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．９３：１１３９５－１１３９９）、Ｂ型若しくはＣ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ、ＨＣＶ）、Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ及びＰａｒａｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ等の真菌寄生菌、並びに熱帯熱マラリア原虫及びクルーズトリパノソーマ等の原虫寄生生物に対する防御機能を有するタンパク質を発現させることができる。ＳＲＰの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を引き起こす場合、導入した細胞の好適な集団からＰＰを発

現させて、遺伝子欠損によって起こる症状の発現を緩和することが可能である。

【０１７８】

本発明の更なる実施例では、ＳＲＰ の欠損による疾患や異常症は、ＳＲＰ をコードする哺乳動物発現ベクターを作製して、これらのベクターを機械的手段によってＳＲＰ 欠損細胞に導入することによって治療する。ｉｎ ｖｉｖｏ或いはｅｘ ｖｉｔｒｏの細胞に用いる機械的導入技術には、（ｉ）個々の細胞内への直接的なＤＮＡ微量注射法、（ｉｉ）遺伝子銃、（ｉｉｉ）リポソームを介した形質移入、（ｉｖ）受容体を介した遺伝子導入、及び（ｖ）ＤＮＡトランスポソンの使用（Ｍｏｒｇａｎ，Ｒ．Ａ．およびＷ．Ｆ．Ａｎｄｅｒｓｏｎ（１９９３）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１－２１７、Ｉｖｉｃｓ，Ｚ．（１９９７）Ｃｅｌｌ ９１：５０１－５１０；Ｂｏｕｌａｙ，Ｊ－Ｌ．およびＨ．Ｒｅｃｉｐｏｎ（１９９８）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．９：４４５－４５０）がある。

【０１７９】

ＳＲＰの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、限定するものではないが、ＰＣＤＮＡ３．１、ＥＰＩＴＡＧ、ＰＲＣＣＭＶ２、ＰＲＥＰ、ＰＶＡＸベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ ＣＡ）、ＰＣＭＶ－ＳＣＲＩＰＴ、ＰＣＭＶ－ＴＡＧ、ＰＥＧＳＨ／ＰＥＲＶ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ ＣＡ）、ＰＴＥＴ－ＯＦＦ、ＰＴＥＴ－ＯＮ、ＰＴＲＥ２、ＰＴＲＥ２－ＬＵＣ、ＰＴＫ－ＨＹＧ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ ＣＡ）が含まれる。ＳＲＰを発現させるために、（ｉ）恒常的に活性なプロモーター（例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）、ＳＶ４０ウイルス、チミジンキナーゼ（ＴＫ）、若しくはβ－アクチン遺伝子等）、（ｉｉ）誘導性プロモーター（例えば、市販されているＴ－ＲＥＸプラスミド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に含まれている、テトラサイクリン調節性プロモーター（Ｇｏｓｓｅｎ，Ｍ．及びＨ．Ｂｕｊａｒｄ（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：５５４７－５５５１；Ｇｏｓｓｅｎ，Ｍ．他（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６８：１７６６－１７６９；Ｒｏｓｓｉ，Ｆ．Ｍ．Ｖ．及びＨ．Ｍ．Ｂｌａｕ（１９９８）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．９：４５１－４５６））、エクジソン誘導性プロモーター（市販されているプラスミドＰＶＧＲＸＲ及びＰＩＮＤに含まれている：Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＦＫ５０６／ラパマイシン誘導性プロモーター、またはＲＵ４８６／ミフェプリストーン誘導性プロモーター（Ｒｏｓｓｉ，Ｆ．Ｍ．Ｖ．及びＨ．Ｍ．Ｂｌａｕ，前出）、または（ｉｉｉ）正常な個体に由来するＳＲＰをコードする内在性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いることが可能である。

【０１８０】

市販リポソーム形質転換キット（例えばＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社のＰｅｒＦｅｃｔ Ｌｉｐｉｄ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ）を用いれば、当業者は経験にそれほど頼らないでもポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に導入することが可能になる。別法では、リン酸カルシウム法（Ｇｒａｈａｍ．Ｆ．Ｌ．ａｎｄ Ａ．Ｊ．Ｅｂ（１９７３）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ５２：４５６－４６７）若しくは電気穿孔法（Ｎｅｕｍａｎｎ，Ｂ．ら（１９８２）ＥＭＢＯ Ｊ．１：８４１－８４５）を用いて形質転換を行う。（１９８２）ＥＭＢＯ Ｊ．１８：４５９１－８４５）．初代培養細胞にＤＮＡを導入するためには、標準化された哺乳動物の形質移入プロトコルの修飾が必要である。

【０１８１】

本発明の別の実施例では、ＳＲＰの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、（ｉ）レトロウイルス末端反復配列（ＬＴＲ）プロモーター若しくは独立したプロモーターのコントロール下でＳＲＰをコードするポリヌクレオチドと、（ｉｉ）好適なＲＮＡパッケージングシグナルと、（ｉｉｉ）追加のレトロウイルス・シス作用性ＲＮＡ配列及び効率的なベクターの増殖に必要なコーディング配列を伴うＲｅｖ応答性エレメント（ＲＲＥ）とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター（例えばＰＦＢ及びＰＦＢＮＥＯ）はＳｔｒａｔａｇｅｎｅ社から市販

されており、刊行データ（Ｒｉｖｉｅｒｅ，Ｉ．ら．（１９９５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９２：６７３３－６７３７）に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。（１９９５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９２：６７３３－６７３７）。ベクターは、好適なベクター産生細胞系（ＶＰＣＬ）において増殖され、ＶＰＣＬは、標的細胞上の受容体に対する向性を有するエンベロープ遺伝子またはＶＳＶｇ等の乱交雑エンベロープタンパク質を発現する（Ａｒｍｅｎｔａｎｏ，Ｄ．ら（１９８７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６１：１６４７－１６５０、Ｂｅｎｄｅｒ，Ｍ．Ａ．ら（１９８７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６１：１６３９－１６４６、Ａｄａｍ，Ｍ．Ａ．ａｎｄ Ａ．Ｄ．Ｍｉｌｌｅｒ（１９８８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６２：３８０２－３８０６、Ｄｕｌｌ，Ｔ．ら（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：８４６３－８４７１、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，Ｒ．ら（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：９８７３－９８８０）。ＲＩＧＧに付与された米国特許第５，９１０，４３４号（「Ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ｏｂｔａｉｎｉｎｇ ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ ｐａｃｋａｇｉｎｇ ｃｅｌｌ ｌｉｎｅｓ ｐｒｏｄｕｃｉｎｇ ｈｉｇｈ ｔｒａｎｓｄｕｃｉｎｇ ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ｒｅｔｒｏｖｉｒａｌ ｓｕｐｅｒｎａｔａｎｔ」）において、レトロウイルスパッケージング細胞系を得るための方法が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖、細胞集団（例えばＣＤ４$^{+}$ Ｔ細胞）の形質導入、及び形質導入した細胞の患者への戻しは、遺伝子治療の分野では当業者に公知の方法であり、多数の文献に記載されている（Ｒａｎｇａ，Ｕ．ら．（１９９７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７１：７０２０－７０２９、Ｂａｕｅｒ，Ｇ．ら（１９９７）Ｂｌｏｏｄ ８９：２２５９－２２６７、Ｂｏｎｙｈａｄｉ，Ｍ．Ｌ．（１９９７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７１：４７０７－４７１６、Ｒａｎｇａ，Ｕ．ら（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９５：１２０１－１２０６、Ｓｕ，Ｌ．（１９９７）Ｂｌｏｏｄ ８９：２２８３－２２９０）。

【０１８２】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の輸送系を用いて、ＳＲＰの発現に関連する１若しくは複数の遺伝子異常を有するような細胞にＳＲＰをコードするポリヌクレオチドを輸送する。アデノウイルス系ベクターの作製及びパッケージングについては、当業者に公知である。 複製欠損型アデノウイルスベクターは、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を膵臓の無損傷の膵島内に導入するために可変性であることが証明された（Ｃｓｅｔｅ，Ｍ．Ｅ．ら．（１９９５）Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ２７：２６３－２６８）。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターは、Ａｒｍｅｎｔａｎｏに付与された米国特許第５，７０７，６１８号（”Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ”）に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクターについては、Ａｎｔｉｎｏｚｚｉ，Ｐ．Ａ．ら（１９９９）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｎｕｔｒ．１９：５１１－５４４ 及び Ｖｅｒｍａ，Ｉ．Ｍ．ａｎｄ Ｎ．Ｓｏｍｉａ（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ １８：３８９：２３９－２４２も参照されたい。 両文献は、引用することをもって本明細書の一部とする。

【０１８３】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の輸送系を用いて、ＳＲＰの発現に関連する１若しくは複数の遺伝子異常を有する標的細胞にＳＲＰをコードするポリヌクレオチドを輸送する。単純疱疹ウイルス（ＨＳＶ）系のベクターは、ＨＳＶ親和性の中枢神経細胞にＳＲＰ を導入する際に特に重要である。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは、当業者に公知である。 複製適格性単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）Ｉ型系のベクターは、レポーター遺伝子を霊長類の眼に送達するために用いられてきた（Ｌｉｕ，Ｘ．ら（１９９９）Ｅｘｐ．Ｅｙｅ Ｒｅｓ．１６９：３８５－３９５）。（１９９９）Ｅｘｐ．Ｅｙｅ Ｒｅｓ．１６９：３８５３９５）． ＨＳＶ－１ウイルスベクターの作製についても、ＤｅＬｕｃａに付与された米国特許第５，８０４，４１３号（”Ｈｅｒｐｅｓ ｓｉｍｐｌｅｘ ｖｉｒｕｓ ｓｗａｉｎｓ ｆｏｒ ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ”）に開示さ

れており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第５，８０４，４１３号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモーターの制御下において細胞に導入される少なくとも１つの外在性遺伝子を有するゲノムを含む組換えＨＳＶ ｄ９２についての記載がある。上記特許はまた、ＩＣＰ４、ＩＣＰ２７及びＩＣＰ２２のために除去される組換えＨＳＶ系統の作製及び使用について開示している。ＨＳＶベクターについては、Ｇｏｉｎｓ，Ｗ．Ｆ．ら（１９９９）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７３：５１９－５３２及びＸｕ，Ｈ．ら（１９９４）Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．１６３：１５２－１６１も参照されたい。両文献は、引用をもって本明細書の一部とする。クローン化ヘルペスウイルス配列の操作、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なった部分を含む多数のプラスミドを形質移入した後の組換えウイルスの産生、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びにヘルペスウイルスの細胞への感染は、当業者に公知の技術である。

【０１８４】

別法では、αウイルス（正の一本鎖ＲＮＡウイルス）ベクターを用いてＳＲＰをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプのαウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス（Ｓｅｍｌｉｋｉ Ｆｏｒｅｓｔ Ｖｉｒｕｓ，ＳＦＶ）の生物学的研究が広範に行われており、遺伝子導入ベクターがＳＦＶゲノムに基づいていることが分かった（Ｇａｒｏｆｆ，Ｈ．およびＫ．－Ｊ．Ｌｉ（１９９８）Ｃｕｎ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．９：４６４－４６９）。αウイルスＲＮＡの複製中に、通常はウイルスのキャプシッドタンパク質をコードするサブゲノムＲＮＡが作り出される。このサブゲノムＲＮＡは、完全長のゲノムＲＮＡより高いレベルに複製されるため、酵素活性（例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ）を有するウイルスタンパク質に比べてキャプシッドタンパク質が過剰産生される。同様に、ＳＲＰをコードする配列をαウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のＳＲＰをコードするＲＮＡが産生され、高いレベルでＳＲＰが合成される。通常はαウイルスの感染が数日以内での細胞溶解に関係する一方で、シンドビスウイルス（ＳＩＮ）の変異体を有するハムスター正常腎臓細胞（ＢＨＫ－２１）の持続的な感染を確立する能力は、αウイルスの溶解複製を遺伝子治療に適用できるように好適に変更可能であることを示唆している（Ｄｒｙｇａ，Ｓ．Ａ．ら．（１９９７）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ２２８：７４－８３）。（１９９７）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ２２８：７４－８３を参照）。様々な宿主にαウイルスを導入できることから、様々なタイプの細胞にＳＲＰを導入することできる。或る集団におけるサブセットの細胞の特定形質導入は、形質導入前に細胞の選別を必要とし得る。αウイルスの感染性ｃＤＮＡクローンの処置方法、αウイルスのｃＤＮＡ及びＲＮＡの形質移入方法及びαウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

【０１８５】

転写開始部位由来のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を阻害することも可能である。転写開始部位とは例えば開始部位から数えて約－１０と約＋１０の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん塩基対形成は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために十分に開くような二重らせんの能力を阻害するので、三重らせん塩基対形成は有用である。三重らせんＤＮＡを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある（Ｓｌａｔｅｒ，Ｊ．Ｅ．他（１９９４）ｉｎ Ｈｕｂｅｒ，Ｂ．Ｅ．ａｎｄ Ｂ．Ｉ．Ｃａｒｒ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃ Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ，Ｆｕｔｕｒａ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｍｔ．Ｋｉｓｃｏ ＮＹ，ｐｐ １６３－１７７．を参照１６３－１７７．）相補配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってｍＲＮＡの翻訳を阻止するように設計することができる。

【０１８６】

リボザイムは酵素性ＲＮＡ分子であり、ＲＮＡの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用のメカニズムは、ヌクレオチド鎖切断に先立つ相補的標的ＲＮＡへのリボザイム分子の配列特異性ハイブリダイゼーションに関与している。例えば、組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子は、ＳＲＰをコードする配列のヌ

クレオチド鎖切断を特異的且つ効果的に触媒する。

【０１８７】

任意の潜在的ＲＮＡ標的内の特異的リボザイム切断部位は、ＧＵＡ、ＧＵＵ、ＧＵＣ配列を含めたリボザイム切断部位に対する標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。ＧＵＡ，ＧＵＵ，ａｎｄ ＧＵＣ．一度同定すると、オリゴヌクレオチドを機能不全にするような２次構造の特徴に対して切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する１５～２０リボヌクレオチドの短いＲＮＡ配列を、評価することが可能になる。候補標的の適合性の評価も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの実施容易性をテストすることによって行うことができる。

【０１８８】

本発明の相補リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子合成のために当分野でよく知られている任意の方法を用いて作製し得る。任意の方法には、固相フォスフォアミダイト化合物等のオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。或いは、ＳＲＰをコードするＤＮＡ配列のｉｎ ｖｉｔｒｏ及びｉｎ ｖｉｖｏ転写によってＲＮＡ分子を産出し得る。このようなＤＮＡ配列は、Ｔ７やＳＰ６等の好適なＲＮＡポリメラーゼプロモーターを用いて多様なベクター内に取り込むことが可能である。或いは、相補的ＲＮＡを構成的或いは誘導的に合成するようなこれらｃＤＮＡ産物を、細胞系、細胞または組織内に導入することができる。

【０１８９】

細胞内の安定性を高め、半減期を長くするためにＲＮＡ分子を修飾することができる。限定するものではないが可能な修飾には、分子の５’末端、３’末端、あるいはその両方においてフランキング配列を追加したり、分子の主鎖内においてホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオネートまたは２’Ｏ－メチルを使用したりすることが含まれる。この概念は、ＰＮＡの産出に固有のものであり、これら全ての分子に拡大することができる。それには、内在性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンにアセチル－、メチル－、チオ－及び同様の修飾をしたものの他、非従来型塩基、例えばイノシン、クエオシン（ｑｕｅｏｓｉｎｅ）、ワイブトシン（ｗｙｂｕｔｏｓｉｎｅ）等を加えることができる。

【０１９０】

本発明の更なる実施例は、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。限定するものではないが特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物には、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、転写因子その他のポリペプチド転写制御因子、及び特異ポリヌクレオチド配列と相互作用し得る非高分子化学的実体がある。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビターまたはエンハンサーのいずれかとして作用することによりポリヌクレオチド発現を変異し得る。従って、ＳＲＰの発現または活性の増加に関連する疾患の治療においては、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害する化合物が治療上有用であり、ＳＲＰの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に促進する化合物が治療上有用であり得る。

【０１９１】

特異ポリヌクレオチドの変異発現における有効性に対して、少なくとも１個から複数個の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物は、当分野で通常知られている任意の方法により得られる。このような方法には、ポリヌクレオチドの発現を変異させる場合と、既存の、市販のまたは専売の、天然または非天然の化合物ライブラリから選択する場合と、標的ポリヌクレオチドの化学的及び／または構造的特性に基づく化合物を合理的にデザインする場合と、組合せ的にまたは無作為に生成した化合物のライブラリから選択する場合に有効であることが知られているような化合物の化学修飾がある。ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルは、少なくとも１つの試験化合物に曝され、このように得られる。サンプルには例えば、無傷細胞、透過化処理した細胞、無細胞再構成系また

は再構成生化学系があり得る。ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で周知の任意の方法でアッセイする。 通常、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特定のヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーション量を定量し、それによって１つ以上の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較に対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を変異する際に試験化合物が有効であることを示している。特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物に対して、例えばＳｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ遺伝子発現系（Ａｔｋｉｎｓ，Ｄ．ら（１９９９）米国特許第５，９３２，４３５号、Ａｒｎｄｔ，Ｇ．Ｍ．ら（２０００）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２８：Ｅ１５）またはＨｅＬａ細胞等のヒト細胞系（Ｃｌａｒｋｅ，Ｍ．Ｌ．ら（２０００）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２６８：８－１３）を用いてスクリーニングを実行する。本発明の特定の実施例は、特異的ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性のためのオリゴヌクレオチド（デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、修飾オリゴヌクレオチド）の組み合わせライブラリをスクリーニングすることに関与している（Ｂｒｕｉｃｅ，Ｔ．Ｗ．ら（１９９７）米国特許第５，６８６，２４２号、Ｂｒｕｉｃｅ，Ｔ．Ｗ．ら（２０００）米国特許第６，０２２，６９１号）。

【０１９２】

ベクターを細胞または組織に導入する多数の方法が利用可能であり、ｉｎ ｖｉｖｏ、ｉｎ ｖｉｔｒｏ及びｅｘ ｖｉｖｏの使用に対して同程度に適している。ｅｘ ｖｉｖｏ治療の場合、ベクターを患者から採取した幹細胞内に導入し、クローニング増殖して同一患者に自家移植で戻すことができる。トランスフェクション、リボソーム注入またはポリカチオンアミノポリマーによる輸送は、当分野でよく知られている方法を用いて実行することができる。（Ｇｏｌｄｍａｎ，Ｃ．Ｋ．ら（１９９７）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１５：４６２－４６６．等を参照。（例えば、Ｈａｒｒｉｎｇｔｏｎ．Ｊ．Ｊ．他（１９９７）Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ．１５：４６２－４６６．を参照）。

【０１９３】

上記の治療方法はいずれも、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル等の哺乳動物を含めて治療が必要な全ての対象に適用できる。

【０１９４】

本発明の追加実施例は、通常薬剤として許容できる賦形剤で処方される活性成分を有する成分の投与に関連する。賦形剤には例えば、糖、でんぷん、セルロース、ゴム及びタンパク質がある。様々な処方が通常知られており、詳細はＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍａａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｅａｓｔｏｎ ＰＡ）の最新版に記載されている。このような組成物は、ＳＲＴ、ＳＲＴの抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、またはＳＲＴのインヒビターなどからなる。

【０１９５】

本発明に用いられる成分は、任意の数の経路によって投与することができ、限定するものではないが経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下腔内、心室内、肺、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下または直腸がある。

【０１９６】

肺から投与する成分は、液状または乾燥粉末状で調製し得る。このような成分は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子（例えば伝統的な低分子量有機薬）の場合には、速効製剤のエアロゾル送達は当分野で公知である。 高分子（例えばより大きなペプチド及びタンパク質）の場合には、当該分野において肺の肺胞領域を介しての肺送達が最近向上したことにより、インスリン等の薬剤を実質的に血液循環へ輸送することを可能にした（Ｐａｔｔｏｎ，Ｊ．Ｓ．ら，米国特許第５，９９７，８４８号等を参照）。肺送達は、針注射なしに投与する点で優れており、有毒な可能性のある浸透エンハンサーの必要性をなくす。

【０１９７】
本発明での使用に適した成分には、所定の目的を達成するために必要なだけの量の活性成分を含有する成分が含まれる。有効投与量の決定は、当業者の能力の範囲内で行う。
【０１９８】
ＳＲＴまたはその断片を含む高分子を直接細胞内に輸送するべく、特殊な形態に組成物が調製されるのが好ましい。例えば、細胞不透過性高分子を含むリポソーム製剤は、細胞融合及び高分子の細胞内送達を促進し得る。別法では、ＳＲＴまたはその断片をＨＩＶ Ｔａｔ－１タンパク質の陽イオンＮ末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質は、マウスモデル系の脳を含む全ての組織の細胞に形質導入することがわかっている（Ｓｃｈｗａｒｚｅ，Ｓ．Ｒ．ら（１９９９）Ｓｃｉｅｎｃｅ２８５：１５６９－１５７２）。
【０１９９】
任意の化合物に対して、細胞培養アッセイ、例えば新生物性細胞の細胞培養アッセイにおいて、或いは、動物モデル、例えばマウス、ウサギ、イヌまたはブタ等において、先ず治療の有効投与量を推定することができる。動物モデルはまた、好適な濃度範囲及び投与経路を決定するためにも用い得る。このような情報を用いて、次にヒトに対する有益な投与量及び投与経路を決定することができる。
【０２００】
医学的に効果的な薬用量は、症状や容態を回復させる、たとえばＳＲＴまたはその断片、ＳＲＴの抗体、ＳＲＴのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなどの活性処方成分の量に関連する。治療有効度及び毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって、例えばED_{50}（集団の５０％の医薬的有効量）またはLD_{50}（集団の５０％の致死量）を測定するなどして決定することができる。毒性効果の薬用効果に対する投与量の比は、治療指数であり、LD_{50}／ED_{50}比として表すことができる。高い治療指数を示すような成分が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトに用いるための投与量の範囲を調剤するのに用いられる。このような組成物が含まれる投与量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、ED_{50}を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投与形態、患者の感受性及び投与の経路によって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。
【０２０１】
正確な投与量は、治療が必要な被験者に関する要素を考慮して、現場の医者が決定することになる。効果的なレベルの活性成分を与え、或いは所望の効果を維持するべく、投与量及び投与を調節する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、患者の通常の健康状態、患者の年齢、体重及び性別、投与の時間及び頻度、薬剤の配合、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮する。作用期間が長い成分は、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって３～４日毎に１度、１週間に１度、或いは２週間に１度の間隔で投与し得る。
【０２０２】
通常の投与量は、投与の経路にもよるが約０．１～１００，０００μｇであり、合計で約１ｇまでとする。特定の投与量及び送達方法に関するガイダンスは文献に記載されており、現場の医者は通常それを利用することができる。 当業者は、タンパク質またはインヒビターに対する処方とは異なる、ヌクレオチドに対する処方を利用することになる。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は、特定の細胞、状態、位置等に特異的なものとなる。
【０２０３】
（診断）
別の実施例では、ＳＲＴの発現によって特徴付けられる疾患の診断のために、或いはＳＲＴやＳＲＴのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤で治療を受けている患者をモニターするためのアッセイにおいて、ＳＲＴを特異的に結合する抗体が用いられることがある。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方法と同じ方法で調合される。

ＳＲＴの診断アッセイには、抗体及び標識を用いてヒトの体液或いは細胞や組織から採取されたものからＳＲＴを検出する方法が含まれる。この抗体は修飾されたものもされていないものも可能であり、レポーター分子との共有結合または非共有結合で標識化できる。レポーター分子としては広くさまざまな種類が本分野で知られており、また使用可能であるが、そのうちのいくつかは上記で説明されている。

【０２０４】

ＳＲＴを測定するためのＥＬＩＳＡ，ＲＩＡ，及びＦＡＣＳを含む種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変わった或いは異常なレベルのＳＲＴの発現を診断する元となるものを提供する。複合体の形成に適した条件下でヒト対象等の正常な哺乳動物対象から採取した体液または細胞とＳＲＴに対する抗体とを結合させることにより、ＳＲＴ発現の正常値または標準値が決定される。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。被験者のＳＲＴの発現の量、制御及び疾患、生検組織からのサンプルが基準値と比較される。標準値と被験者との偏差が疾患を診断するパラメータとなる。

【０２０５】

本発明の別の実施例によれば、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドを診断のために用いることもできる。用いることができるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的ＲＮＡ及びＤＮＡ分子、そしてＰＮＡが含まれる。このポリヌクレオチドを用いて、疾患と相関し得るＳＲＰを発現する生検組織における遺伝子の発現を検出し定量する。この診断アッセイを用いて、ＳＲＰの存在の有無、更に過剰な発現を調べ、治療中のＳＲＰ値の調節を監視する。

一実施形態では、ＳＲＰ または近縁の分子をコードする遺伝子配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なＰＣＲプローブを用いたハイブリダイゼーションによって、ＳＲＰ をコードする核酸配列を同定することが可能である。例えば５’調節領域である高度に特異的な領域か、例えば保存されたモチーフであるやや特異性の低い領域から作られているかのプローブの特異性と、ハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェントは、プローブがＳＲＰをコードする自然界の配列のみを同定するかどうか、或いはアレルや関連配列コードする自然界の配列のみを同定するかどうかによって決まるであろう。

【０２０６】

プローブはまた、関連する配列の検出にも用いることができ、その配列はＳＲＰをコードする任意の配列と少なくとも５０％の相同性を有し得る。目的の本発明のハイブリダイゼーションプローブには、ＤＮＡあるいはＲＮＡが可能であり、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６の配列、或いはＳＲＰ遺伝子のプロモーター、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

【０２０７】

ＳＲＰをコードするＤＮＡに対して特異的なハイブリダイゼーションプローブの作製方法には、ＳＲＰ及びＳＲＰ誘導体をコードするポリヌクレオチド配列をｍＲＮＡプローブの作製のためのベクターにクローニングする方法がある。ｍＲＮＡプローブ作製のためのベクターは、当業者に知られており、市販されており、好適なＲＮＡポリメラーゼ及び好適な標識されたヌクレオチドを加えることによって、ｉｎ ｖｉｔｒｏでＲＮＡプローブを合成するために用いられ得る。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のレポーターの集団によって標識され得る。 レポーター集団の例としては、^{32}Ｐまたは^{35}Ｓ等の放射性核種、或いはアビジン／ビオチン結合系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼ等の酵素標識などが挙げられる。

【０２０８】

ＳＲＰをコードするポリヌクレオチド配列は、ＳＲＰの発現に関係する疾患の診断の為に用い得る。｛｝限定するものではないが、このような疾患には；細胞増殖異常の中には日光性角化症、動脈硬化、アテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病（ＭＣＴＤ）、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頚部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、

肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれ、神経の疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側策硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー及びクロイツフェルト‐ヤコブ病、ゲルストマン症候群、Ｇｅｒｓｔｍａｎｎ－Ｓｔｒａｕｓｓｌｅｒ－Ｓｃｈｅｉｎｋｅｒ症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫（ｃｅｒｅｂｅｌｌｏｒｅｔｉｎａｌ ｈｅｍａｎｇｉｏｂｌａｓｔｏｍａｔｏｓｉｓ）、脳３叉神経血管症候群、ダウン症を含む中枢神経系性精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分性及び不安性の障害、分裂病性疾患を含む精神病と、季節性障害（ＳＡＤ）と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、及びトゥーレット病と、進行性核上麻痺、皮質基部変性（ｃｏｒｔｉｃｏｂａｓａｌ ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ）及び家族性の前頭側頭性健忘症とが含まれ、 遺伝的障害の中には、副腎白質萎縮症、アルポート症候群、コロイデレミア、デュシェンヌ‐ベッカー型筋ジストロフィー、ダウン症候群、嚢胞性線維症、慢性肉芽腫症、ゴーシェ病、ハンチントン舞踏病、マルファン症候群、筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、濃化異骨症、レフサム症候群、網膜芽細胞腫、鎌状赤血球貧血、地中海貧血症、Ｗｅｒｎｅｒ症候群、フォンウイルブランド病、Ｗｉｌｍｓ腫瘍、ツェルウェガー症候群、ペルオキシソームアシルＣｏＡ酸化酵素欠損症、ペルオキシソーム・チオラーゼ欠損症、ペルオキシソーム・チオラーゼ・プロテイン欠損症、、ミトコンドリアル・カルニチン・パルミトイル・トランスフェラーゼおよびカルニチン欠損症、ミトコンドリアル極長鎖アシルＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリアル中鎖アシルＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリアル短鎖アシルＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリアル電子伝達フラボプロテインおよび電子伝達フラボプロテイン・ユビキノン酸化還元酵素欠損症、ミトコンドリアル・トリファンクショナル・プロテイン欠損症、およびミトコンドリアル短鎖３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症が含まれ、 平滑筋異常の中には狭心症、アナフィラキシー性ショック、不整脈、喘息、心臓血管性ショック、クッシング症候群、高血圧、低血糖症、心筋梗塞、偏頭痛、およびクロム親和細胞腫（褐色細胞腫）、および心筋症、脳疾患、癲癇、カーンズ・セイヤー症候群、乳酸アシドーシス、筋クローヌス性疾患、および眼筋麻痺が含まれ、代謝異常の中にはアンモニア過剰血症， トリメチルアミヌリア（魚臭症候群）、３－ヒドロキシダイカルボキシリック酸尿症、ダイカルボキシリック酸尿症、 キサンチン尿症、先天性リポイド副腎過形成 （ＣＬＡＨ），ａｌｂｉｎｉｓｍ ｔｙｐｅ ＩＩＩ白皮症ＩＩＩ型、インシュリン過剰－アンモニア過剰血症候群（ＨＨＳ）、グルタル酸尿症Ｉ型、，家族性再発性ミオグロビン尿、インシュリン耐性、突発性シデレオブラスティック貧血（ＡＩＳＡ） 、新生児型副腎脳白質ジストロフィー、低酸素症、損傷による組織への障害増進、放射線および紫外線被曝、肝機能不全、，顕著な肥満、メトヘモグロビン血症（ＨＭ１， ＨＭ２， およびＨＭ３）、無月経を伴う発毛異常およびハーマンスキー・プゥドラック症候群が含まれる。{} ＳＲＰをコードするポリヌクレオチド配列は、サザーン法やノーザン法、ドットブロット法、或いはその他の膜系の技術、ＰＣＲ法、ディップスティック（ｄｉｐｓｔｉｃｋ）、ピン（ｐｉｎ）、ＥＬＩＳＡ式アッセイ、及び変異ＳＲＰの発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用するマイクロアレイに使用することが可能である。このような定性方法または定量方法は、当分野で公知である。

【０２０９】

ある実施態様では、ＳＲＰをコードするヌクレオチド配列は、関連する疾患、特に上記し

た疾患を検出するアッセイにおいて有用であろう。ＳＲＰをコードするヌクレオチド配列は、標準的な方法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下で、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができるであろう。好適なインキュベーション期間が経過したらサンプルを洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。患者のサンプルのシグナルの量が、制御サンプルと較べて著しく変わっている場合は、サンプル内のＳＲＰをコードするヌクレオチド配列の変異レベルにより、関連する疾患の存在が明らかになる。このようなアッセイは、動物実験、臨床試験における特定の治療効果を推定するため、或いは個々の患者の治療をモニターするために用いることもできる。

【０２１０】

ＳＲＰの発現に関連する疾患の診断基準を提供するために、発現のための正常あるいは標準概要を確立する。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件下で、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から抽出された体液或いは細胞と、ＳＲＰをコードする配列或いはその断片とを結合させることにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量用いて行った実験から得た値を正常な対象から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾患の存在を確定する。

【０２１１】

疾患の存在が確定されて治療プロトコルが開始されると、患者の発現レベルが正常な被検者に観察されるレベルに近づき始めたかどうかを測定するため、ハイブリダイゼーションアッセイを通常ベースで繰り返し得る。連続アッセイから得られた結果を用いて、数日から数ヶ月の期間にわたる治療の効果を示し得る。

【０２１２】

癌に関しては、個体からの生体組織における異常な量の転写物（過少発現または過剰発現）の存在は、疾患の発生素質を示したり、実際に臨床的症状が現れる前に疾患を検出する方法を提供したりし得る。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法または積極的な治療法を早くから利用し、それによって癌の発生または更なる進行を防止することが可能となる。

【０２１３】

ＳＲＰをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドのさらなる診断への利用には、ＰＣＲの利用が含まれ得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成するか、酵素により生産するか、或いはｉｎ ｖｉｔｒｏで産出し得る。オリゴマーは、好ましくはＳＲＰをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはＳＲＰをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適な条件の下、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェント条件下で、近縁のＤＮＡ或いはＲＮＡ配列の検出、定量、或いはその両方のため用いることが可能である。

【０２１４】

或る態様において、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて１塩基ヌクレオチド多形性（ＳＮＰ）を検出し得る。ＳＮＰは、多くの場合にヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となるような置換、挿入及び欠失である。限定するものではないがＳＮＰの検出方法には、ＳＳＣＰ（ｓｉｎｇｌｅ－ｓｔｒａｎｄｅｄ ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ）及び蛍光ＳＳＣＰ（ｆＳＳＣＰ）法がある。ＳＳＣＰでは、ＳＲＰ をコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）でＤＮＡを増幅する。ＤＮＡは例えば、病変組織または正常組織、生検サンプル、体液その他に由来し得る。ＤＮＡ内のＳＮＰは、一本鎖形状のＰＣＲ生成物の２次及び３次構造に差異を生じさせる。 差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。ｆＳＣＣＰでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光性に標識する。 それによってＤＮＡシークエンシング機などの高処理機器でアンプリマー（ａｍｐｌｉｍｅｒ）の検出が可能になる。更

に、インシリコＳＮＰ（ｉｎ ｓｉｌｉｃｏ ＳＮＰ，ｉｓＳＮＰ）と呼ばれる配列データベース分析法は、一般的なコンセンサス配列に配列されるような個々の重畳するＤＮＡ断片の配列を比較することにより、多形性を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、ＤＮＡの実験室での調整及び統計モデル及びＤＮＡ配列クロマトグラムの自動分析を用いたシークエンシングのエラーに起因する配列の変異をフィルタリングして除去する。別の態様では、例えば高処理ＭＡＳＳＡＲＲＡＹシステム（Ｓｅｑｕｅｎｏｍ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ ＣＡ）を用いた質量分析によりＳＮＰを検出し、特徴付ける。

【０２１５】

ＳＲＰの発現を定量するために用い得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、調節核酸の相互増幅（ｃｏａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）及び標準曲線から得た結果の補間もある（例えば、Ｍｅｌｂｙ，Ｐ．Ｃ．ら（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１５９：２３５－２４４；Ｄｕｐｌａａ，Ｃ．ら（１９９３）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２１２：２２９－２３６を参照）目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または比色反応によって定量が迅速になるような高処理フォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

【０２１６】

更に別の実施例では、本明細書で記載した任意のポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、マイクロアレイにおけるエレメントとして用いることができる。多数の遺伝子の関連発現レベルを同時にモニターする転写イメージング技術にマイクロアレイを用いることが可能である。 これについては、以下に記載する。マイクロアレイはまた、遺伝変異体、突然変異及び多形性の同定に用いることができる。この情報を用いることで、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、遺伝子発現の機能としての疾病の進行／後退をモニターし、疾病治療における薬剤の活性を開発及びモニターすることができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効的な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロフィールを開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロフィールに基づき、患者に対して高度に有効的で副作用を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

【０２１７】

別の実施例では、ＳＲＰに特異的な抗体、ＳＲＰまたはその断片をマイクロアレイ上で要素として用いることができる。マイクロアレイを用いて、上記のようなタンパク質－タンパク質相互作用、薬剤－標的相互作用及び遺伝子発現プロフィールをモニターまたは測定することが可能である。

【０２１８】

或る実施例は、或る組織または細胞タイプの転写イメージを生成するような本発明のポリヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織または細胞タイプにより遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所与の条件下で所与の時間に発現した遺伝子の数及び相対存在量を定量することにより分析し得る（Ｓｅｉｌｌｉａｍｅｒ らの米国特許第５，８４０，４８４号 ”Ｃｏｍｐａｒａｔｉｖｅ Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔ Ａｎａｌｙｓｉｓ” を参照。該特許は特に引用することを以って本明細書の一部となす）。従って、特定の組織または細胞タイプの転写または逆転写全体に本発明のポリヌクレオチドまたはその補体をハイブリダイズすることにより、転写イメージを生成し得る。或る実施例では、本発明のポリヌクレオチドまたはその補体がマイクロアレイ上のエレメントのサブセットを複数含むような高処理フォーマットでハイブリダイゼーションを発生させる。結果として得られる転写イメージは、遺伝子活性のプロフィールを提供し得る。

【０２１９】

転写イメージは、組織、株化細胞、生検またはその生物学的サンプルから単離した転写物を用いて生成し得る。転写イメージは従って、組織または生検サンプルの場合にはｉｎ

ｖｉｖｏ、または株化細胞の場合にはｉｎ ｖｉｔｒｏでの遺伝子発現を反映する。

【０２２０】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロフィールを作製する転写イメージはまた、工業的または天然の環境化合物の毒性試験のみならず、ｉｎ ｖｉｔｒｏモデル系及び薬剤の前臨床評価に関連して使用し得る。全ての化合物は、作用及び毒性のメカニズムを暗示する、しばしば分子フィンガープリントまたは毒性サインと称されるような特徴的な遺伝子発現パターンを惹起する（Ｎｕｗａｙｓｉｒ，Ｅ．Ｆ．ら．（１９９９）Ｍｏｌ．Ｃａｒｃｉｎｏｇ．２４：１５３－１５９、Ｓｔｅｉｎｅｒ，Ｓ．ａｎｄ Ｎ．Ｌ．Ａｎｄｅｒｓｏｎ（２０００）Ｔｏｘｉｃｏｌ．Ｌｅｔｔ．１１２－１１３：４６７－４７１、該文献は特に引用することを以って本明細書の一部となす）。試験化合物が、既知の毒性を有する化合物のシグネチャと同一のシグネチャを有する場合には、毒性特性を共有している可能性がある。フィンガープリントまたはシグネチャは、多数の遺伝子及び遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいる場合には、最も有用且つ正確である。理想的には、発現のゲノム全域にわたる測定が最高品質のシグネチャを提供する。自己の発現が任意の試験された化合物により変化しない遺伝子が同様に重要であっても、このような遺伝子の発現レベルを用いて残りの発現データを規準化する。規準化手順は、異なる化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。毒性シグネチャの要素に遺伝子機能を割り当てることが毒性メカニズムの解釈に役立つが、毒性の予測につながるシグネチャの統計的に一致させるのに遺伝子機能の知識は必要とされない（例えば２０００年２月２９日にＮａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｃｉｅｎｃｅｓより発行されたＰｒｅｓｓ Ｒｅｌｅａｓｅ ００－０２を参照されたい。これについてはｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｉｅｈｓ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｏｃ／ｎｅｗｓ／ｔｏｘｃｈｉｐ．ｈｔｍで入手可能である）。従って、中毒学的スクリーニングの際に毒性シグネチャを用いて、全ての発現した遺伝子配列を含めることは重要且つ望ましいことである。

【０２２１】

或る実施例では、核酸を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。処理した生物学的サンプル中で発現した核酸は、本発明のポリヌクレオチドに特異的な１つ若しくは複数のプローブでハイブリダイズし、それによって本発明のポリヌクレオチドに対応する転写レベルを定量し得る。処理した生物学的サンプル中の転写レベルを、非処理生物学的サンプル中のレベルと比較する。両サンプルの転写レベルの差は、処理されたサンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を示す。

【０２２２】

別の実施例は、本発明のポリペプチド配列を用いて組織または細胞タイプのプロテオームを分析することに関連する。プロテオームの語は、特定の組織または細胞タイプでのタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームの各タンパク質成分は、個々に更に分析の対象とすることができる。プロテオーム発現パターン即ちプロフィールは、所与の条件下で所与の時間に発現したタンパク質の数及び相対存在量を定量することにより分析し得る。従って細胞のプロテオームのプロフィールは、特定の組織または細胞タイプのポリペプチドを分離及び分析することにより作成し得る。或る実施例では、１次元等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、２次元ドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に応じて分離するような２次元ゲル電気泳動により分離が達成される（前出のＳｔｅｉｎｅｒ および Ａｎｄｅｒｓｏｎ）。タンパク質は、通常クーマシーブルーまたはシルバーまたは蛍光染色などの物質を用いてゲルで染色することにより、分散した、独特な位置にある点としてゲル中で可視化される。各タンパク質スポットの光学密度は、通常サンプル中のタンパク質レベルに比例する。異なるサンプル、例えば試験化合物または治療薬で処理または非処理のいずれかの生物学的サンプルから得られるタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を同定する。スポット内のタンパク質は、例えば化学的または酵素的切断とそれに続く質量分析を用いる標準的な方法を用いて部分的にシークエンシングする。スポット内のタンパク質

の同一性は、その部分配列を、好適には少なくとも５個の連続するアミノ酸残基を、本発明のポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列が得られる。

【０２２３】

プロテオームのプロファイルは、ＳＲＰに特異的な抗体を用いてＳＲＰ発現レベルを定量することによっても作成可能である。或る実施例では、マイクロアレイ上でエレメントとして抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝して各アレイ要素へのタンパク質結合レベルを検出することによりタンパク質発現レベルを定量する（Ｌｕｅｋｉｎｇ，Ａ．ら（１９９９）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｒｎ．２７０：１０３－１１１、Ｍｅｎｄｏｚｅ，Ｌ．Ｇ．ら（１９９９）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ２７：７７８－７８８を参照）。検出は当分野で既知の様々な方法で行うことができ、例えば、チオールまたはアミノ反応性蛍光化合物を用いてサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイのエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

【０２２４】

プロテオームレベルでの毒性サインも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写レベルでの毒性サインと並行に分析するべきである。或る組織の或るタンパク質に対しては、転写とタンパク質の存在量の相関が乏しいこともあるので（Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｎ．Ｌ．およびＪ．Ｓｅｉｌｈａｍｅｒ（１９９７）Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ１８：５３３－５３７）、転写イメージにはそれ程影響しないがタンパク質のプロフィールを変化させるような化合物の分析においてプロテオーム毒性サインは有用たり得る。更に、体液中での転写の分析はｍＲＮＡ急速な分解により困難であるので、タンパク質のプロフィール作成はこのような場合により信頼でき、情報価値がある。

【０２２５】

別の実施例では、タンパク質を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。処理された生物学的サンプル中で発現したタンパク質は、各タンパク質の量を定量し得るように分離する。各タンパク質の量を、非処理生物学的サンプル中の対応するタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する反応を示す。個々のタンパク質は、個々のタンパク質のアミノ酸残基をシークエンシングし、これら部分配列を本発明のポリペプチドと比較することにより同定する。

【０２２６】

別の実施例では、タンパク質を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。生物学的サンプルから得たタンパク質は、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いてインキュベートする。抗体により認識されたタンパク質の量を定量する。処理された生物学的サンプル中のタンパク質の量を、非処理生物学的サンプル中のタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する反応を示す。

【０２２７】

マイクロアレイは、本技術分野でよく知られている方法を用いて調製し、使用し、そして分析する（Ｂｒｅｎｎａｎ，Ｔ．Ｍ．ら（１９９５）の米国特許第５，４７４，７９６号、Ｓｃｈｅｎａ，Ｍ．ら（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９３：１０６１４－１０６１９、Ｂａｌｄｅｓｃｈｗｅｉｌｅｒらの（１９９５）ＰＣＴ出願第ＷＯ９５／２５１１６号、Ｓｈａｌｏｎ，Ｄ．らの（１９９５）ＰＣＴ出願第ＷＯ９５／３５５０５号、Ｈｅｌｌｅｒ，Ｒ．Ａ．ら（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９４：２１５０－２１５５、Ｈｅｌｌｅｒ，Ｍ．Ｊ．らの（１９９７）米国特許第５，６０５，６６２号等を参照）。（１９９５）米国特許第５，４７４，７９６号、Ｓｃｈｅｎａ，．Ｍ他（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９３：１０６１４－１０６１９；Ｂａｌｄｅｓｃｈｗｅｉｌｅｒ．他（１９９５）ＰＣＴ出願番号ＷＯ８４／０３５６４、Ｓｈａｌｏｎ，Ｄ他を参照）（１９９５）ＰＣＴ出願番号ＷＯ９５／３５

５０５、Ｈｅｌｌｅｒ，Ｒ．Ａ．他を参照）（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９４：２１５０－２１５５；及びＨｅｌｌｅｒ，Ｍ．Ｊ．他（１９９７）米国特許第５，６０５，６６２号）。様々なタイプのマイクロアレイが周知であり、詳細については、ＤＮＡ Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｍ．Ｓｃｈｅｎａ，ｅｄ．（１９９９）Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎに記載されている。該文献は、特別に引用することを以って本明細書の一部となす。

【０２２８】

本発明の別の実施例ではまた、ＳＲＰをコードする核酸配列を用いて、天然のゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブを作製することが可能である。コード配列または非コード配列のいずれかを用いることができ、或る例では、コード配列全体で非コード配列が好ましい。例えば、多重遺伝子ファミリーのメンバー内でのコード配列の保存により、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体（ＨＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、細菌Ｐ１産物、或いは単一染色体ｃＤＮＡライブラリに対してマッピングされる（Ｈａｒｒｉｎｇｔｏｎ，Ｊ．Ｊ．ら（１９９７）Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ．１５：３４５－３５５、Ｐｒｉｃｅ，Ｃ．Ｍ．（１９９３）Ｂｌｏｏｄ Ｒｅｖ．７：１２７－１３４、Ｔｒａｓｋ，Ｂ．Ｊ．（１９９１）Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．７：１４９－１５４等を参照）（１９９７）Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．１５：３４５－３５５；Ｐｒｉｃｅ，Ｃ．Ｍ．（１９９３）Ｂｌｏｏｄ Ｒｅｖ．７：１２７１３４；ａｎｄ Ｔｒａｓｋ，Ｂ．Ｊ．（１９９１）Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．７：１４９１５４．）一度マッピングすると、本発明の核酸配列を用いて例えば病状の遺伝を特定の染色体領域の遺伝または制限酵素断片長多型（ＲＦＬＰ）と相関させるような遺伝子連鎖地図を発生させ得る。（例えば、Ｌａｎｄｅｒ，Ｅ．Ｓ．ａｎｄ Ｄ．Ｂｏｔｓｔｅｉｎ（１９８６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８３：７３５３－７３５７を参照。）

蛍光原位置ハイブリッド形成法（ＦＩＳＨ）は、他の物理的及び遺伝地図データと相関し得る（前出のＨｅｉｎｚ－Ｕｌｒｉｃｈ，ら（１９９５）ｉｎ Ｍｅｙｅｒｓ，９６５－９６８ページ．等を参照）。遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいはＯｎｌｉｎｅ Ｍｅｎｄｅｌｉａｎ Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｉｎ Ｍａｎ（ＯＭＩＭ）のウェブサイトに見ることができる。物理的染色体地図上のＳＲＰをコードする遺伝子の位置と特定の疾患との相関性或いは特定の疾患に対する素因は、その疾患に関係するＤＮＡの領域を画定するのに役立ち得るものであり、従って更に位置クローニングする試みとなり得る。

【０２２９】

確定した染色体マーカーを用いた結合分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位置ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。例えばマウスなど別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置することにより、正確な染色体の遺伝子座がわかっていない場合でも関連するマーカーを明らかにし得る。この情報は、位置クローニングその他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探す研究者にとって価値がある。疾患または症候群が、血管拡張性失調症の１１ｑ２２－２３領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域に対するいかなるマッピングも、更なる調査のための関連遺伝子或いは調節遺伝子を表すことができる（Ｇａｔｔｉ，Ｒ．Ａ．ら（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ ３３６：５７７－５８０等を参照）（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ ３３６：５７７－５８０．を参照）。転座、反転等に起因する、健常者、保有者、感染者の三者間における染色体位置の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

【０２３０】

本発明の別の実施例では、ＳＲＰ、その触媒作用断片或いは免疫原断片またはそのオリゴ

ペプチドを、種々の任意の薬剤スクリーニング技術における化合物のライブラリのスクリーニングに用いることができる。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置することになろう。ＳＲＰと検査する薬剤との結合による複合体の形成を測定してもよい。

【０２３１】

別の薬剤スクリーニング方法は、目的のタンパク質に対して好適な結合親和性を有する化合物を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる（Ｇｅｙｓｅｎ，らの（１９８４）ＰＣＴ出願番号ＷＯ８４／０３５６４等を参照）。この方法においては、多数の異なる小さな試験用化合物を固体基質上で合成する。次に、本技術分野でよく知られている方法で、結合したＳＲＰを検出する。次に、本技術分野でよく知られている方法で、結合したＳＲＰを検出する。精製したＳＲＰはまた、上記した薬剤のスクリーニング技術において用いるプレート上で直接コーティングすることもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

【０２３２】

別の実施例では、ＳＲＰと結合可能な中和抗体がＳＲＰと結合するため試験用化合物と特に競合する、競合的薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この方法では、抗体が、ＳＲＰと１つ以上の抗原決定因子を共有するどのペプチドの存在も検出する。

【０２３３】

別の実施例では、発展途上の分子生物学技術にＳＲＰをコードするヌクレオチド配列を用いて、限定はされないが、現在知られているトリプレット暗号及び特異的な塩基対相互作用などのヌクレオチド配列の特性に依存する新しい技術を提供することができる。

【０２３４】

更に詳細説明をしなくとも、当業者であれば以上の説明を以って本発明を最大限に利用できるであろう。従って、これ以下に記載する実施例は単なる例示目的にすぎず、いかようにも本発明を限定するものではない。

前述した及び以下に記載する全ての特許出願、特許、刊行物、特に米国特許出願第６０／２１３，９５７号に言及することをもって本明細書の一部とする。

【０２３５】

（実施例）

１　ｃＤＮＡライブラリの作製

Ｉｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡは、ＬＩＦＥＳＥＱ ＧＯＬＤデータベース（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ ＣＡ）に記載されたｃＤＮＡライブラリに由来するものであり、表４の列５に列記した。ホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解した組織もあり、また、ホモジナイズしてフェノールまたは好適な変性剤の混合液に溶解した組織もある。変性剤の混合液は、例えばフェノールとグアニジニウムイソチオシアネートの単相溶液であるＴＲＩＺＯＬ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）等である。結果として得られた溶解物は、塩化セシウムクッション上で遠心分離するかクロロホルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からＲＮＡを沈殿させた。

【０２３６】

ＲＮＡの純度を高めるため、ＲＮＡのフェノールによる抽出及び沈殿を必要な回数繰り返した。場合によっては、ＤＮアーゼでＲＮＡを処理した。殆どのライブラリでは、オリゴｄ（Ｔ）連結常磁性粒子（Ｐｒｏｍｅｇａ）、ＯＬＩＧＯＴＥＸラテックス粒子（ＱＩＡＧＥＮ，Ｖａｌｅｎｃｉａ ＣＡ）またはＯＬＩＧＯＴＥＸ ｍＲＮＡ精製キット（ＱＩＡＧＥＮ）を用いて、ポリ（Ａ＋）ＲＮＡを単離した。別法では、別のＲＮＡ単離キット、例えばＰＯＬＹ（Ａ）ＰＵＲＥ ｍＲＮＡ精製キット（Ａｍｂｉｏｎ，Ａｕｓｔｉｎ ＴＸ）を用いて組織溶解物からＲＮＡを直接単離した。

【０２３７】

場合によってはＳｔｒａｔａｇｅｎｅ社へのＲＮＡ提供を行い、対応するｃＤＮＡライブラリをＳｔｒａｔａｇｅｎｅ社が作製することもあった。そうでない場合は、ＵＮＩＺＡ

Ｐベクターシステム（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）またはＳＵＰＥＲＳＣＲＩＰＴプラスミドシステム（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて本技術分野で公知の推奨方法または類似の方法でｃＤＮＡを合成し、ｃＤＮＡライブラリを作製した（前出のＡｕｓｕｂｅｌ，１９９７，ｕｎｉｔ ５．１－６．６等を参照）。逆転写は、オリゴｄ（Ｔ）またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖ｃＤＮＡに連結反応させ、好適な制限酵素でｃＤＮＡを消化した。殆どのライブラリに対して、ｃＤＮＡのサイズ（３００～１０００ｂｐ）選択は、ＳＥＰＨＡＣＲＹＬ Ｓ１０００、ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ ＣＬ２ＢまたはＳＥＰＨＡＲＯＳＥ ＣＬ４Ｂカラムクロマトグラフィー（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）、或いは調製用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。 合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖ｃＤＮＡに連結反応させ、好適な制限酵素または酵素でｃＤＮＡを消化した。 好適なプラスミドは、例えばＰＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴプラスミド（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ｐＳＰＯＲＴ１プラスミド（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）またはｐｌＮＣＹ（Ｉｎｃｙｔｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ ＣＡ）等である。組換えプラスミドは、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社のＸＬ１－Ｂｌｕｅ、ＸＬ１－ＢＩｕｅＭＲＦまたはＳＯＬＲ、或いはＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社のＤＨ５α、ＤＨ１０ＢまたはＥＬＥＣＴＲＯＭＡＸ ＤＨ１０Ｂを含むコンピテント大腸菌細胞に形質転換した。

【０２３８】

２　ｃＤＮＡクローンの単離

ＵＮＩＺＡＰベクターシステム（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いたｉｎ ｖｉｖｏ切除によって、或いは細胞溶解によって、実施例１のようにして得たプラスミドを宿主細胞から回収した。 Ｐｌａｓｍｉｄｓ ｗｅｒｅ ｐｕｒｉｆｉｅｄ ｕｓｉｎｇ ａｔ ｌｅａｓｔ ｏｎｅ ｏｆ ｔｈｅ ｆｏｌｌｏｗｉｎｇ：ＭａｇｉｃまたはＷＩＺＡＲＤ Ｍｉｎｉｐｒｅｐｓ ＤＮＡ精製システム（Ｐｒｏｍｅｇａ）、ＡＧＴＣ Ｍｉｎｉｐｒｅｐ精製キット（Ｅｄｇｅ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ ＭＤ）、ＱＩＡＧＥＮ社のＱＩＡＷＥＬＬ ８ Ｐｌａｓｍｉｄ、ＱＩＡＷＥＬＬ ８ Ｐｌｕｓ Ｐｌａｓｍｉｄ及びＱＩＡＷＥＬＬ ８ Ｕｌｔｒａ Ｐｌａｓｍｉｄ 精製システム、Ｒ．Ｅ．Ａ．Ｌ．Ｐｒｅｐ ９６プラスミドキットの中から少なくとも１つを用いて、プラスミドを精製した。プラスミドは、沈殿させた後、０．１ｍｌの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで４℃で保管した。

【０２３９】

別法では、高処理フォーマットにおいて直接結合ＰＣＲ法を用いて宿主細胞溶解物からプラスミドＤＮＡを増幅した（Ｒａｏ，Ｖ．Ｂ．（１９９４）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２１６：１－１４）。宿主細胞の溶解及び熱サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルを処理し、それを３８４穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドＤＮＡの濃度をＰＩＣＯＧＲＥＥＮ色素（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ ＯＲ）及びＦｌｕｏｒｏｓｋａｎ ＩＩ蛍光スキャナ（Ｌａｂｓｙｓｔｅｍｓ Ｏｙ，Ｈｅｌｓｉｎｋｉ，Ｆｉｎｌａｎｄ）を用いて蛍光分析的に定量した。

【０２４０】

３　シークエンシング及び分析

実施例２に記載したようにプラスミドから回収したＩｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡを、以下に示すようにシークエンシングした。ｃＤＮＡのシークエンス反応は、標準的方法或いは高処理装置、例えばＡＢＩ ＣＡＴＡＬＹＳＴ ８００ サーマルサイクラー（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）またはＰＴＣ－２００ サーマルサイクラー（ＭＪ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）をＨＹＤＲＡマイクロディスペンサー（Ｒｏｂｂｉｎｓ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）またはＭＩＣＲＯＬＡＢ ２２００（Ｈａｍｉｌｔｏｎ）液体転移システムと併用して処理した。 ｃＤＮＡのシークエンス反応は、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ社が提供する試薬またはＡＢＩシークエンシングキット、例えばＡＢＩ ＰＲＩＳＭ ＢＩＧＤＹＥ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ ｃｙｃｌｅ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｒｅａ

ｄｙ ｒｅａｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）に与えられた試薬を用いて準備した。ｃＤＮＡのシークエンス反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、ＭＥＧＡＢＡＣＥ １０００ ＤＮＡシークエンシングシステム（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｙｎａｍｉｃｓ）か、標準ＡＢＩプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いるＡＢＩ ＰＲＩＳＭ ３７３または３７７シークエンシングシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）か、或いはその他の本技術分野でよく知られている配列解析システムを用いた。 ｃＤＮＡ配列内のリーディングフレームは、標準的方法（前出のＡｕｓｕｂｅｌ，１９９７，ｕｎｉｔ ７．７に概説）を用いて決定した。ｃＤＮＡ配列の幾つかを選択して、実施例８に記載した方法で配列を伸長させた。

【０２４１】

Ｉｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ配列に由来するポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリ（Ａ）配列を除去し、あいまいな塩基対をマスクすることによって有効性を確認した。 その際、ＢＬＡＳＴ、動的プログラミング及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。次に、ＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡ及びＢＬＩＭＰＳに基づくプログラムを用いて、プログラム中の注釈を得るべく、公共のデータベース、例えばＧｅｎＢａｎｋの霊長類及びげっ歯類、哺乳動物、脊椎動物、真核生物のデータベースと、ＢＬＯＣＫＳ、ＰＲＩＮＴＳ、ＤＯＭＯ、ＰＲＯＤＯＭ及びＰＦＡＭ等のＨｉｄｄｅｎ Ｍａｒｋｏｖ Ｍｏｄｅｌ（ＨＭＭ）ベースのタンパク質ファミリーデータベースの選択に対するＩｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ配列またはその翻訳を問い合わせたＨＭＭは、遺伝子ファミリーのコンセンサス１次構造を解析する確率的アプローチである（Ｅｄｄｙ，Ｓ．Ｒ．（１９９６）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．６：３６１－３６５等を参照）。問合せは、ＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＩＭＰＳ及びＨＭＭＥＲに基づくプログラムを用いて行った。Ｉｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ配列は、完全長のポリヌクレオチド配列を産出するように構築した。或いは、ＧｅｎＢａｎｋ ｃＤＮＡ、ＧｅｎＢａｎｋ ＥＳＴ、ステッチされた配列、ストレッチされた配列またはＧｅｎｓｃａｎ予測コード配列（実施例４及び５を参照）を用いてＩｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡの集団を完全長まで伸長させた。Ｐｈｒｅｄ、Ｐｈｒａｐ及びＣｏｎｓｅｄに基づくプログラムを用いて構築し、ＧｅｎＭａｒｋ、ＢＬＡＳＴ及びＦＡＳＴＡに基づくプログラムを用いてｃＤＮＡの集団をオープンリーディングフレームに対してスクリーニングした。対応する完全長ポリペプチド配列を誘導するべく完全長ポリヌクレオチド配列を翻訳した。或いは、本発明のポリペプチドは完全長翻訳ポリペプチドの任意のメチオニン残基で開始し得る。引き続いて、ＧｅｎＢａｎｋタンパク質データベース（ｇｅｎｐｅｐｔ）、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ、ＢＬＯＣＫＳ、ＰＲＩＮＴＳ、ＤＯＭＯ、ＰＲＯＤＯＭ及びＰｒｏｓｉｔｅ等のデータベース、ＰＦＡＭ等の隠れマルコフモデル（ＨＭＭ）ベースのタンパク質ファミリーデータベースに対する問合せによって完全長ポリペプチド配列を分析した。完全長ポリヌクレオチド配列はまた、ＭＡＣＤＮＡＳＩＳ ＰＲＯソフトウェア（日立ソフトウェアエンジニアリング，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ ＣＡ）及びＬＡＳＥＲＧＥＮＥソフトウェア（ＤＮＡＳＴＡＲ）を用いて分析した。ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列アラインメントは、アラインメントした配列と配列の一致率も計算するＭＥＧＡＬＩＧＮマルチシークエンスアラインメントプログラム（ＤＮＡＳＴＡＲ）に組み込まれているようなＣＬＵＳＴＡＬアルゴリズムによって特定されるデフォルトパラメータを用いて生成する。

【０２４２】

Ｉｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ及び完全長配列の分析及びアセンブリに利用したツール、プログラム及びアルゴリズムの概略と、適用可能な説明、引用文献、閾値パラメータを表７に示す。用いたツール、プログラム及びアルゴリズムを表７の列１に、それらの簡単な説明を列２に示す。 列３は好適な引用文献であり、全ての文献はそっくりそのまま引用を以って本明細書の一部となす。 適用可能な場合には、列４は２つの配列が一致する強さを評価するために用いたスコア、確率値その他のパラメータを示す（スコアが高ければ高いほど２配列間の相同性が高くなる）。

【０２４３】
完全長のポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列の組み立て及び分析に用いる上記のプログラムは、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６のポリヌクレオチド配列断片の同定にも利用できる。 ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用である約２０～約４０００ヌクレオチドの断片を表４の列４に示した。
【０２４４】
４　ゲノムＤＮＡからのコード配列の同定及び編集
推定分泌性酸化還元タンパク質は、公共のゲノム配列データベース（例えば、ｇｂｐｒｉやｇｂｈｔｇ）においてＧｅｎｓｃａｎ遺伝子同定プログラムを実行して初めに同定された。Ｇｅｎｓｃａｎは、様々な生物からゲノムＤＮＡ配列を分析する汎用遺伝子同定プログラムである（Ｂｕｒｇｅ，Ｃ．およびＳ．Ｋａｒｌｉｎ（１９９７）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６８：７８－９４及びＢｕｒｇｅ，Ｃ．及びＳ．Ｋａｒｌｉｎ（１９９８）Ｃｕｆｆ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．８：３４６－３５４参照）。プログラムは予測エキソンを連結し、メチオニンから停止コドンに及ぶ構築されたｃＤＮＡ配列を形成する。Ｇｅｎｓｃａｎの出力は、ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列のＦＡＳＴＡデータベースである。Ｇｅｎｓｃａｎが一度に分析する配列の最大範囲は、３０ｋｂに設定した。これらのＧｅｎｓｃａｎ推定ｃＤＮＡ配列の内、どの配列が分泌性蛋白をコードするかを決定するために、コードされたポリペプチドをＰＦＡＭモデルにおいて分泌性酸化還元タンパク質について問合せて分析した。潜在的な分泌性酸化還元タンパク質が、分泌性酸化タンパク質としてアノテーションが付けられたインサイトｃＤＮＡ配列に対する相同性を基に同定された。こうして選択されたＧｅｎｓｃａｎ予測配列は、次にＢＬＡＳＴ分析により公共データベースｇｂｐｒｉ及びｇｂｈｔｇと比較した。必要であれば、ｇｅｎｐｅｐｔからヒットしたトップのＢＬＡＳＴと比較することによりＧｅｎｓｃａｎ予測配列を編集し、余分なまたは取り除かれたエキソンなどのＧｅｎｓｃａｎにより予測された配列のエラーを修正する。ＢＬＡＳＴ分析はまた、任意のＩｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡまたはＧｅｎｓｃａｎ予測配列の公共ｃＤＮＡ適用範囲の発見に用いられるので、転写の証拠を提供する。Ｉｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ適用範囲が利用できる場合には、この情報を用いてＧｅｎｓｃａｎ予測配列を修正または確認した。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例３に記載された構築プロセスを用いて、Ｉｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ配列及び／または公共のｃＤＮＡ配列でＧｅｎｓｃａｎ予測コード配列を構築することにより得た。或いは、完全長ポリヌクレオチド配列は編集または非編集のＧｅｎｓｃａｎ予測コード配列に完全に由来する。
【０２４５】
５　ｃＤＮＡ配列データを使ったゲノム配列データの構築
ステッチ配列（Ｓｔｉｃｈｅｄ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ）
部分ｃＤＮＡ配列は、実施例４に記載のＧｅｎｓｃａｎ遺伝子同定プログラムにより予測されたエキソンを用いて伸長させた。実施例３に記載されたように構築された部分ｃＤＮＡは、ゲノムＤＮＡにマッピングし、関連するｃＤＮＡ及び１つ若しくは複数のゲノム配列から予測されたＧｅｎｓｃａｎエキソンを含むクラスタに分解した。ｃＤＮＡ及びゲノム情報を統合するべくグラフ理論及び動的プログラミングに基づくアルゴリズムを用いて各クラスタを分析し、引き続いて確認、編集または伸長して完全長配列を産出するような潜在的スプライス変異体を生成した。間隔全体の長さがクラスタ中の２以上の配列に存在するような配列を同定し、そのように同定された間隔は推移により等しいと考えられた。例えば、１つのｃＤＮＡ及び２つのゲノム配列に間隔が存在する場合、３つの間隔は全て等しいと考えられる。このプロセスは、無関係であるが連続したゲノム配列をｃＤＮＡ配列により結び合わせて架橋し得る。このようにして同定された区間を、親配列（ｐａｒｅｎｔ ｓｅｑｕｅｎｃｅ）に沿って現われるようにステッチアルゴリズムで縫い合わせ、可能な最も長い配列および変異配列を作製する。１種類の親配列に沿って発生した間隔と間隔との連鎖（ｃＤＮＡ－ｃＤＮＡまたはゲノム配列－ゲノム配列）は、親の種類を変える連鎖（ｃＤＮＡ－ゲノム配列）に優先した。結果として得られるステッチ配列は、ＢＬ

ＡＳＴ分析により公共データベースｇｅｎｐｅｐｔ及びｇｂｐｒｉに翻訳されて比較された。Ｇｅｎｓｃａｎにより予測された不正確なエキソンは、ｇｅｎｐｅｐｔからヒットしたトップのＢＬＡＳＴと比較することにより修正した。必要な場合には、追加ｃＤＮＡ配列を用いるかゲノムＤＮＡの検査により配列を更に伸長させた。

【０２４６】

ストレッチ配列（Ｓｔｒｅｔｃｈｅｄ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ）

部分ＤＮＡ配列は、ＢＬＡＳＴ分析に基づくアルゴリズムにより完全長まで伸長された。先ず、ＢＬＡＳＴプログラムを用いて、ＧｅｎＢａｎｋの霊長類、げっ歯類、哺乳動物、脊椎動物及び真核生物のデータベースなどの公共データベースに対し、実施例３に記載されたように構築された部分ｃＤＮＡを問い合わせた。次に、最も近いＧｅｎＢａｎｋタンパク質相同体をＢＬＡＳＴ分析によりＩｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ配列または実施例４に記載のＧｅｎＳｃａｎエキソン予測配列のいずれかと比較した。結果として得られる高スコアリングセグメント対（ＨＳＰ）を用いてキメラタンパク質を産出し、翻訳した配列をＧｅｎＢａｎｋタンパク質相同体上にマッピングした。元のＧｅｎＢａｎｋタンパク質相同体に関連して、キメラタンパク質内で挿入または削除が起こり得る。ＧｅｎＢａｎｋタンパク質相同体、キメラタンパク質またはその両方をプローブとして用い、公共のヒトゲノムデータベースから相同ゲノム配列を検索した。このようにして、部分的なＤＮＡ配列を相同ゲノム配列の付加によりストレッチすなわち伸長した。結果として得られるストレッチ配列を検査し、完全遺伝子を含んでいるか否かを決定した。

【０２４７】

６　ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６を構築するために用いた配列を、ＢＬＡＳＴ及びＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムを用いて、Ｉｎｃｙｔｅ ＬＩＦＥＳＥＱデータベース及び公共のドメインデータベースの配列と比較した。ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６と一致するこれらのデータベースの配列を、Ｐｈｒａｐ（表７）などの構築アルゴリズムを使用して、連続及び重複した配列のクラスターに組み入れた。スタンフォード・ヒトゲノムセンター（ＳＨＧＣ）、ホワイトヘッド・ゲノム研究所（ＷＩＧＲ）、Ｇｅｎｅｔｈｏｎ等の公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッド及び遺伝地図データを用いて、クラスタ化された配列が前もってマッピングされたかを測定した。マッピングされた配列がクラスタに含まれている結果、個々の配列番号を含めてそのクラスタの全配列が地図上の位置に割り当てられた。

【０２４８】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または間隔として表される。センチモルガン間隔の地図上の位置は、染色体のｐアームの末端に関連して測定する。（センチモルガン（ｃＭ）は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、１ｃＭは、ヒト中のＤＮＡの１メガベース（Ｍｂ）にほぼ等しい。 尤も、この値は、組換えのホットスポット及びコールドスポットに起因して広範囲に変化する。ｃＭ距離は、配列が各クラスタ内に含まれるような放射線ハイブリッドマーカーに対して境界を提供するようなＧｅｎｅｔｈｏｎによってマッピングされた遺伝マーカーに基づく。ＮＣＢＩ「ＧｅｎｅＭａｐ９９」（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｐｖ／ｇｅｎｅｍａｐ）などの一般個人が入手可能なヒト遺伝子マップおよびその他の情報源を用いて、上記した区間が既に同定されている疾患遺伝子マップ内若しくは近傍に位置するかを決定できる。

【０２４９】

７　ポリヌクレオチド発現の分析

ノーザン分析は、転写された遺伝情報の存在を検出するために用いられる実験技術であり、特定の細胞種または組織からのＲＮＡが結合される膜への標識されたヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションに関与している。（前出のＳａｍｂｒｏｏｋ， ７章、同Ａｕｓｕｂｅｌ． Ｆ．Ｍ． ら， ４章及び１６章等を参照。）

【０２５０】

ＢＬＡＳＴに適用する類似のコンピュータ技術を用いて、ＧｅｎＢａｎｋやＬｉｆｅＳｅ

ｑ（Ｉｎｃｙｔｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）等のヌクレオチドデータベースにおいて同一または関連分子を検索する。ノーザン分析は、多数膜系ハイブリダイゼーションよりも非常に速い。更に、特定の同一を厳密な或いは相同的なものとして分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を変更することができる。検索の基準は積スコアであり、次式で定義される。

【数１】

$$\frac{(\text{BLAST スコア} \times \text{配列一致率})}{5 \times (\text{長さ(配列１)，長さ(配列２)) の最小値}}$$

【０２５１】

積スコアは、２つの配列間の類似度及び配列が一致する長さの両方を考慮している。積スコアは、０～１００の規準化された値であり、次のようにして求める。ＢＬＡＳＴスコアにヌクレオチドの配列一致率を乗じ、その積を２つの配列の短い方の長さの５倍で除する。高スコアリングセグメント対（ＨＳＰ）に一致する各塩基に＋５のスコアを割り当て、各不適性塩基対に－４を割り当てることにより、ＢＬＡＳＴスコアを計算する。２つの配列は、２以上のＨＳＰを共有し得る（ギャップにより隔離され得る）。２以上のＨＳＰがある場合には、最高ＢＬＡＳＴスコアの塩基対を用いて積スコアを計算する。積スコアは、断片的重畳とＢＬＡＳＴアラインメントの質とのバランスを表す。例えば積スコア１００は、比較した２つの配列の短い方の長さ全体にわたって１００％一致する場合のみ得られる。積スコア７０は、一端が１００％一致し、７０％重畳しているか、他端が８８％一致し、１００％重畳しているかのいずれかの場合に得られる。積スコア５０は、一端が１００％一致し、５０％重畳しているか、他端が７９％一致し、１００％重畳しているかのいずれかの場合に得られる。

【０２５２】

或いは、ＳＲＰをコードするポリヌクレオチド配列は、由来する組織に対して分析する。例えば或る完全長配列は、Ｉｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ配列（実施例３を参照）と少なくとも一部は重畳するように構築される。各ｃＤＮＡ配列は、ヒト組織から作製されたｃＤＮＡライブラリに由来する。各ｃＤＮＡ配列は、ヒト組織から作製されたｃＤＮＡライブラリに由来する。各ヒト組織は、以下の生物／組織カテゴリー即ち心血管系、結合組織、消化器系、胎芽構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖器、男性生殖器、生殖細胞、血液及び免疫系、肝、筋骨格系、神経系、膵臓、呼吸器系、感覚器、皮膚、顎口腔系、非分類性／混合性または尿路の１つに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。同様に、各ヒト組織は、以下の疾患／病状カテゴリー即ち癌、細胞系、発達、炎症、神経性、外傷、心血管、鬱血、その他の１つに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。得られるパーセンテージは、ＳＲＰをコードするｃＤＮＡの疾患特異的な発現を反映する。ｃＤＮＡ配列およびｃＤＮＡライブラリ／組織の情報は、ＬＩＦＥＳＥＱ ＧＯＬＤ データベース（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ ＣＡ）から得ることができる。

【０２５３】

８　ＳＲＰをコードするポリヌクレオチドの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列もまた、完全長分子の適切な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて該断片を伸長させて生成した。一方のプライマーは既知の断片の５’伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは既知の断片の３’伸長を開始するべく合成した。開始プライマーの設計は、長さが約２２～３０ヌクレオチド、ＧＣ含有率が５０％以上となり、約６８～７２℃の温度で標的配列にアニーリングするように、ＯＬＩＧＯ ４．０６ソフトウェア（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）或いは別の適切なプログラムを用いて、ｃＤＮＡから設計した。ヘアピン構造及びプライマー－プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの区間は全て回避した。

【０２５４】
配列を伸長するために、選択されたヒトｃＤＮＡライブラリを用いた。２段階以上の伸長が必要または望ましい場合には、付加的プライマー或いはプライマーのネステッドセットを設計した。
【０２５５】
高忠実度の増幅が、当業者によく知られている方法を利用したＰＣＲ法によって得られた。ＰＣＲは、ＰＴＣ－２００ サーマルサイクラー（ＭＪ Ｒｅｓｅａｒｃｈ, Ｉｎｃ.）を用いて９６穴プレート内で行った。反応混合液は、鋳型ＤＮＡ及び２００ ｎｍｏｌの各プライマー、Mg^{2+}と$(NH_4)_2SO_4$とβ－メルカプトエタノールを含むバッファー、Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）、ＥＬＯＮＧＡＳＥ酵素（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、Ｐｆｕ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を含む。プライマーの組、ＰＣＩ ＡとＰＣＩ Ｂに対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ １：９４℃で３分間、ステップ ２：９４℃で１５分間、ステップ ３：６０℃で１分間、ステップ ４：６８℃で２分間、ステップ ５：ステップ２、３、及び４を２０回繰り返す。ステップ ６：６８℃で５分間、ステップ ７：４℃で保存。別法では、プライマー対、Ｔ７とＳＫ＋に対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ １：９４℃で３分間、ステップ ２：９４℃で１５分間、ステップ ３：５７℃で１分間、ステップ ４：６８℃で２分間、ステップ ５：ステップ２、３、及び４を２０回繰り返す。ステップ ６：６８℃で５分間、ステップ ７：４℃で保存。
【０２５６】
各ウェルのＤＮＡ濃度は、１Ｘ ＴＥ及び０．５μｌの希釈していないＰＣＲ産物に溶解した１００μｌのＰＩＣＯＧＲＥＥＮ定量試薬（０．２５（ｖ／ｖ） ＰＩＣＯＧＲＥＥＮ; Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ, Ｅｕｇｅｎｅ ＯＲ）を不透明な蛍光光度計プレート（Ｃｏｍｉｎｇ Ｃｏｓｔａｒ, Ａｃｔｏｎ ＭＡ）の各ウェルに分配してＤＮＡが試薬と結合できるようにして測定する。サンプルの蛍光を計測してＤＮＡの濃度を定量するべくプレートをＦｌｕｏｒｏｓｋａｎ ＩＩ（Ｌａｂｓｙｓｔｅｍｓ Ｏｙ, Ｈｅｌｓｉｎｋｉ, Ｆｉｎｌａｎｄ）でスキャンした。反応混合物のアリコート５～１０μｌを１％アガロースミニゲル上で電気泳動法によって解析し、どの反応が配列の伸長に成功したかを決定した。
【０２５７】
伸長させたヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して３８４穴プレートに移し、ＣｖｉＪＩコレラウイルスエンドヌクレアーゼ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ, Ｍａｄｉｓｏｎ ＷＩ）を用いて消化し、ｐＵＣ １８ベクター（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）への再連結反応前に音波処理またはせん断した。ショットガン・シークエンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度（０．６～０．８％）のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をＡｇａｒ ＡＣＥ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で消化した。伸長させたクローンをＴ４リガーゼ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ, Ｂｅｖｅｒｌｙ ＭＡ）を用いてｐＵＣ １８ベクター（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）に再連結し、Ｐｆｕ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）で処理して制限部位の張出部（ｏｖｅｒｈａｎｇ）を満たし、大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を選択して抗生物質を含む培地に移し、それぞれのコロニーを切りとってＬＢ／２Ｘカルベニシリン培養液の３８４ウェルプレートに３７℃で一晩培養した。
【０２５８】
細胞を溶解して、Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）及びＰｆｕ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いて以下の手順でＤＮＡをＰＣＲ増幅した。ステップ １：９４℃で３分間、ステップ ２：９４℃で１５分間、ステップ ３：６０℃で１分間、ステップ ４：７２℃で２分間、ステップ ５：ステップ２、３、及び４を２０回繰り返す。ステップ ６：７２℃で５分間、ステッ

プ７：４℃で保存。上記したようにＰＩＣＯＧＲＥＥＮ試薬（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）でＤＮＡを定量化した。ＤＮＡの回収率が低いサンプルは、上記と同一の条件を用いて再増幅した。サンプルは２０％ジメチルスルホキシド（１：２，ｖ／ｖ）で希釈し、ＤＹＥＮＡＭＩＣ エネルギートランスファー シークエンシングプライマー、及びＤＹＥＮＡＭＩＣ ＤＩＲＥＣＴ ｋｉｔ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）またはＡＢＩ ＰＲＩＳＭ ＢＩＧＤＹＥ ターミネーターサイクル シークエンシング反応キット（Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ ｃｙｃｌｅ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｒｅａｄｙ ｒｅａｃｔｉｏｎ ｋｉｔ）（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いてシークエンシングした。

【０２５９】

同様に、上記手順を用いて完全長ヌクレオチド配列を検証し、或いはそのような伸長のために設計されたオリゴヌクレオチド及び適切なゲノムライブラリを用いて５’調節配列を得る。

【０２６０】

９　個々のハイブリダイゼーションプローブの標識及び使用

ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４－６から導き出されたハイブリダイゼーションプローブを用いて、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡをスクリーニングする。約２０塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記載するが、より大きなヌクレオチド断片に対しても事実上同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、ＯＬＩＧＯ ４．０６ソフトウェア（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）等の最新ソフトウェアを用いて設計し、各オリゴマー５０ｐｍｏｌと、［γ－^{32}Ｐ］アデノシン３リン酸（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）２５０μＣｉと、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ（ＤｕＰｏｎｔ ＮＥＮ，Ｂｏｓｔｏｎ ＭＡ）を混合することにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、ＳＥＰＨＡＤＥＸ Ｇ－２５超細繊分子サイズ排除デキストラン ビードカラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を用いて十分に精製する。Ａｓｅ Ｉ、Ｂｇｌ ＩＩ、Ｅｃｏ ＲＩ、Ｐｓｔ Ｉ、Ｘｂａ１またはＰｖｕ ＩＩ（ＤｕＰｏｎｔ ＮＥＮ）のいずれか１つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノムＤＮＡの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分10^{7}カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

【０２６１】

各消化物から得たＤＮＡは、０．７％アガロースゲル上で分画してナイロン膜（Ｎｙｔｒａｎ Ｐｌｕｓ，Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ ＆ Ｓｃｈｕｅｌｌ，Ｄｕｒｈａｍ ＮＨ）に移す。ハイブリダイゼーションは、４０℃で１６時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば０．１×クエン酸ナトリウム食塩水及び０．５％ドデシル硫酸ナトリウムに一致する条件下で、ブロットを室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィーまたはそれに代わるイメージング手段を用いてハイブリダイゼーションパターンを視覚化し、比較する。

【０２６２】

１０　マイクロアレイ

マイクロアレイの表面上でアレイエレメントの連鎖または合成は、フォトリソグラフィ、圧電印刷（インクジェット印刷、前出のＢａｌｄｅｓｃｈｗｅｉｌｅｒ等を参照）、機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生したものを用いて達成することが可能である。上記各技術において基質は、均一且つ非多孔性の固体とするべきである（Ｓｃｈｅｎａ（１９９９）前出）。推奨する基質には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウエハがある。或いは、ドットブロット法またはスロットブロット法に類似のアレイを利用して、熱的、紫外線的、化学的または機械的結合手順を用いて基質の表面にエレメントを配置及び結合させてもよい。通常のアレイは、手作業で、または利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る（Ｓｃｈｅｎａ，Ｍ．ら（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４６７－４７０、Ｓｈａｌｏｎ．Ｄ．ら（１９９６）Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．６：６３９－６４５、Ｍａｒｓ

ｈａｌｌ，Ａ．ａｎｄＪ．Ｈｏｄｇｓｏｎ（１９９８）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：２７－３１．を参照）。

【０２６３】

完全長ｃＤＮＡ、発現配列タグ（ＥＳＴ）、またはその断片またはオリゴマーは、マイクロアレイのエレメントと成り得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片またはオリゴマーを、レーザＧＥＮＥソフトウェア（ＤＮＡＳＴＡＲ）等の本技術分野で公知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。アレイエレメントは、生物学的サンプル中でポリヌクレオチドを用いてハイブリダイズされる。生物学的サンプル中のポリヌクレオチドは、検出を容易にするために蛍光標識またはその他の分子タグに抱合される。ハイブリダイゼーション後、生物学的サンプルからハイブリダイズされていないヌクレオチドを除去し、蛍光スキャナを用いて各アレイエレメントにおいてハイブリダイゼーションを検出する。或いは、レーザ脱離及び質量スペクトロメトリを用いてもハイブリダイゼーションを検出し得る。マイクロアレイ上のエレメントにハイブリダイズする各ポリヌクレオチドの相補性の度合及び相対存在度は、算定し得る。 一実施例におけるマイクロアレイの調整及び使用について、以下に詳述する。

【０２６４】

組織または細胞サンプルの調製

グアニジウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全ＲＮＡを単離し、オリゴ（ｄＴ）セルロース法を用いてポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡを精製する。各ポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡサンプルを、ＭＭＬＶ逆転写酵素、０．０５ｐｇ／μｌのオリゴ（ｄＴ）プライマー（２１ｍｅｒ）、１×第一鎖合成バッファー、０．０３ｕｎｉｔ／μｌのＲＮアーゼ阻害因子、５００μＭのｄＡＴＰ、５００μＭのｄＧＴＰ、５００μＭのｄＴＴＰ、４０μＭのｄＣＴＰ、４０μＭのｄＣＴＰ－Ｃｙ３（ＢＤＳ）またはｄＣＴＰ－Ｃｙ５（ＡｍｅｒｓｈａｍＰｈａｒｍａｃｉａＢｉｏｔｅｃｈ）を用いて逆転写する。逆転写反応は、ＧＥＭＢＲＩＧＨＴキット（Ｉｎｃｙｔｅ）を用いてポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡ含有の２５体積ｍｌ内で行う。特異的対照ポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡは、非コード酵母ゲノムＤＮＡからｉｎ ｖｉｔｒｏ転写により合成する。各反応サンプル（１つはＣｙ３、もう１つはＣｙ５標識）は、２．５ｍｌの０．５Ｍ水酸化ナトリウムで処理し、８５℃で２０分間インキュベートし、反応を停止させてＲＮＡを分解させる。サンプルは、２つの連続するＣＨＲＯＭＡ ＳＰＩＮ３０ゲル濾過スピンカラム（ＣＬＯＮＴＥＣＨ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．（ＣＬＯＮＴＥＣＨ），Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ ＣＡ）を用いて精製する。 結合後、２つの反応サンプルは、１ｍｌのグリコーゲン（１ｍｇ／ｍｌ）を用いて析出させたエタノール、６０ｍｌの酢酸ナトリウム及び３００ｍｌの１００％エタノールである。サンプルは次に、ＳｐｅｅｄＶＡＣ（Ｓａｖａｎｔ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｉｎｃ．，Ｈｏｌｂｒｏｏｋ ＮＹ）を用いて乾燥して仕上げ、１４μｌの５×ＳＳＣ／０．２％ＳＤＳ中で再懸濁する。

【０２６５】

マイクロアレイの調製

本発明の配列を用いて、アレイエレメントを生成する。各アレイエレメントは、クローン化ｃＤＮＡインサートによりベクター含有細菌性細胞から増幅する。ＰＣＲ増幅は、ｃＤＮＡインサートの側面に位置するベクター配列に相補的なプライマーを用いる。３０サイクルのＰＣＲで１～２ｎｇの初期量から５μｇより大きい最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅されたアレイエレメントは、ＳＥＰＨＡＣＲＹＬ－４００（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を用いて精製される。

【０２６６】

精製したアレイエレメントは、ポリマーコートされたスライドグラス上に固定する。顕微鏡スライドグラス（Ｃｏｒｎｉｎｇ）は、処理中及び処理後に０．１％のＳＤＳ及びアセトン中で超音波をかけ、蒸留水で非常に良く洗って洗浄する。スライドグラスは、４％フッ化水素酸（ＶＷＲ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（ＶＷＲ），Ｗｅｓｔ Ｃｈｅｓｔｅｒ ＰＡ）中でエッチングし、蒸留水中で広範囲に

わたって洗浄し、９５％エタノール中で０．０５％アミノプロピルシラン（Ｓｉｇｍａ）を用いてコーティングする。コーティングしたスライドガラスは、１１０℃のオブンで硬化させる。

【０２６７】

米国特許第５，８０７，５２２号に記載されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。この特許に引用することを以って本明細書の一部とする。平均濃度が１００ｎｇ／μｌのアレイエレメントＤＮＡ１μｌを高速機械装置により開放型キャピラリープリンティングエレメント（ｏｐｅｎ ｃａｐｉｌｌａｒｙ ｐｒｉｎｔｉｎｇ ｅｌｅｍｅｎｔ）に充填する。装置はここで、スライド毎に約５ｎｌのアレイエレメントサンプルを加える。

【０２６８】

マイクロアレイには、ＳＴＲＡＴＡＬＩＮＫＥＲ ＵＶ架橋剤（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いてＵＶ架橋する。マイクロアレイは、室温において０．２％ＳＤＳで１度洗浄し、蒸留水で３度洗浄する。リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（Ｔｒｏｐｉｘ，Ｉｎｃ．，Ｂｅｄｆｏｒｄ ＭＡ）中の０．２％カゼイン中において６０℃で３０分間マイクロアレイをインキュベートした後、前に行ったように０．２％ＳＤＳ及び蒸留水で洗浄することにより、非特異結合部位をブロックする。

【０２６９】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応は、５×ＳＳＣ，０．２％ＳＤＳハイブリダイゼーション緩衝液中のＣｙ３及びＣｙ５標識したｃＤＮＡ合成生成物を各０．２μｇ含む９μｌのサンプル混合体を有する。サンプル混合体は、６５℃まで５分間加熱し、マイクロアレイ表面上で等分して１．８cm^2のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡スライドより僅かに大きい空洞を有する防水チェンバーに移す。チェンバーのコーナーに１４０μｌの５×ＳＳＣを加えることにより、チェンバー内部を湿度１００％に保持する。アレイを含むチェンバーは、６０℃で約６．５時間インキュベートする。アレイは、第１洗浄緩衝液中（１×ＳＳＣ，０．１％ＳＤＳ）において４５℃で１０分間洗浄し、第２洗浄緩衝液中（０．１×ＳＳＣ）において４５℃で１０分間各々３度洗浄して乾燥させる。

【０２７０】

検出

レポーター標識ハイブリダイゼーション複合体は、Ｃｙ３の励起のためには４８８ｎｍ、Ｃｙ５の励起のためには６３２ｎｍでスペクトル線を発生し得るＩｎｎｏｖａ ７０混合ガス１０ Ｗレーザ（Ｃｏｈｅｒｅｎｔ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ ＣＡ）を備えた顕微鏡で検出する。２０×顕微鏡対物レンズ（Ｎｉｋｏｎ，Ｉｎｃ．，Ｍｅｌｖｉｌｌｅ ＮＹ）を用いて、アレイ上に励起レーザ光の焦点を当てる。アレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御のＸ－Ｙステージに置き、対物レンズを通過してラスタースキャンする。本実施例で用いた１．８ｃｍ×１．８ｃｍのアレイは、２０μｍの解像度でスキャンした。

【０２７１】

２つの異なるスキャンのうち、混合ガスマルチラインレーザは２つの蛍光色素を連続的に励起する。発光された光は、波長に基づき分離され、２つの蛍光色素に対応する２つの光電子増倍管検出器（ＰＭＴ Ｒ１４７７，Ｈａｍａｍａｔｓｕ Ｐｈｏｔｏｎｉｃｓ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｂｒｉｄｇｅｗａｔｅｒ ＮＪ）に送られる。アレイと光電子増倍管間に設置された好適なフィルターを用いて、シグナルをフィルターする。用いる蛍光色素の最大発光の波長は、Ｃｙ３では５６５ｎｍ、Ｃｙ５では６５０ｎｍである。装置は両方の蛍光色素からのスペクトルを同時に記録し得るが、レーザ源において好適なフィルターを用いて、蛍光色素１つにつき１度スキャンし、各アレイを通常２度スキャンする。

【０２７２】

スキャンの感度は通常、既知濃度のサンプル混合体に添加されるｃＤＮＡ対照種により生成されるシグナル強度を用いて較正する。アレイ上の特定の位置には相補的ＤＮＡ配列が

含まれ、その位置におけるシグナルの強度をハイブリダイジング種の重量比１：１００，０００に相関させる。 異なる源泉（例えば試験される細胞及び対照細胞など）からの２つのサンプルを、各々異なる蛍光色素で標識し、他と異なって発現した遺伝子を同定するために単一のアレイにハイブリダイズする場合には、その較正を、２つの蛍光色素で較正するｃＤＮＡのサンプルを標識し、ハイブリダイゼーション混合体に各々等量を加えることによって行う。

【０２７３】

光電子増倍管の出力は、ＩＢＭコンパチブルＰＣコンピュータにインストールされた１２ビットＲＴＩ－８３５Ｈアナログ－ディジタル（Ａ／Ｄ）変換ボード（Ａｎａｌｏｇ Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｏｒｗｏｏｄ ＭＡ）を用いてディジタル化される。ディジタル化されたデータは、青色（低シグナル）から赤色（高シグナル）までの擬似カラー範囲へのリニア２０色変換を用いてシグナル強度がマッピングされたようなイメージとして表示される。データは、定量的にも分析される。２つの異なる蛍光色素を同時に励起及び測定する場合には、各蛍光色素の発光スペクトルを用いて、データは先ず蛍光色素間の光学的クロストーク（発光スペクトルの重なりに起因する）を補正する。

【０２７４】

グリッドが蛍光シグナルイメージ上に重ねられ、それによって各スポットからのシグナルはグリッドの各エレメントに集められる。各エレメント内の蛍光シグナルは統合され、シグナルの平均強度に応じた数値が得られる。シグナル分析に用いるソフトウェアは、ＧＥＭＴＯＯＬＳ遺伝子発現分析プログラム（Ｉｎｃｙｔｅ）である。

【０２７５】

１１　相補的ポリヌクレオチド

ＳＲＰをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的な配列は、天然のＳＲＰの発現を低下させるため即ち阻害するために用いられる。約１５～３０塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さな或いは大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。Ｏｌｉｇｏ４．０６ソフトウェア（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）及びＳＲＰのコーディング配列を用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な５’配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモーターがコーディング配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するためには、ＳＲＰをコードする転写物にリボソームが結合しないように相補的オリゴヌクレオチドをデザインする。

【０２７６】

１２　ＳＲＰの発現

ＳＲＰの発現及び精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌でＳＲＰが発現するために、抗生物質耐性及びｃＤＮＡの転写レベルを高める誘導性のプロモーターを含む好適なベクターにｃＤＮＡをサブクローニングする。このようなプロモーターには、ｌａｃオペレーター調節エレメントに関連するＴ５またはＴ７バクテリオファージプロモーター及びｔｒｐ－ｌａｃ（ｔａｃ）ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、ＢＬ２１（ＤＥ３）等の好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピルβ－Ｄチオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）で誘発されるとＳＲＰを発現する。真核細胞でのＳＲＰの発現は、昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に一般にバキュロウイスルスとして知られているＡｕｔｏｇｒａｐｈｉｃａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ核多面性ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子を、相同組換え或いは転移プラスミドの媒介を伴う細菌の媒介による遺伝子転移のどちらかによって、ＳＲＰをコードするｃＤＮＡと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強い多角体プロモーターによって高いレベルのｃＤＮＡの転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合はＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ（Ｓｆ９）昆虫細胞に感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場合は、バキュロウイルスの更なる遺伝的変更が必要になる。（Ｅｎｇｅｌｈａｒｄ．Ｅ．Ｋ．ら（

１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９１：３２２４－３２２７、Ｓａｎｄｉｇ，Ｖ．ら（１９９６）Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．７：１９３７－１９４５．等を参照）。

【０２７７】

殆どの発現系では、ＳＲＰが、例えばグルタチオンＳトランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、またはＦＬＡＧや６－Ｈｉｓなどのペプチドエピトープ標識で合成された融合タンパク質となるため、未精製の細胞溶解物からの組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製が素早く１回で行うことができる。ＧＳＴは日本住血吸虫からの２６ｋＤａの酵素であり、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で、固定化グルタチオン上で融合タンパク質の精製を可能とする（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）。精製の後、ＧＳＴ部分を特定の操作部位でＳＲＰからタンパク分解的に切断できる。ＦＬＡＧは８アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクローナル及びポリクローナル抗ＦＬＡＧ抗体（Ｅａｓｔｍａｎ Ｋｏｄａｋ）を用いて免疫親和性精製を可能にする。６ヒスチジン残基が連続して伸長した６－Ｈｉｓは、金属キレート樹脂（ＱＩＡＧＥＮ）上での精製を可能にする。タンパク質の発現及び精製の方法は、前出のＡｕｓｕｂｅｌ（１９９５）１０章、１６章に記載されている。これらの方法で精製したＳＲＰを直接用いて以下の実施例１６、１７、及び１８のアッセイを行うことができる。

【０２７８】

１３　機能的アッセイ

ＳＲＰの機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでのＳＲＰをコードする配列の発現によって評価する。ｃＤＮＡを、ｃＤＮＡを高いレベルで発現する強いプロモーターを含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする。選り抜きのベクターには、ｐＣＭＶ ＳＰＯＲＴプラスミド（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）及びｐＣＲ ３．１プラスミド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）が含まれ、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを有する。リポソーム製剤或いは電気穿孔法を用いて、５～１０μｇの組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来または造血由来の細胞株に一時的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む１～２μｇのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、ｃＤＮＡの組換えベクターからの発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）、ＣＤ６４またはＣＤ６４－ＧＦＰ融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザー光学に基づく技術であるフローサイトメトリー（ＦＣＭ）を用いて、ＧＦＰまたはＣＤ６４－ＧＦＰを発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。ＦＣＭは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取込を検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、プロピジウムヨウ化物によるＤＮＡ染色によって計測される核ＤＮＡ内容物の変化、前方光散乱と９０°側方光散乱によって計測される細胞サイズと顆粒状性の変化、ブロモデオキシウリジンの取込量の低下によって計測されるＤＮＡ合成の下方調節、特異抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内におけるタンパンク質の発現の変化、及び蛍光複合アネキシンＶタンパク質の細胞表面への結合によって計測される原形質膜組成の変化とがある。フローサイトメトリー法については、Ｏｒｍｅｒｏｄ，Ｍ．Ｇ．（１９９４）Ｆｌｏｗ Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ Ｏｘｆｏｒｄ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ．に記述がある。

【０２７９】

遺伝子発現におけるＳＲＰの影響は、ＳＲＰをコードする配列とＣＤ６４またはＣＤ６４－ＧＦＰのどちらかが形質移入された高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。ＣＤ６４またはＣＤ６４－ＧＦＰは、形質転換された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）の保存領域と結合する。形質転換細胞と非形質転換細胞は、ヒトＩｇＧまたはＣＤ６４に対する抗体（ＤＹＮＡＬ，Ｌａｋｅ Ｓｕｃｃｅｓｓ．ＮＹ）で覆われた磁気ビーズを用いて有効に分離することができる。ｍＲＮＡは、本技術分

野で公知の方法で細胞から精製することができる。ＳＲＰその他の目的の遺伝子をコードするｍＲＮＡの発現は、ノーザン分析或いはマイクロアレイ技術で分析することができる。

【０２８０】

１４　ＳＲＰに特異的な抗体の作製

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ＰＡＧＥ；Ｈａｒｒｉｎｇｔｏｎ，Ｍ．Ｇ．（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８２：４８８－４９５等を参照）または他の精製技術を用いて実質上精製されたＳＲＰを用いて、標準プロトコルでウサギを免疫化して抗体を産出する。

あるいは、レーザＧＥＮＥソフトウェア（ＤＮＡＳＴＡＲ）を用いてＳＲＰアミノ酸配列を解析し、免疫抗原性の高い領域を決定する。そして対応するオリゴペプチドを合成し、このオリゴペプチドを用いて当業者によく知られている方法で抗体を生成する。適切なエピトープ、例えばＣ末端付近或いは隣接する親水性領域にあるエピトープの選択については、当分野で公知である（前出のＡｕｓｕｂｅｌ，１９９５，１１章等を参照）。

【０２８１】

通常は、長さ約１５残基のオリゴペプチドを、Ｆｍｏｃケミストリを用いるＡＢＩ ４３１Ａ ペプチドシンセサイザ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて合成し、Ｎ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）を用いた反応によってＫＬＨ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ ＭＯ）に結合させて、免疫抗原性を高める（前出のＡｕｓｕｂｅｌ，１９９５ 等を参照）。完全フロイントアジュバントにおいてオリゴペプチド－ＫＬＭ複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗ＳＲＰ活性を検査するには、ペプチドまたはＳＲＰを基板に結合し、１％ＢＳＡを用いてブロッキング処理し、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギＩｇＧと反応させる。

【０２８２】

１５　特異的抗体を用いる天然ＳＲＰの精製

天然ＳＲＰ或いは組換えＡＲＰを、ＳＲＰに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティーカラムは、ＣＮＢｒ－活性化ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）のような活性化クロマトグラフィー用レジンと抗ＳＲＰ抗体とを共有結合させることにより形成する。結合後に、製造者の使用説明書に従って樹脂をブロックし、洗浄する。

【０２８３】

ＳＲＰを含む培養液をイムノアフィニティーカラムに通し、ＳＲＰを優先的に吸着できる条件で（例えば、界面活性剤の存在下において高イオン強度のバッファーで）そのカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体とＳＲＰとの結合を切るような条件で（例えば、ｐＨ２～３のバッファー、或いは高濃度の尿素またはチオシアン酸塩イオンのようなカオトロピックイオンで）溶出させ、ＳＲＰを回収する。

【０２８４】

１６　ＳＲＰと相互作用する分子の同定

ＳＲＰまたは生物学的に活性であるＳＲＰ断片を、^{125}Ｉボルトンハンター試薬で標識する。（例えば Ｂｏｌｔｏｎ Ａ．Ｅ．ａｎｄ Ｗ．Ｍ．Ｈｕｎｔｅｒ（１９７３）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．１３３：５２９－５３９を参照。）マルチウェルプレートに予め配列しておいた候補の分子を、標識したＳＲＰと共にインキュベートし、洗浄して、標識したＳＲＰ複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なＳＲＰ濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したＳＲＰの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

【０２８５】

別法では、ＳＲＰと相互作用する分子を、Ｆｉｅｌｄｓ，Ｓ．及びＯ．Ｓｏｎｇ（１９８９，Ｎａｔｕｒｅ ３４０：２４５－２４６）に記載の酵母２－ハイブリッドシステム（ｙｅａｓｔ ｔｗｏ－ｈｙｂｒｉｄ ｓｙｓｔｅｍ）やＭＡＴＣＨＭＡＫＥＲシステム（

Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）などの２－ハイブリッドシステムに基づいた市販のキットを用いて分析する。

【０２８６】

ＳＲＰはまた、高処理型の酵母２ハイブリッドシステムを使用するＰＡＴＨＣＡＬＬＩＮＧプロセス（ＣｕｒａＧｅｎ Ｃｏｒｐ．，Ｎｅｗ Ｈａｖｅｎ ＣＴ）に用いて、遺伝子の２つの大きなライブラリによってコードされるタンパク質間の全ての相互作用を決定することができる（Ｎａｎｄａｂａｌａｎ，Ｋ．他（２０００）米国特許第６，０５７，１０１号）。

【０２８７】

１７　ＳＲＰ活性の実証

ＳＲＰ活性はほとんどのＧＳＴに共通な基質である１－クロロ－２，４－ジニトロベンゼン（ＣＤＮＢ）とＧＳＨとの接合を触媒した酵素を計測することによって決定できる。ＳＲＰを１ｍＭ ＣＤＮＢと２．５ｍＭ ＧＳＨ共に２５℃、ｐＨ ６．５の０．１Ｍリン酸カリウムバッファでインキュベートする。接合反応は３４０ ｎｍでの光吸収の変化を分光光度計で測定する。酵素の活性は３４０ ｎｍでの吸収変化に比例する。

【０２８８】

別法として、ＳＲＰ活性は酸化活性の測定で３４０ ｎｍでのＮＡＤＨ補酵素の吸光係数の増加に基づいて測定され、また還元活性の計測で３４０ ｎｍでのＮＡＤＨ補酵素の吸光係数の減少に基づいて測定される。下記の基質のいずれかを使用する。３－ホスホグリセリン酸、ヒドロキシピルビン酸、エタノール、アセトアルデヒト、グリシン、またはヒポタウリン。反応混合液は、総量０．１ｍｌに、０．１Ｍ リン酸バッファーｐＨ ７．１（NAD^+，酸化反応）またはまたは０．１Ｍ Na_2HPO_4 バッファー，ｐＨ ７．４（ＮＡＤＨ，還元反応）に１－２ ｍｇ／ｍｌ（ＯＲ），１５ｍＭ 基質、２．４ｍＭ NAD^+ または２．０ｍＭ ＮＡＤＨを含む。３４０ｎｍ（A_{340}）での光吸収の変化を分光光度計（Ｓｈｉｍａｄｚｕ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．，Ｐｌｅａｓａｎｔｏｎ ＣＡ）．を使用して室温で測定する。ＮＡＤＨ 量は最初に存在した基質の量と化学量論的に等しく、A_{340} の変化は生成されたＮＡＤＨ量の直接測定値になる。$\Delta A_{340} = 6620[NADH]$

【０２８９】

１８　毒素除去を目的とした患者の血液の血漿交換

ＳＲＰは毒性化学物質に曝露した患者の血液の精製に利用される。この場合、にＳＲＰの医薬品成分を患者に投与するのではなく、腎臓疾患に使用するのと同様な方法で毒素を血漿交換によって血液から除去する。ＳＰＲはミニ濾過カラムで安定化され血漿が患者に返還する前にカラムを通りながらＳＲＰに結合することにより毒素が除去される。

【０２９０】

当業者は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく本発明の記載した方法及びシステムの種々の改変を行い得る。本発明について説明するにあたり特定の好適実施例に関連して説明を行ったが、本発明の範囲が、そのような特定の実施例に不当に制限されるべきではないことを理解されたい。実際に、分子生物学または関連分野の専門家には明らかな、本明細書に記載されている本発明の実施方法の様々な改変は、特許請求の範囲内にあるものとする。

【０２９１】

（表の簡単な説明）

表１は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の命名法の概略を示す。

【０２９２】

表２は、ＧｅｎＢａｎｋ識別番号及び本発明のポリペプチドに最も近いＧｅｎＢａｎｋ相同体の注釈を示す。各ポリペプチドとそのＧｅｎＢａｎｋ相同体が一致する確率スコアも併せて示す。

【０２９３】

表３は、予測されるモチーフ及びドメインを含む本発明のポリヌクレオチド配列の構造的特徴を、ポリペプチドの分析に用いるための方法、アルゴリズム及び検索可能なデータベースと共に示す。

【０２９４】

表４は、本発明のポリヌクレオチド配列を構築するために用いたｃＤＮＡやゲノムＤＮＡ断片を、ポリヌクレオチド配列の選択した断片と共に示す。

【０２９５】

表５は、本発明のポリヌクレオチドの代表的なｃＤＮＡライブラリを示す。

【０２９６】

表６は、表５に示したｃＤＮＡライブラリの作製に用いた組織及びベクターを説明する付表である。

【０２９７】

表７は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの分析に用いたツール、プログラム、アルゴリズムを、適用可能な説明、引用文献及び閾値パラメータと共に示す。

【表１】

表1

Incyte プロジェクトID	ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチドID	ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリヌクレオチドID
2457018	1	2457018CD1	4	2457018CB1
4907793	2	4907793CD1	5	4907793CB1
888992	3	888992CD1	6	888992CB1

【表２】

表２

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチドID	GenBank ID NO:	確率スコア	GenBank 相同体
2	4907793CD1	g7331888	1.50E-123	マイコプラズマ（Mycoplasma genitalium）グリセロールー３－リン酸デヒドロゲナーゼ(SW:P47285)に類似のものを含む［線虫（Caenorhabditis elegans）］ The C. elegans Sequencing Consortium (1998) Science 282:2012-2018
3	888992CD1	g6018392	5.40E-74	チオレドキシン（Thioredoxins）に類似；cDNA EST yk491h3.5 はこの遺伝子に由来する。［線虫（Caenorhabditis elegans）］ The C. elegans Sequencing Consortium (1998) Science 282:2012-2018
		g1265428 5	0	ペプチド N-グリカナーゼ相同体（酵母（S.cerevisiae））に類似。［ヒト］

【表３】

表 3-1

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ配列、 ドメインおよびモチーフ	分析方法及び データベース
1	2457018CD1	71	T39 S43		ヒスチジノールデヒドロゲナーゼシグネチャ: A14-F70	ProfileScan
					シグナル切断: M1-G37	SPScan
2	4907793CD1	463	S31 S47 S63 S107 S130 T215 Y238 T245 S263 T316 S344 T381 T393	N364	FAD 依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ DM08855|P13032|6-270: T46-L288	BLAST-DOMO
					保存された グリセロール-3 リン酸デヒドロゲナーゼ GLPA ALPAGABP 膜貫通 PD011272: F49-V161	BLAST-PRODOM
					神経節母細胞(GMC)オキシドレダクターゼに類似 : BL00623A: D50-I68; Q253-T273; V303-L325	BLIMPS-BLOCKS
					UbiH/COQ6 モノオキシゲナーゼタンパク質: BL01304A: D50-S63	BLIMPS-PRINTS
					フラビン含有ラットモノアミンオキシダーゼ: PR00757A: D50-L69, V96-Q115	BLIMPS-PRINTS
					ジメチルアニリンモノオキシゲナーゼ [N-オキシド形成] 3 (肝フラビン含有モノオキシゲナーゼ 3; FMO 3) (ジメチルアニリンオキシダーゼ 3): PR00370A: D50-R65	BLIMPS-PRINTS
					FAD 依存性グリセロール-3 リン酸デヒドロゲナーゼ: PR01001A: F49-L61, K81-N93	BLIMPS-PRINTS
					ペプチドレダクターゼタンパク質: PD01888A: A375-P390	BLIMPS-PRODOM
					RGD (細胞表面受容体ドメイン): R282-D284	MOTIFS
					シグナル切断: M1-A64	SPScan

【表４】

表 3-2

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ配列、 ドメインおよびモチーフ	分析方法及び データベース
3	888992CD1	654	T27 T37 Y51 S53 S62 S94 S110 S111 S116 S119 S224 S267 Y282 S289 S380 S515 S602 S619 S636 S207 S374 T388 S392 S446 T449 T479 S552 S568	N117 N222 N511	トランスグルタミナーゼ様スーパーファミリ：T304-C355	HMMER-PFAM
					RGD（細胞表面受容体ドメイン）：R620-D622	MOTIFS
					シグナル切断：M1-A13	SPScan

【表５】

表4

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリヌクレオチド ID	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
4	2457018CB1	2305	1-131, 2170-2305, 1082-1143	6709408F8 (HEAADIR01)	1533	2286
				7260286H1 (UTRETMC01)	1	494
				1315086F6 (BLADTUT02)	878	1473
				5742422R9 (LUNGNON03)	1094	1617
				2457018T6 (ENDANOT01)	449	1066
				6312338F6 (NERDTDN03)	1654	2305
				2330733T6 (COLNNOT11)	488	1075
5	4907793CB1	1742	872-1018	70790623V1	1125	1629
				70787836V1	1163	1742
				70789052V1	556	1068
				70789169V1	952	1570
				70789897V1	412	1049
				4216786F6 (ADRENOT15)	1	488
6	888992CB1	2187	921-942	70715608V1	701	1239
				6597709H1 (ARTANOT06)	1300	2025
				4264408R6 (BLADNOT01)	1210	1758
				6592338H1 (UTREDIT14)	1581	2187
				2604204F6 (LUNGTUT07)	1	539
				4761979F6 (PLACNOT05)	513	1109

【表6】

表５

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロジェクト ID	代表的ライブラリ
4	2457018CB1	COLNNOT16
5	4907793CB1	ADRENOT15
6	888992CB1	BRAITUT08

【表７】

表６

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
ADRENOT15	pINCY	ライブラリは、無脳体で妊娠１６週目に死亡した白人女子胎児から取り除かれた腎臓組織から単離されたRNAを用いて作製された。
BRAITUT08	pINCY	ライブラリは、47才の白人男性の脳髄膜組織の切除時，左前頭葉から採取した脳腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理検査では，焦点脳幹性放射線壊死のあるグレード４の線維性星状細胞腫が見られた。患者の病歴には，脳血管障害，欠乏性貧血，高脂血症，癲癇および喫煙がある。家族の病歴には，脳血管障害，悪性前立腺腫瘍がある。
COLNNOT16	pINCY	ライブラリは、62才白人男性のS字結腸切除術及び永久肛門形成時に採取したS字結腸組織から単離したRNAを用いて作製された。

【表８】

【表９】

表7-1

プログラム	説明	引用文献	パラメータ閾値
ABI FACTURA	ベクター配列を除き、核酸配列のまぎらわしい塩基を遮蔽するプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	アミノ酸または核酸配列の比較、注釈に有用なファーストデータファインダ。	Applied Biosystems, Foster City, CA. Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI オートアセンブラ	核酸配列の構築を行うプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	アミノ酸および核酸配列の配列類似性検索に有用なベーシックローカルアラインメント検索ツール。ブラストにはblastp、blastn、blastx,、tblastnおよびtblastxの５つの機能がある。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	*ESTs:* 確率値=1.0E-8 以下 完全長配列：確率値1.0E-10 以下
FASTA	一群の同じタイプの配列と問合せ配列との間の類似性について検索するPearson およびLipman アルゴリズム。FASTAには最小5つの機能(: fasta、 tfasta、 fastx, tfastxおよびssearch)がある。	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad Sci. USA 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183:63-98; Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	*ESTs:* fasta E 値=1.06E-6 構築された*ESTs*: fasta I同一性=95%以上 一致した長さ=200塩基以上 *ESTs:* fasta E 値=1.06E-8 *完全長配列:* fastx スコア=100以上
BLIMPS	配列をBLOCKS、PRINTS、DOMO、 PRODOMおよびPFAM データベースの配列と対応させて遺伝子ファミリ、配列相同性および構造的フィンガープリント領域を検索するBLocks IMProved サーチャー。	Henikoff, S. and J.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572; Henikoff, J.G. and S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; and Attwood, T.K. 他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値= 1.0E-3以下
HMMER	問合せ配列をPFAMのようなタンパク質ファミリコンセンサス配列の隠れマルコフモデル(HMM)に基づいたデータベースに対して検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他(1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他 (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他 (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	*PFAM* ヒット: 確率値 = 1.0E-3 以下 シグナルペプチドヒット:スコア=0 以上

10 20 30

表7-2

プログラム	説明	引用文献	パラメータ閾値
ProfileScan	Prositeで定義された配列パターンと一致するタンパク質配列の構造的モチーフおよび配列モチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221	標準化された質のスコア≧特定のProsite モチーフに対するGCG指定「HIGH」値 通常、スコア=1.4-2.1.
Phred	高度感受性および確立性のある自動シークエンサートレースを調べる塩基コーリングアルゴリズム。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的実行に基づいたプログラムである、SWATとCrossMatchを含むPhils改訂構築プログラムで、配列相同性検索やDNA配列の構築に有用である。	Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致した長さ=56以上
Consed	Phrap 構築の表示、編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列を走査し、分泌シグナルペプチドの存在を調べる重量マトリックス分析プログラム。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. and S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	スコア=3.5以上
TMAP	重量マトリックスを使ってタンパク質配列上の膜貫通部分を描写し、定位(方向)を決定するプログラム。	Persson, B. および P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. および P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	隠れたMarkov モデル(HMM) を使ってタンパク質配列上の膜貫通部分を描写し、定位(方向)を決定するプログラム。	Sonnhammer, E.L. 他 (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow 他, 編集, The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, 175-182ページ	
Motifs	Prositeで定義されたものと一致するパターンのアミノ酸配列を検索するプログラム。	Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page Page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI	

【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
27 December 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/98332 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/00

(21) International Application Number: PCT/US01/19930

(22) International Filing Date: 22 June 2001 (22.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/213,957 22 June 2000 (22.06.2000) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **INCYTE GENOMICS, INC.** [US/US]; 3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **LAL, Preeti** [IN/US]; P.O. Box 5142, Santa Clara, CA 95056 (US). **GANDHI, Ameena, R.** [US/US]; 837 Roble Avenue, #1, Menlo Park, CA 94025 (US). **YAO, Monique, G.** [US/US]; 111 Frederick Court, Mountain View, CA 94023 (US). **NGUYEN, Danniel, B.** [US/US]; 1103 Ridgewood Drive, San Jose, CA 94043 (US). **TANG, Y., Tom** [US/US]; 4230 Renwick Court, San Jose, CA 95118 (US). **YUE, Henry** [US/US]; 826 Lois Avenue, Sunnyvale, CA 94087 (US).

(74) Agents: **HAMLET-COX, Diana** et al.; Incyte Genomics, Inc., 3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, 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 01/98332 A2

(54) Title: SECRETED REDOX PROTEINS

(57) Abstract: The invention provides human secreted redox proteins (SRP) and polynucleotides which identify and encode SRP. The invention also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists. The invention also provides methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of SRP.

SECRETED REDOX PROTEINS

TECHNICAL FIELD

This invention relates to nucleic acid and amino acid sequences of secreted redox proteins and to the use of these sequences in the diagnosis, treatment, and prevention of cell proliferative, neurological, and metabolic disorders, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of secreted redox proteins.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Overview of Antioxidant Defenses

Eukaryotic cells extract energy and synthesize macromolecules by a complex series of oxidation-reduction reactions collectively referred to as aerobic metabolism. One consequence of aerobic metabolism is the production of free radicals in the form of superoxides ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl ions ($OH^{\cdot}$). Superoxides are produced within cells by mitochondria and the endoplasmic reticulum as a consequence of "leakage" of electrons onto O_2 from their correct paths in electron transfer chains. Hydroxyl ions are produced by ionizing radiation and by the reaction of $O_2^{\cdot-}$ with hydrogen peroxide (H_2O_2) at iron- or copper-containing sites. Free radicals, especially hydroxyl ions, are extremely reactive and can interact with almost all molecules, including proteins, carbohydrates, DNA, and lipids. These interactions can lead to the formation of nonradical hydroperoxides, such as phospholipid hydroperoxides. Interaction of hydroxyl ions with DNA may be a significant contributor to the age-dependent development of cancer. Cells also use free radicals and their derivatives in beneficial ways, such as cytochrome P450-mediated oxidations, regulation of smooth muscle tone, and killing of microorganisms by macrophages and granulocytes (Bast, A. et al. (1991) Am. J. Med. 91(3C):2S-13S).

Most of the superoxides generated undergo dismutation by superoxide dismutase (SOD) generating hydrogen peroxide. H_2O_2 can also be produced by the action of other oxidase enzymes. Hydrogen peroxide resembles water in its molecular structure and is very diffusible within and between cells. Hydrogen peroxide can be removed by catalase, but the most important enzyme in human cells for removing hydrogen peroxide and hydroperoxides is glutathione peroxidase (GSHPx). GSHPx removes peroxides by using them to oxidize reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG). These enzymes are discussed below.

Antioxidant defenses exist as a balanced, coordinated system. Disruption in this balance leads to clinical manifestations. For example, an excess of SOD in relation to GSHPx may be relevant to the clinical condition known as Down's Syndrome. Low antioxidant levels or high $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 levels produce oxidative stress. Oxidative stress induced by phagocytes at sites of chronic

inflammation lead to rheumatoid arthritis in the joints and inflammatory bowel diseases in the intestine. Asthma is also a manifestation of an inflammatory reaction in the lung and is related to oxygen free radical formation (Sies, H. (1991) Am. J. Med. 91 (3C):31S-38S).

Glutathione Peroxidases

The family of glutathione peroxidases encompass three tetrameric glutathione peroxidases (GPx1-3) and the monomeric phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx/GPx4). Although the overall homology between tetrameric enzymes and GPx4 is less than 30%, a pronounced similarity has been detected in clusters involved in the active site and a common catalytic triad has been defined by structural and kinetic data. (Epp, O. et al. (1983) Eur. J. Biochem. 133:51-69). The family members show different tissue distributions. GPx1 is ubiquitously expressed in cells, whereas GPx2 is present in the liver and colon, and GPx3 is present in plasma. GPx4 is found at low levels in all tissues but is expressed at high level in the testis. These tissue localization patterns may be important for regulating the level and targets of glutathione peroxidase activity (Ursini, F. et al (1995) Methods Enzymol. 252:38-53).

GPx4 is unique in both its structure and activity. GPx4 is the only monomeric glutathione peroxidase found in mammals. It is also the only mammalian glutathione peroxidase to show high affinity for and reactivity with phospholipid hydroperoxides, and to be membrane associated. The inhibition of lipid peroxidation by GPx4 requires glutathione and physiological levels of vitamin E, suggesting a tandem mechanism for the antioxidant activities of GPx4 and vitamin E. GPx4 also has alternative transcription and translation start sites which determine its subcellular localization (Esworthy, R.S. et al. (1994) Gene 144:317-318; and Maiorino, M. et al. (1990) Methods Enzymol. 186:448-450).

Glutathione S-Transferases (GST)

The glutathione *S*-transferases (GST) are a ubiquitous family of enzymes with dual substrate specificities that perform important biochemical functions of xenobiotic biotransformation and detoxification, drug metabolism, and protection of tissues against peroxidative damage. The basic reaction catalyzed by these enzymes is the conjugation of an electrophile with reduced glutathione (GSH) and results in either activation or deactivation/detoxification of the chemical. The absolute requirement for binding reduced GSH to a wide variety of chemicals necessitates a diversity in GST structures in various organisms and cell types.

GSTs are homodimeric or heterodimeric proteins localized in the cell cytosol. The major isozymes share common structural and catalytic properties and in many have been classified into four major classes, Alpha, Mu, Pi, and Theta. The two largest classes, Alpha and Mu, are identified by their respective isoelectric points; pI ~ 7.5-9.0 (Alpha), and pI ~ 6.6 (Mu). Each GST possesses a common binding site for GSH and a variable hydrophobic binding site. The hydrophobic binding site

in each isozyme is specific for particular electrophilic substrates. Specific amino acid residues within GSTs have been identified as important for these binding sites and for catalytic activity. Residues Q67, T68, D101, E104, and R131 are important for the binding of GSH (Lee, H.-C. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:99-109). Residues R13, R20, and R69 are important for the catalytic activity of GST (Stenberg G et al. (1991) Biochem. J. 274:549-555).

While, GSTs normally perform the essential function of deactivation and detoxification of potentially mutagenic and carcinogenic chemicals, dysfunction or inappropriate expression of GSTs are detrimental. Some forms of rat and human GSTs are reliable preneoplastic markers of carcinogenesis. Expression of human GSTs in bacterial strains, such as Salmonella typhimurium, used in the well known Ames test for mutagenicity, has helped to establish the role of these enzymes in mutagenesis. Dihalomethanes, which produce liver tumors in mice, are believed to be activated by GST. This view is supported by the finding that dihalomethanes are more mutagenic in transformed bacterial cells expressing human GST than in non-transformed cells (Thier, R. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8567-8580). The mutagenicity of ethylene dibromide and ethylene dichloride is increased in bacterial cells expressing the human Alpha GST, A1-1, while the mutagenicity of aflatoxin B1 is substantially reduced by enhancing the expression of GST (Simula, T.P. et al. (1993) Carcinogenesis 14:1371-1376). Thus, control of GST activity may be useful in the control of mutagenesis and carcinogenesis.

GST has been implicated in the acquired resistance of many cancers to drug treatment, the phenomenon known as multi-drug resistance (MDR). MDR occurs when a cancer patient is treated with a cytotoxic drug such as cyclophosphamide and subsequently becomes resistant to this drug and to a variety of other cytotoxic agents as well. Increased GST levels are associated with some of these drug resistant cancers, and it is believed that this increase occurs in response to the drug agent which is then deactivated by the GST catalyzed GSH conjugation reaction. The increased GST levels then protect the cancer cells from other cytotoxic agents for which GST has affinity. Increased levels of A1-1 in tumors has been linked to drug resistance induced by cyclophosphamide treatment (Dirven H.A. et al. (1994) Cancer Res. 54:6215-6220). Thus control of GST activity in cancerous tissues may be useful in treating MDR in cancer patients.

Glutaredoxin

The reduction of ribonucleotides to the corresponding deoxyribonucleotides, needed for DNA synthesis during cell proliferation, is catalyzed by the enzyme ribonucleotide diphosphate reductase. Glutaredoxin is a glutathione (GSH)-dependent hydrogen donor for ribonucleotide diphosphate reductase and contains the active site consensus sequence -C-P-Y-C-. This sequence is conserved in glutaredoxin from such different organisms as E. coli, vaccinia virus, yeast, plants, and mammalian cells. Glutaredoxin has inherent GSH-disulphide oxidoreductase (thioltransferase) activity in a

coupled system with GSH, NADPH, and GSH-reductase, catalyzing the reduction of low molecular weight disulphides as well as proteins. Glutaredoxin has been proposed to exert a general thiol redox control of protein activity by acting both as an effective protein disulphide reductase, similar to thioredoxin, and as a specific GSH-mixed disulphide reductase (Padilla, C.A. et al. (1996) FEBS Lett. 378:69-73).

In addition to their important role in DNA synthesis and cell division, glutaredoxin and other thioproteins provide effective antioxidant defense against oxygen radicals and hydrogen peroxide (Schallreuter, K.U. and J.M. Wood (1991) Melanoma Res. 1:159-167). Glutaredoxin is the principal agent responsible for protein dethiolation in vivo and reduces dehydroascorbic acid in normal human neutrophils (Jung, C.H. and J.A. Thomas (1996) Arch. Biochem. Biophys. 335:61-72; Park, J.B. and M. Levine (1996) Biochem. J. 315:931-938).

Peroxisomal β-oxidation Enzymes

Another example of the importance of redox reactions in cell metabolism is the degradation of saturated and unsaturated fatty acids by mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation enzymes which sequentially remove two-carbon units from Coenzyme A (CoA)-activated fatty acids. The main beta-oxidation pathway degrades both saturated and unsaturated fatty acids while the auxiliary pathway performs additional steps required for the degradation of unsaturated fatty acids.

The pathways of mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation use similar enzymes, but have different substrate specificities and functions. Mitochondria oxidize short-, medium-, and long-chain fatty acids to produce energy for cells. Mitochondrial beta-oxidation is a major energy source for cardiac and skeletal muscle. In liver, it provides ketone bodies to the peripheral circulation when glucose levels are low as in starvation, endurance exercise, and diabetes (Eaton, S. et al. (1996) Biochem. J. 320:345-357). Peroxisomes oxidize medium-, long-, and very-long-chain fatty acids, dicarboxylic fatty acids, branched fatty acids, prostaglandins, xenobiotics, and bile acid intermediates. The chief roles of peroxisomal beta-oxidation are to shorten toxic lipophilic carboxylic acids to facilitate their excretion and to shorten very-long-chain fatty acids prior to mitochondrial beta-oxidation (Mannaerts, G.P. and P.P. Van Veldhoven (1993) Biochimie 75:147-158).

The auxiliary beta-oxidation enzyme 2,4-dienoyl-CoA reductase catalyzes the following reaction:

trans-2, cis/trans-4-dienoyl-CoA + NADPH + H^+ —> trans-3-enoyl-CoA + $NADP^+$

This reaction removes even-numbered double bonds from unsaturated fatty acids prior to their entry into the main beta-oxidation pathway (Koivuranta, K.T. et al. (1994) Biochem. J. 304:787-792). The enzyme may also remove odd-numbered double bonds from unsaturated fatty acids (Smeland, T.E. et

al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6673-6677).

Rat 2,4-dienoyl-CoA reductase is located in both mitochondria and peroxisomes (Dommes, V. et al. (1981) J. Biol. Chem. 256:8259-8262). Two immunologically different forms of rat mitochondrial enzyme exist with molecular masses of 60 kDa and 120 kDa (Hakkola, E.H. and Hiltunen, J.K. (1993) Eur. J. Biochem. 215:199-204). The 120 kDa mitochondrial rat enzyme is synthesized as a 335 amino acid precursor with a 29 amino acid N-terminal leader peptide which is cleaved to form the mature enzyme (Hirose, A. et al. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1049:346-349). A human mitochondrial enzyme 83% similar to rat enzyme is synthesized as a 335 amino acid residue precursor with a 19 amino acid N-terminal leader peptide (Koivuranta, supra). These cloned human and rat mitochondrial enzymes function as homotetramers (Koivuranta, supra). A Saccharomyces cerevisiae peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase is 295 amino acids long, contains a C-terminal peroxisomal targeting signal, and functions as a homodimer (Coe, J.G.S. et al. (1994) Mol. Gen. Genet. 244:661-672; and Gurvitz, A. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:22140-22147). All 2,4-dienoyl-CoA reductases have a fairly well conserved NADPH binding site motif of sequence (Koivuranta, supra).

The main pathway beta-oxidation enzyme enoyl-CoA hydratase catalyzes the following reaction:

2-trans-enoyl-CoA + H_2O <---> 3-hydroxyacyl-CoA

This reaction hydrates the double bond between C-2 and C-3 of 2-trans-enoyl-CoA, which is generated from saturated and unsaturated fatty acids (Engel, C.K. et al. (1996) EMBO J. 15:5135-5145). This step is downstream from the step catalyzed by 2,4-dienoyl-reductase. Different enoyl-CoA hydratases act on short-, medium-, and long-chain fatty acids (Eaton, supra). Mitochondrial and peroxisomal enoyl-CoA hydratases occur as both mono-functional enzymes and as part of multi-functional enzyme complexes. Human liver mitochondrial short-chain enoyl-CoA hydratase is synthesized as a 290 amino acid precursor with a 29 amino acid N-terminal leader peptide (Kanazawa, M. et al. (1993) Enzyme Protein 47:9-13; and Janssen, U. et al. (1997) Genomics 40:470-475). Rat short-chain enoyl-CoA hydratase is 87% identical to the human sequence in the mature region of the protein and functions as a homohexamer (Kanazawa, supra; and Engel, supra). A mitochondrial trifunctional protein exists that has long-chain enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and long-chain 3-oxothiolase activities (Eaton, supra). In human peroxisomes, enoyl-CoA hydratase activity is found in both a 327 amino acid residue mono-functional enzyme and as part of a multi-functional enzyme, also known as bifunctional enzyme, which possesses enoyl-CoA hydratase, enoyl-CoA isomerase, and 3-hydroxyacyl-CoA hydrogenase activities (FitzPatrick, D.R. et al. (1995) Genomics 27:457-466; and Hoefler, G. et al. (1994) Genomics 19:60-67). A 339 amino

acid residue human protein with short-chain enoyl-CoA hydratase activity also acts as an AU-specific RNA binding protein (Nakagawa, J. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:2051-2055). All enoyl-CoA hydratases share homology near two active site glutamic acid residues, with 17 amino acid residues highly conserved (Wu, W.-J. et al. (1997) Biochemistry 36:2211-2220).

Inherited deficiencies in mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation enzymes are associated with severe diseases, some of which manifest themselves soon after birth and lead to death within a few years. Mitochondrial beta-oxidation associated deficiencies include, e.g., carnitine palmitoyl transferase and carnitine deficiency, very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, electron transport flavoprotein and electron transport flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase deficiency, trifunctional protein deficiency, and short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (Eaton, supra). Mitochondrial trifunctional protein (including enoyl-CoA hydratase) deficient patients have reduced long-chain enoyl-CoA hydratase activities and suffer from non-ketotic hypoglycemia, sudden infant death syndrome, cardiomyopathy, hepatic dysfunction, and muscle weakness, and may die at an early age (Eaton, supra). A patient with a deficiency in mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductase was hypotonic soon after birth, had feeding difficulties, and died at four months from respiratory acidosis (Roe, C.R. et al. (1990) J. Clin. Invest. 85:1703-1707).

Defects in mitochondrial beta-oxidation are associated with Reye's syndrome, a disease characterized by hepatic dysfunction and encephalopathy that sometimes follows viral infection in children. Reye's syndrome patients may have elevated serum levels of free fatty acids (Cotran, R.S. et al. (1994) Robbins Pathologic Basis of Disease, W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, p.866). Patients with mitochondrial short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency and medium-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency also exhibit Reye-like illnesses (Eaton, supra; and Egidio, R.J. et al. (1989) Am. Fam. Physician 39:221-226).

Inherited conditions associated with peroxisomal beta-oxidation include Zellweger syndrome, neonatal adrenoleukodystrophy, infantile Refsum's disease, acyl-CoA oxidase deficiency, peroxisomal thiolase deficiency, and bifunctional protein deficiency (Suzuki, Y. et al. (1994) Am. J. Hum. Genet. 54:36-43; Hoefler, supra). Patients with peroxisomal bifunctional enzyme, including enoyl-CoA hydratase, deficiency suffer from hypotonia, seizures, psychomotor defects, and defective neuronal migration; accumulate very-long-chain fatty acids; and typically die within a few years of birth (Watkins, P.A. et al. (1989) J. Clin. Invest. 83:771-777).

Peroxisomal beta-oxidation is impaired in cancerous tissue. Although neoplastic human breast epithelial cells have the same number of peroxisomes as do normal cells, fatty acyl-CoA oxidase activity is lower than in control tissue (el Bouhtoury, F., et al. (1992) J. Pathol. 166:27-35). Human colon carcinomas have fewer peroxisomes than normal colon tissue and have lower fatty-

acyl-CoA oxidase and bifunctional enzyme (including enoyl-CoA hydratase) activities than normal tissue (Cable, S., et al. (1992) Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol. 62:221-226).

Protein Disulfide Isomerases, Thioredoxins, and Glutaredoxins

Cells contain a number of specialized molecules that assist in the formation of protein secondary and tertiary structure by orchestrating the formation of disulfide bonds. Although incubation of reduced, unfolded proteins in buffers with defined ratios of oxidized and reduced thiols can lead to native conformation, the rate of folding is slow and the attainment of native conformation decreases proportionately to the size and number of cysteins in the protein. Certain cellular compartments such as the endoplasmic reticulum of eukaryotes and the periplasmic space of prokaryotes are maintained in a more oxidized state than the surrounding cytosol. Correct disulfide formation can occur in these compartments but at a rate that is insufficient for normal cell processes and not adequate for synthesizing secreted proteins. The protein disulfide isomerases, thioredoxins and glutaredoxins are able to catalyze the formation of disulfide bonds and regulate the redox environment in cells to enable the necessary thiol:disulfide exchanges (Loferer, H. (1995) J. Biol Chem. 270:26178-26183).

Each of these proteins have somewhat different functions but all belong to a group of disulfide-containing redox proteins that contain a conserved active-site sequence and are ubiquitously distributed in eukaryotes and prokaryotes. Protein disulfide isomerases are found in the endoplasmic reticulum of eukaryotes and in the periplasmic space of prokaryotes. They function by exchanging their own disulfide for a thiol in a folding peptide chain. In contrast, the reduced thioredoxins and glutaredoxins are generally found in the cytoplasm and function by directly reducing disulfides in the substrate proteins.

These catalytic molecules not only facilitate disulfide formation but also regulate and participate in a wide variety of physiological processes. The thioredoxin system serves, for example, as a hydrogen donor for ribonucleotide reductase and as a regulator of enzymes by redox control. It also modulates the activity of transcription factors such as NF-κB, AP-1, and steroid receptors.

Secreted Redox Proteins

Redox polypeptides are also released into the extracellular environment and may have similar or distinct functions compared to their intracellular homologs. Several cytokines or secreted cytokine-like factors such as adult T-cell leukemia-derived factor, 3B6-interleukin-1, T-hybridoma-derived (MP-6) B cell stimulatory factor, and early pregnancy factor have been reported to be identical to thioredoxin (Holmgren, A. (1985) Annu. Rev. Biochem. 54:237-271; Abate, C. et al. (1990) Science 249:1157-1161; Tagaya, Y. et al. (1989) EMBO J. 8:757-764; Wakasugi, H. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:804-808; Rosen, A. et al. (1995) Int. Immunol. 7:625-633). Thus thioredoxin secreted by stimulatied lymphocytes (Yodoi , J. and Tursz, T. (1991) Adv. Cancer Res.

57:381-411; Tagaya, N. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8282-8286) has extracellular activities including a role as a regulator of cell growth and a mediator in the immune system (Miranda-Vizuete, A. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:19099-19103; Yamauchi, A. et al. (1992) Mol. Immunol. 29:263-270).

The selenoprotein thioredoxin reductase is secreted by both normal and neoplastic cells and has been implicated as both a growth factor and as a polypeptide involved in apoptosis (Soderberg, A. et al. (2000) Cancer Res. 60:2281-2289). An extracellular plasmin reductase secreted by hamster ovary cells (HT-1080) has been show to participate in the generation of angiostatin from plasmin. In this case, the reduction of the plasmin disulfide bonds triggers the proteolytic cleavage of plasmin which yields the angiogenesis inhibitor, angiostatin (Stathakis, P. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:20641-20645). Low levels of reduced sulphhydryl groups in plasma has been associated with rheumatoid arthritis. The failure of these sulphhydryl groups to scavenge active oxygen species (e.g., hydrogen peroxide produced by activated neutrophils) results in oxidative damage to surrounding tissues and the resulting inflamation (Hall, N.D. et al. (1994) Rheumatol. Int. 4:35-38).

The discovery of new human glutathione peroxidases, thioredoxins, beta-oxidation enzymes, glutaredoxin β, and other molecules involved in maintaining the correct oxidation potential and directing critical redox reactions in cells or in extracellular spaces, and the polynucleotides encoding them, satisfies a need in the art by providing new compositions which are useful in the diagnosis, prevention, and treatment of cell proliferative, neurological, and metabolic disorders, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of secreted redox proteins.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention features purified polypeptides, secreted redox proteins, referred to collectively as "SRP" and individually as "SRP-1," "SRP-2," and "SRP-3." In one aspect, the invention provides an isolated polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3. In one alternative, the invention provides an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1-3.

The invention further provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the

group consisting of SEQ ID NO:1-3, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3. In one alternative, the polynucleotide encodes a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3. In another alternative, the polynucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6.

Additionally, the invention provides a recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a polynucleotide encoding a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3. In one alternative, the invention provides a cell transformed with the recombinant polynucleotide. In another alternative, the invention provides a transgenic organism comprising the recombinant polynucleotide.

The invention also provides a method for producing a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3. The method comprises a) culturing a cell under conditions suitable for expression of the polypeptide, wherein said cell is transformed with a recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a polynucleotide encoding the polypeptide, and b) recovering the polypeptide so expressed.

Additionally, the invention provides an isolated antibody which specifically binds to a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group

consisting of SEQ ID NO:1-3.

The invention further provides an isolated polynucleotide selected from the group consisting of a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6, b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6, c) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). In one alternative, the polynucleotide comprises at least 60 contiguous nucleotides.

Additionally, the invention provides a method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide selected from the group consisting of a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6, b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6, c) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). The method comprises a) hybridizing the sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides comprising a sequence complementary to said target polynucleotide in the sample, and which probe specifically hybridizes to said target polynucleotide, under conditions whereby a hybridization complex is formed between said probe and said target polynucleotide or fragments thereof, and b) detecting the presence or absence of said hybridization complex, and optionally, if present, the amount thereof. In one alternative, the probe comprises at least 60 contiguous nucleotides.

The invention further provides a method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide selected from the group consisting of a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6, b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6, c) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). The method comprises a) amplifying said target polynucleotide or fragment thereof using polymerase chain reaction amplification, and b) detecting the presence or absence of said amplified target polynucleotide or fragment thereof, and, optionally, if present, the amount thereof.

The invention further provides a composition comprising an effective amount of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected

from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, and a pharmaceutically acceptable excipient. In one embodiment, the composition comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3. The invention additionally provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional SRP, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

The invention also provides a method for screening a compound for effectiveness as an agonist of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3. The method comprises a) exposing a sample comprising the polypeptide to a compound, and b) detecting agonist activity in the sample. In one alternative, the invention provides a composition comprising an agonist compound identified by the method and a pharmaceutically acceptable excipient. In another alternative, the invention provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional SRP, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

Additionally, the invention provides a method for screening a compound for effectiveness as an antagonist of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3. The method comprises a) exposing a sample comprising the polypeptide to a compound, and b) detecting antagonist activity in the sample. In one alternative, the invention provides a composition comprising an antagonist compound identified by the method and a pharmaceutically acceptable excipient. In another alternative, the invention provides a method of treating a disease or condition associated with overexpression of functional SRP, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

The invention further provides a method of screening for a compound that specifically binds

to a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3. The method comprises a) combining the polypeptide with at least one test compound under suitable conditions, and b) detecting binding of the polypeptide to the test compound, thereby identifying a compound that specifically binds to the polypeptide.

The invention further provides a method of screening for a compound that modulates the activity of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3. The method comprises a) combining the polypeptide with at least one test compound under conditions permissive for the activity of the polypeptide, b) assessing the activity of the polypeptide in the presence of the test compound, and c) comparing the activity of the polypeptide in the presence of the test compound with the activity of the polypeptide in the absence of the test compound, wherein a change in the activity of the polypeptide in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of the polypeptide.

The invention further provides a method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a target polynucleotide, wherein said target polynucleotide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6, the method comprising a) exposing a sample comprising the target polynucleotide to a compound, and b) detecting altered expression of the target polynucleotide.

The invention further provides a method for assessing toxicity of a test compound, said method comprising a) treating a biological sample containing nucleic acids with the test compound; b) hybridizing the nucleic acids of the treated biological sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides of a polynucleotide selected from the group consisting of i) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6, ii) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6, iii) a polynucleotide having a sequence complementary to i), iv) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of

ii), and v) an RNA equivalent of i)-iv). Hybridization occurs under conditions whereby a specific hybridization complex is formed between said probe and a target polynucleotide in the biological sample, said target polynucleotide selected from the group consisting of i) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6, ii) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6, iii) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of i), iv) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of ii), and v) an RNA equivalent of i)-iv). Alternatively, the target polynucleotide comprises a fragment of a polynucleotide sequence selected from the group consisting of i)-v) above; c) quantifying the amount of hybridization complex; and d) comparing the amount of hybridization complex in the treated biological sample with the amount of hybridization complex in an untreated biological sample, wherein a difference in the amount of hybridization complex in the treated biological sample is indicative of toxicity of the test compound.

BRIEF DESCRIPTION OF THE TABLES

Table 1 summarizes the nomenclature for the full length polynucleotide and polypeptide sequences of the present invention.

Table 2 shows the GenBank identification number and annotation of the nearest GenBank homolog for polypeptides of the invention. The probability score for the match between each polypeptide and its GenBank homolog is also shown.

Table 3 shows structural features of polypeptide sequences of the invention, including predicted motifs and domains, along with the methods, algorithms, and searchable databases used for analysis of the polypeptides.

Table 4 lists the cDNA and/or genomic DNA fragments which were used to assemble polynucleotide sequences of the invention, along with selected fragments of the polynucleotide sequences.

Table 5 shows the representative cDNA library for polynucleotides of the invention.

Table 6 provides an appendix which describes the tissues and vectors used for construction of the cDNA libraries shown in Table 5.

Table 7 shows the tools, programs, and algorithms used to analyze the polynucleotides and polypeptides of the invention, along with applicable descriptions, references, and threshold parameters.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

Before the present proteins, nucleotide sequences, and methods are described, it is understood

that this invention is not limited to the particular machines, materials and methods described, as these may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to limit the scope of the present invention which will be limited only by the appended claims.

It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a," "an," and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, a reference to "a host cell" includes a plurality of such host cells, and a reference to "an antibody" is a reference to one or more antibodies and equivalents thereof known to those skilled in the art, and so forth.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any machines, materials, and methods similar or equivalent to those described herein can be used to practice or test the present invention, the preferred machines, materials and methods are now described. All publications mentioned herein are cited for the purpose of describing and disclosing the cell lines, protocols, reagents and vectors which are reported in the publications and which might be used in connection with the invention. Nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention.

DEFINITIONS

"SRP" refers to the amino acid sequences of substantially purified SRP obtained from any species, particularly a mammalian species, including bovine, ovine, porcine, murine, equine, and human, and from any source, whether natural, synthetic, semi-synthetic, or recombinant.

The term "agonist" refers to a molecule which intensifies or mimics the biological activity of SRP. Agonists may include proteins, nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of SRP either by directly interacting with SRP or by acting on components of the biological pathway in which SRP participates.

An "allelic variant" is an alternative form of the gene encoding SRP. Allelic variants may result from at least one mutation in the nucleic acid sequence and may result in altered mRNAs or in polypeptides whose structure or function may or may not be altered. A gene may have none, one, or many allelic variants of its naturally occurring form. Common mutational changes which give rise to allelic variants are generally ascribed to natural deletions, additions, or substitutions of nucleotides. Each of these types of changes may occur alone, or in combination with the others, one or more times in a given sequence.

"Altered" nucleic acid sequences encoding SRP include those sequences with deletions, insertions, or substitutions of different nucleotides, resulting in a polypeptide the same as SRP or a polypeptide with at least one functional characteristic of SRP. Included within this definition are

polymorphisms which may or may not be readily detectable using a particular oligonucleotide probe of the polynucleotide encoding SRP, and improper or unexpected hybridization to allelic variants, with a locus other than the normal chromosomal locus for the polynucleotide sequence encoding SRP. The encoded protein may also be "altered," and may contain deletions, insertions, or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent SRP. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues, as long as the biological or immunological activity of SRP is retained. For example, negatively charged amino acids may include aspartic acid and glutamic acid, and positively charged amino acids may include lysine and arginine. Amino acids with uncharged polar side chains having similar hydrophilicity values may include: asparagine and glutamine; and serine and threonine. Amino acids with uncharged side chains having similar hydrophilicity values may include: leucine, isoleucine, and valine; glycine and alanine; and phenylalanine and tyrosine.

The terms "amino acid" and "amino acid sequence" refer to an oligopeptide, peptide, polypeptide, or protein sequence, or a fragment of any of these, and to naturally occurring or synthetic molecules. Where "amino acid sequence" is recited to refer to a sequence of a naturally occurring protein molecule, "amino acid sequence" and like terms are not meant to limit the amino acid sequence to the complete native amino acid sequence associated with the recited protein molecule.

"Amplification" relates to the production of additional copies of a nucleic acid sequence. Amplification is generally carried out using polymerase chain reaction (PCR) technologies well known in the art.

The term "antagonist" refers to a molecule which inhibits or attenuates the biological activity of SRP. Antagonists may include proteins such as antibodies, nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of SRP either by directly interacting with SRP or by acting on components of the biological pathway in which SRP participates.

The term "antibody" refers to intact immunoglobulin molecules as well as to fragments thereof, such as Fab, $F(ab')_2$, and Fv fragments, which are capable of binding an epitopic determinant. Antibodies that bind SRP polypeptides can be prepared using intact polypeptides or using fragments containing small peptides of interest as the immunizing antigen. The polypeptide or oligopeptide used to immunize an animal (e.g., a mouse, a rat, or a rabbit) can be derived from the translation of RNA, or synthesized chemically, and can be conjugated to a carrier protein if desired. Commonly used carriers that are chemically coupled to peptides include bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin (KLH). The coupled peptide is then used to immunize the animal.

The term "antigenic determinant" refers to that region of a molecule (i.e., an epitope) that

makes contact with a particular antibody. When a protein or a fragment of a protein is used to immunize a host animal, numerous regions of the protein may induce the production of antibodies which bind specifically to antigenic determinants (particular regions or three-dimensional structures on the protein). An antigenic determinant may compete with the intact antigen (i.e., the immunogen used to elicit the immune response) for binding to an antibody.

The term "antisense" refers to any composition capable of base-pairing with the "sense" (coding) strand of a specific nucleic acid sequence. Antisense compositions may include DNA; RNA; peptide nucleic acid (PNA); oligonucleotides having modified backbone linkages such as phosphorothioates, methylphosphonates, or benzylphosphonates; oligonucleotides having modified sugar groups such as 2'-methoxyethyl sugars or 2'-methoxyethoxy sugars; or oligonucleotides having modified bases such as 5-methyl cytosine, 2'-deoxyuracil, or 7-deaza-2'-deoxyguanosine. Antisense molecules may be produced by any method including chemical synthesis or transcription. Once introduced into a cell, the complementary antisense molecule base-pairs with a naturally occurring nucleic acid sequence produced by the cell to form duplexes which block either transcription or translation. The designation "negative" or "minus" can refer to the antisense strand, and the designation "positive" or "plus" can refer to the sense strand of a reference DNA molecule.

The term "biologically active" refers to a protein having structural, regulatory, or biochemical functions of a naturally occurring molecule. Likewise, "immunologically active" or "immunogenic" refers to the capability of the natural, recombinant, or synthetic SRP, or of any oligopeptide thereof, to induce a specific immune response in appropriate animals or cells and to bind with specific antibodies.

"Complementary" describes the relationship between two single-stranded nucleic acid sequences that anneal by base-pairing. For example, 5'-AGT-3' pairs with its complement, 3'-TCA-5'.

A "composition comprising a given polynucleotide sequence" and a "composition comprising a given amino acid sequence" refer broadly to any composition containing the given polynucleotide or amino acid sequence. The composition may comprise a dry formulation or an aqueous solution. Compositions comprising polynucleotide sequences encoding SRP or fragments of SRP may be employed as hybridization probes. The probes may be stored in freeze-dried form and may be associated with a stabilizing agent such as a carbohydrate. In hybridizations, the probe may be deployed in an aqueous solution containing salts (e.g., NaCl), detergents (e.g., sodium dodecyl sulfate; SDS), and other components (e.g., Denhardt's solution, dry milk, salmon sperm DNA, etc.).

"Consensus sequence" refers to a nucleic acid sequence which has been subjected to repeated DNA sequence analysis to resolve uncalled bases, extended using the XL-PCR kit (Applied Biosystems, Foster City CA) in the 5' and/or the 3' direction, and resequenced, or which has been

assembled from one or more overlapping cDNA, EST, or genomic DNA fragments using a computer program for fragment assembly, such as the GELVIEW fragment assembly system (GCG, Madison WI) or Phrap (University of Washington, Seattle WA). Some sequences have been both extended and assembled to produce the consensus sequence.

"Conservative amino acid substitutions" are those substitutions that are predicted to least interfere with the properties of the original protein, i.e., the structure and especially the function of the protein is conserved and not significantly changed by such substitutions. The table below shows amino acids which may be substituted for an original amino acid in a protein and which are regarded as conservative amino acid substitutions.

Original Residue	Conservative Substitution
Ala	Gly, Ser
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Gln, His
Gly	Ala
His	Asn, Arg, Gln, Glu
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

Conservative amino acid substitutions generally maintain (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a beta sheet or alpha helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the site of the substitution, and/or (c) the bulk of the side chain.

A "deletion" refers to a change in the amino acid or nucleotide sequence that results in the absence of one or more amino acid residues or nucleotides.

The term "derivative" refers to a chemically modified polynucleotide or polypeptide. Chemical modifications of a polynucleotide can include, for example, replacement of hydrogen by an alkyl, acyl, hydroxyl, or amino group. A derivative polynucleotide encodes a polypeptide which retains at least one biological or immunological function of the natural molecule. A derivative polypeptide is one modified by glycosylation, pegylation, or any similar process that retains at least

one biological or immunological function of the polypeptide from which it was derived.

A "detectable label" refers to a reporter molecule or enzyme that is capable of generating a measurable signal and is covalently or noncovalently joined to a polynucleotide or polypeptide.

"Differential expression" refers to increased or upregulated; or decreased, downregulated, or absent gene or protein expression, determined by comparing at least two different samples. Such comparisons may be carried out between, for example, a treated and an untreated sample, or a diseased and a normal sample.

A "fragment" is a unique portion of SRP or the polynucleotide encoding SRP which is identical in sequence to but shorter in length than the parent sequence. A fragment may comprise up to the entire length of the defined sequence, minus one nucleotide/amino acid residue. For example, a fragment may comprise from 5 to 1000 contiguous nucleotides or amino acid residues. A fragment used as a probe, primer, antigen, therapeutic molecule, or for other purposes, may be at least 5, 10, 15, 16, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 150, 250 or at least 500 contiguous nucleotides or amino acid residues in length. Fragments may be preferentially selected from certain regions of a molecule. For example, a polypeptide fragment may comprise a certain length of contiguous amino acids selected from the first 250 or 500 amino acids (or first 25% or 50%) of a polypeptide as shown in a certain defined sequence. Clearly these lengths are exemplary, and any length that is supported by the specification, including the Sequence Listing, tables, and figures, may be encompassed by the present embodiments.

A fragment of SEQ ID NO:4-6 comprises a region of unique polynucleotide sequence that specifically identifies SEQ ID NO:4-6, for example, as distinct from any other sequence in the genome from which the fragment was obtained. A fragment of SEQ ID NO:4-6 is useful, for example, in hybridization and amplification technologies and in analogous methods that distinguish SEQ ID NO:4-6 from related polynucleotide sequences. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:4-6 and the region of SEQ ID NO:4-6 to which the fragment corresponds are routinely determinable by one of ordinary skill in the art based on the intended purpose for the fragment.

A fragment of SEQ ID NO:1-3 is encoded by a fragment of SEQ ID NO:4-6. A fragment of SEQ ID NO:1-3 comprises a region of unique amino acid sequence that specifically identifies SEQ ID NO:1-3. For example, a fragment of SEQ ID NO:1-3 is useful as an immunogenic peptide for the development of antibodies that specifically recognize SEQ ID NO:1-3. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:1-3 and the region of SEQ ID NO:1-3 to which the fragment corresponds are routinely determinable by one of ordinary skill in the art based on the intended purpose for the fragment.

A "full length" polynucleotide sequence is one containing at least a translation initiation codon (e.g., methionine) followed by an open reading frame and a translation termination codon. A

"full length" polynucleotide sequence encodes a "full length" polypeptide sequence.

"Homology" refers to sequence similarity or, interchangeably, sequence identity, between two or more polynucleotide sequences or two or more polypeptide sequences.

The terms "percent identity" and "% identity," as applied to polynucleotide sequences, refer to the percentage of residue matches between at least two polynucleotide sequences aligned using a standardized algorithm. Such an algorithm may insert, in a standardized and reproducible way, gaps in the sequences being compared in order to optimize alignment between two sequences, and therefore achieve a more meaningful comparison of the two sequences.

Percent identity between polynucleotide sequences may be determined using the default parameters of the CLUSTAL V algorithm as incorporated into the MEGALIGN version 3.12e sequence alignment program. This program is part of the LASERGENE software package, a suite of molecular biological analysis programs (DNASTAR, Madison WI). CLUSTAL V is described in Higgins, D.G. and P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153 and in Higgins, D.G. et al. (1992) CABIOS 8:189-191. For pairwise alignments of polynucleotide sequences, the default parameters are set as follows: Ktuple=2, gap penalty=5, window=4, and "diagonals saved"=4. The "weighted" residue weight table is selected as the default. Percent identity is reported by CLUSTAL V as the "percent similarity" between aligned polynucleotide sequences.

Alternatively, a suite of commonly used and freely available sequence comparison algorithms is provided by the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410), which is available from several sources, including the NCBI, Bethesda, MD, and on the Internet at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. The BLAST software suite includes various sequence analysis programs including "blastn," that is used to align a known polynucleotide sequence with other polynucleotide sequences from a variety of databases. Also available is a tool called "BLAST 2 Sequences" that is used for direct pairwise comparison of two nucleotide sequences. "BLAST 2 Sequences" can be accessed and used interactively at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html. The "BLAST 2 Sequences" tool can be used for both blastn and blastp (discussed below). BLAST programs are commonly used with gap and other parameters set to default settings. For example, to compare two nucleotide sequences, one may use blastn with the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.12 (April-21-2000) set at default parameters. Such default parameters may be, for example:

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

Percent identity may be measured over the length of an entire defined sequence, for example, as defined by a particular SEQ ID number, or may be measured over a shorter length, for example, over the length of a fragment taken from a larger, defined sequence, for instance, a fragment of at least 20, at least 30, at least 40, at least 50, at least 70, at least 100, or at least 200 contiguous nucleotides. Such lengths are exemplary only, and it is understood that any fragment length supported by the sequences shown herein, in the tables, figures, or Sequence Listing, may be used to describe a length over which percentage identity may be measured.

Nucleic acid sequences that do not show a high degree of identity may nevertheless encode similar amino acid sequences due to the degeneracy of the genetic code. It is understood that changes in a nucleic acid sequence can be made using this degeneracy to produce multiple nucleic acid sequences that all encode substantially the same protein.

The phrases "percent identity" and "% identity," as applied to polypeptide sequences, refer to the percentage of residue matches between at least two polypeptide sequences aligned using a standardized algorithm. Methods of polypeptide sequence alignment are well-known. Some alignment methods take into account conservative amino acid substitutions. Such conservative substitutions, explained in more detail above, generally preserve the charge and hydrophobicity at the site of substitution, thus preserving the structure (and therefore function) of the polypeptide.

Percent identity between polypeptide sequences may be determined using the default parameters of the CLUSTAL V algorithm as incorporated into the MEGALIGN version 3.12e sequence alignment program (described and referenced above). For pairwise alignments of polypeptide sequences using CLUSTAL V, the default parameters are set as follows: Ktuple=1, gap penalty=3, window=5, and "diagonals saved"=5. The PAM250 matrix is selected as the default residue weight table. As with polynucleotide alignments, the percent identity is reported by CLUSTAL V as the "percent similarity" between aligned polypeptide sequence pairs.

Alternatively the NCBI BLAST software suite may be used. For example, for a pairwise comparison of two polypeptide sequences, one may use the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.12 (April-21-2000) with blastp set at default parameters. Such default parameters may be, for example:

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 and Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

Percent identity may be measured over the length of an entire defined polypeptide sequence, for example, as defined by a particular SEQ ID number, or may be measured over a shorter length, for example, over the length of a fragment taken from a larger, defined polypeptide sequence, for instance, a fragment of at least 15, at least 20, at least 30, at least 40, at least 50, at least 70 or at least 150 contiguous residues. Such lengths are exemplary only, and it is understood that any fragment length supported by the sequences shown herein, in the tables, figures or Sequence Listing, may be used to describe a length over which percentage identity may be measured.

"Human artificial chromosomes" (HACs) are linear microchromosomes which may contain DNA sequences of about 6 kb to 10 Mb in size and which contain all of the elements required for chromosome replication, segregation and maintenance.

The term "humanized antibody" refers to an antibody molecule in which the amino acid sequence in the non-antigen binding regions has been altered so that the antibody more closely resembles a human antibody, and still retains its original binding ability.

"Hybridization" refers to the process by which a polynucleotide strand anneals with a complementary strand through base pairing under defined hybridization conditions. Specific hybridization is an indication that two nucleic acid sequences share a high degree of complementarity. Specific hybridization complexes form under permissive annealing conditions and remain hybridized after the "washing" step(s). The washing step(s) is particularly important in determining the stringency of the hybridization process, with more stringent conditions allowing less non-specific binding, i.e., binding between pairs of nucleic acid strands that are not perfectly matched. Permissive conditions for annealing of nucleic acid sequences are routinely determinable by one of ordinary skill in the art and may be consistent among hybridization experiments, whereas wash conditions may be varied among experiments to achieve the desired stringency, and therefore hybridization specificity. Permissive annealing conditions occur, for example, at 68°C in the presence of about 6 x SSC, about 1% (w/v) SDS, and about 100 μg/ml sheared, denatured salmon sperm DNA.

Generally, stringency of hybridization is expressed, in part, with reference to the temperature under which the wash step is carried out. Such wash temperatures are typically selected to be about 5°C to 20°C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The T_m is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence hybridizes to a perfectly matched probe. An equation for calculating T_m and conditions for nucleic acid hybridization are well known and can be found in Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY; specifically see volume 2, chapter 9.

High stringency conditions for hybridization between polynucleotides of the present invention include wash conditions of 68°C in the presence of about 0.2 x SSC and about 0.1% SDS, for 1 hour. Alternatively, temperatures of about 65°C, 60°C, 55°C, or 42°C may be used. SSC concentration may be varied from about 0.1 to 2 x SSC, with SDS being present at about 0.1%. Typically, blocking reagents are used to block non-specific hybridization. Such blocking reagents include, for instance, sheared and denatured salmon sperm DNA at about 100-200 μg/ml. Organic solvent, such as formamide at a concentration of about 35-50% v/v, may also be used under particular circumstances, such as for RNA:DNA hybridizations. Useful variations on these wash conditions will be readily apparent to those of ordinary skill in the art. Hybridization, particularly under high stringency conditions, may be suggestive of evolutionary similarity between the nucleotides. Such similarity is strongly indicative of a similar role for the nucleotides and their encoded polypeptides.

The term "hybridization complex" refers to a complex formed between two nucleic acid sequences by virtue of the formation of hydrogen bonds between complementary bases. A hybridization complex may be formed in solution (e.g., C_0t or R_0t analysis) or formed between one nucleic acid sequence present in solution and another nucleic acid sequence immobilized on a solid support (e.g., paper, membranes, filters, chips, pins or glass slides, or any other appropriate substrate to which cells or their nucleic acids have been fixed).

The words "insertion" and "addition" refer to changes in an amino acid or nucleotide sequence resulting in the addition of one or more amino acid residues or nucleotides, respectively.

"Immune response" can refer to conditions associated with inflammation, trauma, immune disorders, or infectious or genetic disease, etc. These conditions can be characterized by expression of various factors, e.g., cytokines, chemokines, and other signaling molecules, which may affect cellular and systemic defense systems.

An "immunogenic fragment" is a polypeptide or oligopeptide fragment of SRP which is capable of eliciting an immune response when introduced into a living organism, for example, a mammal. The term "immunogenic fragment" also includes any polypeptide or oligopeptide fragment of SRP which is useful in any of the antibody production methods disclosed herein or known in the art.

The term "microarray" refers to an arrangement of a plurality of polynucleotides, polypeptides, or other chemical compounds on a substrate.

The terms "element" and "array element" refer to a polynucleotide, polypeptide, or other chemical compound having a unique and defined position on a microarray.

The term "modulate" refers to a change in the activity of SRP. For example, modulation may cause an increase or a decrease in protein activity, binding characteristics, or any other biological, functional, or immunological properties of SRP.

The phrases "nucleic acid" and "nucleic acid sequence" refer to a nucleotide, oligonucleotide, polynucleotide, or any fragment thereof. These phrases also refer to DNA or RNA of genomic or synthetic origin which may be single-stranded or double-stranded and may represent the sense or the antisense strand, to peptide nucleic acid (PNA), or to any DNA-like or RNA-like material.

"Operably linked" refers to the situation in which a first nucleic acid sequence is placed in a functional relationship with a second nucleic acid sequence. For instance, a promoter is operably linked to a coding sequence if the promoter affects the transcription or expression of the coding sequence. Operably linked DNA sequences may be in close proximity or contiguous and, where necessary to join two protein coding regions, in the same reading frame.

"Peptide nucleic acid" (PNA) refers to an antisense molecule or anti-gene agent which comprises an oligonucleotide of at least about 5 nucleotides in length linked to a peptide backbone of amino acid residues ending in lysine. The terminal lysine confers solubility to the composition. PNAs preferentially bind complementary single stranded DNA or RNA and stop transcript elongation, and may be pegylated to extend their lifespan in the cell.

"Post-translational modification" of an SRP may involve lipidation, glycosylation, phosphorylation, acetylation, racemization, proteolytic cleavage, and other modifications known in the art. These processes may occur synthetically or biochemically. Biochemical modifications will vary by cell type depending on the enzymatic milieu of SRP.

"Probe" refers to nucleic acid sequences encoding SRP, their complements, or fragments thereof, which are used to detect identical, allelic or related nucleic acid sequences. Probes are isolated oligonucleotides or polynucleotides attached to a detectable label or reporter molecule. Typical labels include radioactive isotopes, ligands, chemiluminescent agents, and enzymes. "Primers" are short nucleic acids, usually DNA oligonucleotides, which may be annealed to a target polynucleotide by complementary base-pairing. The primer may then be extended along the target DNA strand by a DNA polymerase enzyme. Primer pairs can be used for amplification (and identification) of a nucleic acid sequence, e.g., by the polymerase chain reaction (PCR).

Probes and primers as used in the present invention typically comprise at least 15 contiguous nucleotides of a known sequence. In order to enhance specificity, longer probes and primers may also be employed, such as probes and primers that comprise at least 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, or at least 150 consecutive nucleotides of the disclosed nucleic acid sequences. Probes and primers may be considerably longer than these examples, and it is understood that any length supported by the specification, including the tables, figures, and Sequence Listing, may be used.

Methods for preparing and using probes and primers are described in the references, for example Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY; Ausubel, F.M. et al. (1987) Current Protocols in Molecular

Biology, Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY; Innis, M. et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego CA. PCR primer pairs can be derived from a known sequence, for example, by using computer programs intended for that purpose such as Primer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA).

Oligonucleotides for use as primers are selected using software known in the art for such purpose. For example, OLIGO 4.06 software is useful for the selection of PCR primer pairs of up to 100 nucleotides each, and for the analysis of oligonucleotides and larger polynucleotides of up to 5,000 nucleotides from an input polynucleotide sequence of up to 32 kilobases. Similar primer selection programs have incorporated additional features for expanded capabilities. For example, the PrimOU primer selection program (available to the public from the Genome Center at University of Texas South West Medical Center, Dallas TX) is capable of choosing specific primers from megabase sequences and is thus useful for designing primers on a genome-wide scope. The Primer3 primer selection program (available to the public from the Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MA) allows the user to input a "mispriming library," in which sequences to avoid as primer binding sites are user-specified. Primer3 is useful, in particular, for the selection of oligonucleotides for microarrays. (The source code for the latter two primer selection programs may also be obtained from their respective sources and modified to meet the user's specific needs.) The PrimeGen program (available to the public from the UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UK) designs primers based on multiple sequence alignments, thereby allowing selection of primers that hybridize to either the most conserved or least conserved regions of aligned nucleic acid sequences. Hence, this program is useful for identification of both unique and conserved oligonucleotides and polynucleotide fragments. The oligonucleotides and polynucleotide fragments identified by any of the above selection methods are useful in hybridization technologies, for example, as PCR or sequencing primers, microarray elements, or specific probes to identify fully or partially complementary polynucleotides in a sample of nucleic acids. Methods of oligonucleotide selection are not limited to those described above.

A "recombinant nucleic acid" is a sequence that is not naturally occurring or has a sequence that is made by an artificial combination of two or more otherwise separated segments of sequence. This artificial combination is often accomplished by chemical synthesis or, more commonly, by the artificial manipulation of isolated segments of nucleic acids, e.g., by genetic engineering techniques such as those described in Sambrook, supra. The term recombinant includes nucleic acids that have been altered solely by addition, substitution, or deletion of a portion of the nucleic acid. Frequently, a recombinant nucleic acid may include a nucleic acid sequence operably linked to a promoter sequence. Such a recombinant nucleic acid may be part of a vector that is used, for example, to

transform a cell.

Alternatively, such recombinant nucleic acids may be part of a viral vector, e.g., based on a vaccinia virus, that could be use to vaccinate a mammal wherein the recombinant nucleic acid is expressed, inducing a protective immunological response in the mammal.

A "regulatory element" refers to a nucleic acid sequence usually derived from untranslated regions of a gene and includes enhancers, promoters, introns, and 5' and 3' untranslated regions (UTRs). Regulatory elements interact with host or viral proteins which control transcription, translation, or RNA stability.

"Reporter molecules" are chemical or biochemical moieties used for labeling a nucleic acid, amino acid, or antibody. Reporter molecules include radionuclides; enzymes; fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents; substrates; cofactors; inhibitors; magnetic particles; and other moieties known in the art.

An "RNA equivalent," in reference to a DNA sequence, is composed of the same linear sequence of nucleotides as the reference DNA sequence with the exception that all occurrences of the nitrogenous base thymine are replaced with uracil, and the sugar backbone is composed of ribose instead of deoxyribose.

The term "sample" is used in its broadest sense. A sample suspected of containing SRP, nucleic acids encoding SRP, or fragments thereof may comprise a bodily fluid; an extract from a cell, chromosome, organelle, or membrane isolated from a cell; a cell; genomic DNA, RNA, or cDNA, in solution or bound to a substrate; a tissue; a tissue print; etc.

The terms "specific binding" and "specifically binding" refer to that interaction between a protein or peptide and an agonist, an antibody, an antagonist, a small molecule, or any natural or synthetic binding composition. The interaction is dependent upon the presence of a particular structure of the protein, e.g., the antigenic determinant or epitope, recognized by the binding molecule. For example, if an antibody is specific for epitope "A," the presence of a polypeptide comprising the epitope A, or the presence of free unlabeled A, in a reaction containing free labeled A and the antibody will reduce the amount of labeled A that binds to the antibody.

The term "substantially purified" refers to nucleic acid or amino acid sequences that are removed from their natural environment and are isolated or separated, and are at least 60% free, preferably at least 75% free, and most preferably at least 90% free from other components with which they are naturally associated.

A "substitution" refers to the replacement of one or more amino acid residues or nucleotides by different amino acid residues or nucleotides, respectively.

"Substrate" refers to any suitable rigid or semi-rigid support including membranes, filters, chips, slides, wafers, fibers, magnetic or nonmagnetic beads, gels, tubing, plates, polymers,

microparticles and capillaries. The substrate can have a variety of surface forms, such as wells, trenches, pins, channels and pores, to which polynucleotides or polypeptides are bound.

A "transcript image" refers to the collective pattern of gene expression by a particular cell type or tissue under given conditions at a given time.

"Transformation" describes a process by which exogenous DNA is introduced into a recipient cell. Transformation may occur under natural or artificial conditions according to various methods well known in the art, and may rely on any known method for the insertion of foreign nucleic acid sequences into a prokaryotic or eukaryotic host cell. The method for transformation is selected based on the type of host cell being transformed and may include, but is not limited to, bacteriophage or viral infection, electroporation, heat shock, lipofection, and particle bombardment. The term "transformed cells" includes stably transformed cells in which the inserted DNA is capable of replication either as an autonomously replicating plasmid or as part of the host chromosome, as well as transiently transformed cells which express the inserted DNA or RNA for limited periods of time.

A "transgenic organism," as used herein, is any organism, including but not limited to animals and plants, in which one or more of the cells of the organism contains heterologous nucleic acid introduced by way of human intervention, such as by transgenic techniques well known in the art. The nucleic acid is introduced into the cell, directly or indirectly by introduction into a precursor of the cell, by way of deliberate genetic manipulation, such as by microinjection or by infection with a recombinant virus. The term genetic manipulation does not include classical cross-breeding, or in vitro fertilization, but rather is directed to the introduction of a recombinant DNA molecule. The transgenic organisms contemplated in accordance with the present invention include bacteria, cyanobacteria, fungi, plants and animals. The isolated DNA of the present invention can be introduced into the host by methods known in the art, for example infection, transfection, transformation or transconjugation. Techniques for transferring the DNA of the present invention into such organisms are widely known and provided in references such as Sambrook et al. (1989), supra.

A "variant" of a particular nucleic acid sequence is defined as a nucleic acid sequence having at least 40% sequence identity to the particular nucleic acid sequence over a certain length of one of the nucleic acid sequences using blastn with the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.9 (May-07-1999) set at default parameters. Such a pair of nucleic acids may show, for example, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 91%, at least 92%, at least 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% or greater sequence identity over a certain defined length. A variant may be described as, for example, an "allelic" (as defined above), "splice," "species," or "polymorphic" variant. A splice variant may have significant identity to a reference molecule, but will generally have a greater or lesser number of

polynucleotides due to alternative splicing of exons during mRNA processing. The corresponding polypeptide may possess additional functional domains or lack domains that are present in the reference molecule. Species variants are polynucleotide sequences that vary from one species to another. The resulting polypeptides will generally have significant amino acid identity relative to each other. A polymorphic variant is a variation in the polynucleotide sequence of a particular gene between individuals of a given species. Polymorphic variants also may encompass "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) in which the polynucleotide sequence varies by one nucleotide base. The presence of SNPs may be indicative of, for example, a certain population, a disease state, or a propensity for a disease state.

A "variant" of a particular polypeptide sequence is defined as a polypeptide sequence having at least 40% sequence identity to the particular polypeptide sequence over a certain length of one of the polypeptide sequences using blastp with the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.9 (May-07-1999) set at default parameters. Such a pair of polypeptides may show, for example, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 91%, at least 92%, at least 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% or greater sequence identity over a certain defined length of one of the polypeptides.

THE INVENTION

The invention is based on the discovery of new human secreted redox proteins (SRP), the polynucleotides encoding SRP, and the use of these compositions for the diagnosis, treatment, or prevention of cell proliferative, neurological, and metabolic disorders.

Table 1 summarizes the nomenclature for the full length polynucleotide and polypeptide sequences of the invention. Each polynucleotide and its corresponding polypeptide are correlated to a single Incyte project identification number (Incyte Project ID). Each polypeptide sequence is denoted by both a polypeptide sequence identification number (Polypeptide SEQ ID NO:) and an Incyte polypeptide sequence number (Incyte Polypeptide ID) as shown. Each polynucleotide sequence is denoted by both a polynucleotide sequence identification number (Polynucleotide SEQ ID NO:) and an Incyte polynucleotide consensus sequence number (Incyte Polynucleotide ID) as shown.

Table 2 shows sequences with homology to the polypeptides of the invention as identified by BLAST analysis against the GenBank protein (genpept) database. Columns 1 and 2 show the polypeptide sequence identification number (Polypeptide SEQ ID NO:) and the corresponding Incyte polypeptide sequence number (Incyte Polypeptide ID) for polypeptides of the invention. Column 3 shows the GenBank identification number (Genbank ID NO:) of the nearest GenBank homolog. Column 4 shows the probability score for the match between each polypeptide and its GenBank homolog. Column 5 shows the annotation of the GenBank homolog along with relevant citations

where applicable, all of which are expressly incorporated by reference herein.

Table 3 shows various structural features of the polypeptides of the invention. Columns 1 and 2 show the polypeptide sequence identification number (SEQ ID NO:) and the corresponding Incyte polypeptide sequence number (Incyte Polypeptide ID) for each polypeptide of the invention. Column 3 shows the number of amino acid residues in each polypeptide. Column 4 shows potential phosphorylation sites, and column 5 shows potential glycosylation sites, as determined by the MOTIFS program of the GCG sequence analysis software package (Genetics Computer Group, Madison WI). Column 6 shows amino acid residues comprising signature sequences, domains, and motifs. Column 7 shows analytical methods for protein structure/function analysis and in some cases, searchable databases to which the analytical methods were applied.

Together, Tables 2 and 3 summarize the properties of polypeptides of the invention, and these properties establish that the claimed polypeptides are secreted redox proteins. For example, SEQ ID NO:2 is 54% identical to Caenorhabditis elegans glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GenBank ID g7331888) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The BLAST probability score is 1.5e-123, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. Data from BLIMPS analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:2 is a glycerol-3-phosphate dehydrogenase. SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3 were analyzed and annotated in a similar manner. SEQ ID NO:1-3 all contain signal peptide motifs based on SPScan analysis. The algorithms and parameters for the analysis of SEQ ID NO:1-3 are described in Table 7.

As shown in Table 4, the full length polynucleotide sequences of the present invention were assembled using cDNA sequences or coding (exon) sequences derived from genomic DNA, or any combination of these two types of sequences. Columns 1 and 2 list the polynucleotide sequence identification number (Polynucleotide SEQ ID NO:) and the corresponding Incyte polynucleotide consensus sequence number (Incyte Polynucleotide ID) for each polynucleotide of the invention. Column 3 shows the length of each polynucleotide sequence in basepairs. Column 4 lists fragments of the polynucleotide sequences which are useful, for example, in hybridization or amplification technologies that identify SEQ ID NO:4-6 or that distinguish between SEQ ID NO:4-6 and related polynucleotide sequences. Column 5 shows identification numbers corresponding to cDNA sequences, coding sequences (exons) predicted from genomic DNA, and/or sequence assemblages comprised of both cDNA and genomic DNA. These sequences were used to assemble the full length polynucleotide sequences of the invention. Columns 6 and 7 of Table 4 show the nucleotide start (5') and stop (3') positions of the cDNA and/or genomic sequences in column 5 relative to their respective full length sequences.

The identification numbers in Column 5 of Table 4 may refer specifically, for example, to

Incyte cDNAs along with their corresponding cDNA libraries. For example, 6709408F8 is the identification number of an Incyte cDNA sequence, and HEAADIR01 is the cDNA library from which it is derived. Incyte cDNAs for which cDNA libraries are not indicated were derived from pooled cDNA libraries (e.g., 70790623V1). Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to GenBank cDNAs or ESTs which contributed to the assembly of the full length polynucleotide sequences.

In some cases, Incyte cDNA coverage redundant with the sequence coverage shown in column 5 was obtained to confirm the final consensus polynucleotide sequence, but the relevant Incyte cDNA identification numbers are not shown.

Table 5 shows the representative cDNA libraries for those full length polynucleotide sequences which were assembled using Incyte cDNA sequences. The representative cDNA library is the Incyte cDNA library which is most frequently represented by the Incyte cDNA sequences which were used to assemble and confirm the above polynucleotide sequences. The tissues and vectors which were used to construct the cDNA libraries shown in Table 5 are described in Table 6.

The invention also encompasses SRP variants. A preferred SRP variant is one which has at least about 80%, or alternatively at least about 90%, or even at least about 95% amino acid sequence identity to the SRP amino acid sequence, and which contains at least one functional or structural characteristic of SRP.

The invention also encompasses polynucleotides which encode SRP. In a particular embodiment, the invention encompasses a polynucleotide sequence comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6, which encodes SRP. The polynucleotide sequences of SEQ ID NO:4-6, as presented in the Sequence Listing, embrace the equivalent RNA sequences, wherein occurrences of the nitrogenous base thymine are replaced with uracil, and the sugar backbone is composed of ribose instead of deoxyribose.

The invention also encompasses a variant of a polynucleotide sequence encoding SRP. In particular, such a variant polynucleotide sequence will have at least about 70%, or alternatively at least about 85%, or even at least about 95% polynucleotide sequence identity to the polynucleotide sequence encoding SRP. A particular aspect of the invention encompasses a variant of a polynucleotide sequence comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6 which has at least about 70%, or alternatively at least about 85%, or even at least about 95% polynucleotide sequence identity to a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6. Any one of the polynucleotide variants described above can encode an amino acid sequence which contains at least one functional or structural characteristic of SRP.

It will be appreciated by those skilled in the art that as a result of the degeneracy of the genetic code, a multitude of polynucleotide sequences encoding SRP, some bearing minimal

similarity to the polynucleotide sequences of any known and naturally occurring gene, may be produced. Thus, the invention contemplates each and every possible variation of polynucleotide sequence that could be made by selecting combinations based on possible codon choices. These combinations are made in accordance with the standard triplet genetic code as applied to the polynucleotide sequence of naturally occurring SRP, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

Although nucleotide sequences which encode SRP and its variants are generally capable of hybridizing to the nucleotide sequence of the naturally occurring SRP under appropriately selected conditions of stringency, it may be advantageous to produce nucleotide sequences encoding SRP or its derivatives possessing a substantially different codon usage, e.g., inclusion of non-naturally occurring codons. Codons may be selected to increase the rate at which expression of the peptide occurs in a particular prokaryotic or eukaryotic host in accordance with the frequency with which particular codons are utilized by the host. Other reasons for substantially altering the nucleotide sequence encoding SRP and its derivatives without altering the encoded amino acid sequences include the production of RNA transcripts having more desirable properties, such as a greater half-life, than transcripts produced from the naturally occurring sequence.

The invention also encompasses production of DNA sequences which encode SRP and SRP derivatives, or fragments thereof, entirely by synthetic chemistry. After production, the synthetic sequence may be inserted into any of the many available expression vectors and cell systems using reagents well known in the art. Moreover, synthetic chemistry may be used to introduce mutations into a sequence encoding SRP or any fragment thereof.

Also encompassed by the invention are polynucleotide sequences that are capable of hybridizing to the claimed polynucleotide sequences, and, in particular, to those shown in SEQ ID NO:4-6 and fragments thereof under various conditions of stringency. (See, e.g., Wahl, G.M. and S.L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399-407; Kimmel, A.R. (1987) Methods Enzymol. 152:507-511.) Hybridization conditions, including annealing and wash conditions, are described in "Definitions."

Methods for DNA sequencing are well known in the art and may be used to practice any of the embodiments of the invention. The methods may employ such enzymes as the Klenow fragment of DNA polymerase I, SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH), Taq polymerase (Applied Biosystems), thermostable T7 polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ), or combinations of polymerases and proofreading exonucleases such as those found in the ELONGASE amplification system (Life Technologies, Gaithersburg MD). Preferably, sequence preparation is automated with machines such as the MICROLAB 2200 liquid transfer system (Hamilton, Reno NV), PTC200 thermal cycler (MJ Research, Watertown MA) and ABI CATALYST 800 thermal cycler

(Applied Biosystems). Sequencing is then carried out using either the ABI 373 or 377 DNA sequencing system (Applied Biosystems), the MEGABACE 1000 DNA sequencing system (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA), or other systems known in the art. The resulting sequences are analyzed using a variety of algorithms which are well known in the art. (See, e.g., Ausubel, F.M. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7; Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY, pp. 856-853.)

The nucleic acid sequences encoding SRP may be extended utilizing a partial nucleotide sequence and employing various PCR-based methods known in the art to detect upstream sequences, such as promoters and regulatory elements. For example, one method which may be employed, restriction-site PCR, uses universal and nested primers to amplify unknown sequence from genomic DNA within a cloning vector. (See, e.g., Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic. 2:318-322.) Another method, inverse PCR, uses primers that extend in divergent directions to amplify unknown sequence from a circularized template. The template is derived from restriction fragments comprising a known genomic locus and surrounding sequences. (See, e.g., Triglia, T. et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:8186.) A third method, capture PCR, involves PCR amplification of DNA fragments adjacent to known sequences in human and yeast artificial chromosome DNA. (See, e.g., Lagerstrom, M. et al. (1991) PCR Methods Applic. 1:111-119.) In this method, multiple restriction enzyme digestions and ligations may be used to insert an engineered double-stranded sequence into a region of unknown sequence before performing PCR. Other methods which may be used to retrieve unknown sequences are known in the art. (See, e.g., Parker, J.D. et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:3055-3060). Additionally, one may use PCR, nested primers, and PROMOTERFINDER libraries (Clontech, Palo Alto CA) to walk genomic DNA. This procedure avoids the need to screen libraries and is useful in finding intron/exon junctions. For all PCR-based methods, primers may be designed using commercially available software, such as OLIGO 4.06 primer analysis software (National Biosciences, Plymouth MN) or another appropriate program, to be about 22 to 30 nucleotides in length, to have a GC content of about 50% or more, and to anneal to the template at temperatures of about 68°C to 72°C.

When screening for full length cDNAs, it is preferable to use libraries that have been size-selected to include larger cDNAs. In addition, random-primed libraries, which often include sequences containing the 5' regions of genes, are preferable for situations in which an oligo d(T) library does not yield a full-length cDNA. Genomic libraries may be useful for extension of sequence into 5' non-transcribed regulatory regions.

Capillary electrophoresis systems which are commercially available may be used to analyze the size or confirm the nucleotide sequence of sequencing or PCR products. In particular, capillary sequencing may employ flowable polymers for electrophoretic separation, four different nucleotide-

specific, laser-stimulated fluorescent dyes, and a charge coupled device camera for detection of the emitted wavelengths. Output/light intensity may be converted to electrical signal using appropriate software (e.g., GENOTYPER and SEQUENCE NAVIGATOR, Applied Biosystems), and the entire process from loading of samples to computer analysis and electronic data display may be computer controlled. Capillary electrophoresis is especially preferable for sequencing small DNA fragments which may be present in limited amounts in a particular sample.

In another embodiment of the invention, polynucleotide sequences or fragments thereof which encode SRP may be cloned in recombinant DNA molecules that direct expression of SRP, or fragments or functional equivalents thereof, in appropriate host cells. Due to the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences which encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid sequence may be produced and used to express SRP.

The nucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter SRP-encoding sequences for a variety of purposes including, but not limited to, modification of the cloning, processing, and/or expression of the gene product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides may be used to engineer the nucleotide sequences. For example, oligonucleotide-mediated site-directed mutagenesis may be used to introduce mutations that create new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, and so forth.

The nucleotides of the present invention may be subjected to DNA shuffling techniques such as MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; described in U.S. Patent Number 5,837,458; Chang, C.-C. et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; and Crameri, A. et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319) to alter or improve the biological properties of SRP, such as its biological or enzymatic activity or its ability to bind to other molecules or compounds. DNA shuffling is a process by which a library of gene variants is produced using PCR-mediated recombination of gene fragments. The library is then subjected to selection or screening procedures that identify those gene variants with the desired properties. These preferred variants may then be pooled and further subjected to recursive rounds of DNA shuffling and selection/screening. Thus, genetic diversity is created through "artificial" breeding and rapid molecular evolution. For example, fragments of a single gene containing random point mutations may be recombined, screened, and then reshuffled until the desired properties are optimized. Alternatively, fragments of a given gene may be recombined with fragments of homologous genes in the same gene family, either from the same or different species, thereby maximizing the genetic diversity of multiple naturally occurring genes in a directed and controllable manner.

In another embodiment, sequences encoding SRP may be synthesized, in whole or in part,

using chemical methods well known in the art. (See, e.g., Caruthers, M.H. et al. (1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:215-223; and Horn, T. et al. (1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:225-232.) Alternatively, SRP itself or a fragment thereof may be synthesized using chemical methods. For example, peptide synthesis can be performed using various solution-phase or solid-phase techniques. (See, e.g., Creighton, T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York NY, pp. 55-60; and Roberge, J.Y. et al. (1995) Science 269:202-204.) Automated synthesis may be achieved using the ABI 431A peptide synthesizer (Applied Biosystems). Additionally, the amino acid sequence of SRP, or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined with sequences from other proteins, or any part thereof, to produce a variant polypeptide or a polypeptide having a sequence of a naturally occurring polypeptide.

The peptide may be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography. (See, e.g., Chiez, R.M. and F.Z. Regnier (1990) Methods Enzymol. 182:392-421.) The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or by sequencing. (See, e.g., Creighton, supra, pp. 28-53.)

In order to express a biologically active SRP, the nucleotide sequences encoding SRP or derivatives thereof may be inserted into an appropriate expression vector, i.e., a vector which contains the necessary elements for transcriptional and translational control of the inserted coding sequence in a suitable host. These elements include regulatory sequences, such as enhancers, constitutive and inducible promoters, and 5' and 3' untranslated regions in the vector and in polynucleotide sequences encoding SRP. Such elements may vary in their strength and specificity. Specific initiation signals may also be used to achieve more efficient translation of sequences encoding SRP. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences, e.g. the Kozak sequence. In cases where sequences encoding SRP and its initiation codon and upstream regulatory sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding sequence, or a fragment thereof, is inserted, exogenous translational control signals including an in-frame ATG initiation codon should be provided by the vector. Exogenous translational elements and initiation codons may be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of enhancers appropriate for the particular host cell system used. (See, e.g., Scharf, D. et al. (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162.)

Methods which are well known to those skilled in the art may be used to construct expression vectors containing sequences encoding SRP and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include in vitro recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and in vivo genetic recombination. (See, e.g., Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, ch. 4, 8, and 16-17; Ausubel, F.M. et al. (1995)

Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, ch. 9, 13, and 16.)

A variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express sequences encoding SRP. These include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors; insect cell systems infected with viral expression vectors (e.g., baculovirus); plant cell systems transformed with viral expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV, or tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (e.g., Ti or pBR322 plasmids); or animal cell systems. (See, e.g., Sambrook, supra; Ausubel, supra; Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509; Engelhard, E.K. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. et al. (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945; Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6:307-311; The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York NY, pp. 191-196; Logan, J. and T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659; and Harrington, J.J. et al. (1997) Nat. Genet. 15:345-355.) Expression vectors derived from retroviruses, adenoviruses, or herpes or vaccinia viruses, or from various bacterial plasmids, may be used for delivery of nucleotide sequences to the targeted organ, tissue, or cell population. (See, e.g., Di Nicola, M. et al. (1998) Cancer Gen. Ther. 5(6):350-356; Yu, M. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(13):6340-6344; Buller, R.M. et al. (1985) Nature 317(6040):813-815; McGregor, D.P. et al. (1994) Mol. Immunol. 31(3):219-226; and Verma, I.M. and N. Somia (1997) Nature 389:239-242.) The invention is not limited by the host cell employed.

In bacterial systems, a number of cloning and expression vectors may be selected depending upon the use intended for polynucleotide sequences encoding SRP. For example, routine cloning, subcloning, and propagation of polynucleotide sequences encoding SRP can be achieved using a multifunctional E. coli vector such as PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) or PSPORT1 plasmid (Life Technologies). Ligation of sequences encoding SRP into the vector's multiple cloning site disrupts the *lacZ* gene, allowing a colorimetric screening procedure for identification of transformed bacteria containing recombinant molecules. In addition, these vectors may be useful for in vitro transcription, dideoxy sequencing, single strand rescue with helper phage, and creation of nested deletions in the cloned sequence. (See, e.g., Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509.) When large quantities of SRP are needed, e.g. for the production of antibodies, vectors which direct high level expression of SRP may be used. For example, vectors containing the strong, inducible SP6 or T7 bacteriophage promoter may be used.

Yeast expression systems may be used for production of SRP. A number of vectors containing constitutive or inducible promoters, such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH promoters, may be used in the yeast Saccharomyces cerevisiae or Pichia pastoris. In addition, such vectors direct either the secretion or intracellular retention of expressed proteins and enable

integration of foreign sequences into the host genome for stable propagation. (See, e.g., Ansubel, 1995, supra; Bitter, G.A. et al. (1987) Methods Enzymol. 153:516-544; and Scorer, C.A. et al. (1994) Bio/Technology 12:181-184.)

Plant systems may also be used for expression of SRP. Transcription of sequences encoding SRP may be driven by viral promoters, e.g., the 35S and 19S promoters of CaMV used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6:307-311). Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters may be used. (See, e.g., Coruzzi, G. et al. (1984) EMBO J. 3:1671-1680; Broglie, R. et al. (1984) Science 224:838-843; and Winter, J. et al. (1991) Results Probl. Cell Differ. 17:85-105.) These constructs can be introduced into plant cells by direct DNA transformation or pathogen-mediated transfection. (See, e.g., The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York NY, pp. 191-196.)

In mammalian cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding SRP may be ligated into an adenovirus transcription/translation complex consisting of the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome may be used to obtain infective virus which expresses SRP in host cells. (See, e.g., Logan, J. and T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659.) In addition, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, may be used to increase expression in mammalian host cells. SV40 or EBV-based vectors may also be used for high-level protein expression.

Human artificial chromosomes (HACs) may also be employed to deliver larger fragments of DNA than can be contained in and expressed from a plasmid. HACs of about 6 kb to 10 Mb are constructed and delivered via conventional delivery methods (liposomes, polycationic amino polymers, or vesicles) for therapeutic purposes. (See, e.g., Harrington, J.J. et al. (1997) Nat. Genet. 15:345-355.)

For long term production of recombinant proteins in mammalian systems, stable expression of SRP in cell lines is preferred. For example, sequences encoding SRP can be transformed into cell lines using expression vectors which may contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. Following the introduction of the vector, cells may be allowed to grow for about 1 to 2 days in enriched media before being switched to selective media. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to a selective agent, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced sequences. Resistant clones of stably transformed cells may be propagated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

Any number of selection systems may be used to recover transformed cell lines. These

include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase and adenine phosphoribosyltransferase genes, for use in *tk*⁻ and *apr*⁻ cells, respectively. (See, e.g., Wigler, M. et al. (1977) Cell 11:223-232; Lowy, I. et al. (1980) Cell 22:817-823.) Also, antimetabolite, antibiotic, or herbicide resistance can be used as the basis for selection. For example, *dhfr* confers resistance to methotrexate; *neo* confers resistance to the aminoglycosides neomycin and G-418; and *als* and *pat* confer resistance to chlorsulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively. (See, e.g., Wigler, M. et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F. et al. (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14.) Additional selectable genes have been described, e.g., *trpB* and *hisD*, which alter cellular requirements for metabolites. (See, e.g., Hartman, S.C. and R.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-8051.) Visible markers, e.g., anthocyanins, green fluorescent proteins (GFP; Clontech), β glucuronidase and its substrate β-glucuronide, or luciferase and its substrate luciferin may be used. These markers can be used not only to identify transformants, but also to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system. (See, e.g., Rhodes, C.A. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131.)

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, the presence and expression of the gene may need to be confirmed. For example, if the sequence encoding SRP is inserted within a marker gene sequence, transformed cells containing sequences encoding SRP can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding SRP under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the tandem gene as well.

In general, host cells that contain the nucleic acid sequence encoding SRP and that express SRP may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations, PCR amplification, and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane, solution, or chip based technologies for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein sequences.

Immunological methods for detecting and measuring the expression of SRP using either specific polyclonal or monoclonal antibodies are known in the art. Examples of such techniques include enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), radioimmunoassays (RIAs), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on SRP is preferred, but a competitive binding assay may be employed. These and other assays are well known in the art. (See, e.g., Hampton, R. et al. (1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St. Paul MN, Sect. IV; Coligan, J.E. et al. (1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY; and Pound, J.D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press,

Totowa NJ.)

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and may be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding SRP include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequences encoding SRP, or any fragments thereof, may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes in vitro by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3, or SP6 and labeled nucleotides. These procedures may be conducted using a variety of commercially available kits, such as those provided by Amersham Pharmacia Biotech, Promega (Madison WI), and US Biochemical. Suitable reporter molecules or labels which may be used for ease of detection include radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

Host cells transformed with nucleotide sequences encoding SRP may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The protein produced by a transformed cell may be secreted or retained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides which encode SRP may be designed to contain signal sequences which direct secretion of SRP through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

In addition, a host cell strain may be chosen for its ability to modulate expression of the inserted sequences or to process the expressed protein in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" or "pro" form of the protein may also be used to specify protein targeting, folding, and/or activity. Different host cells which have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for post-translational activities (e.g., CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and WI38) are available from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas VA) and may be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

In another embodiment of the invention, natural, modified, or recombinant nucleic acid sequences encoding SRP may be ligated to a heterologous sequence resulting in translation of a fusion protein in any of the aforementioned host systems. For example, a chimeric SRP protein containing a heterologous moiety that can be recognized by a commercially available antibody may facilitate the screening of peptide libraries for inhibitors of SRP activity. Heterologous protein and peptide moieties may also facilitate purification of fusion proteins using commercially available affinity matrices. Such moieties include, but are not limited to, glutathione S-transferase (GST),

maltose binding protein (MBP), thioredoxin (Trx), calmodulin binding peptide (CBP), 6-His, FLAG, *c-myc*, and hemagglutinin (HA). GST, MBP, Trx, CBP, and 6-His enable purification of their cognate fusion proteins on immobilized glutathione, maltose, phenylarsine oxide, calmodulin, and metal-chelate resins, respectively. FLAG, *c-myc*, and hemagglutinin (HA) enable immunoaffinity purification of fusion proteins using commercially available monoclonal and polyclonal antibodies that specifically recognize these epitope tags. A fusion protein may also be engineered to contain a proteolytic cleavage site located between the SRP encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that SRP may be cleaved away from the heterologous moiety following purification. Methods for fusion protein expression and purification are discussed in Ausubel (1995, supra, ch. 10). A variety of commercially available kits may also be used to facilitate expression and purification of fusion proteins.

In a further embodiment of the invention, synthesis of radiolabeled SRP may be achieved in vitro using the TNT rabbit reticulocyte lysate or wheat germ extract system (Promega). These systems couple transcription and translation of protein-coding sequences operably associated with the T7, T3, or SP6 promoters. Translation takes place in the presence of a radiolabeled amino acid precursor, for example, ^{35}S-methionine.

SRP of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds that specifically bind to SRP. At least one and up to a plurality of test compounds may be screened for specific binding to SRP. Examples of test compounds include antibodies, oligonucleotides, proteins (e.g., receptors), or small molecules.

In one embodiment, the compound thus identified is closely related to the natural ligand of SRP, e.g., a ligand or fragment thereof, a natural substrate, a structural or functional mimetic, or a natural binding partner. (See, e.g., Coligan, J.E. et al. (1991) Current Protocols in Immunology 1(2): Chapter 5.) Similarly, the compound can be closely related to the natural receptor to which SRP binds, or to at least a fragment of the receptor, e.g., the ligand binding site. In either case, the compound can be rationally designed using known techniques. In one embodiment, screening for these compounds involves producing appropriate cells which express SRP, either as a secreted protein or on the cell membrane. Preferred cells include cells from mammals, yeast, Drosophila, or E. coli. Cells expressing SRP or cell membrane fractions which contain SRP are then contacted with a test compound and binding, stimulation, or inhibition of activity of either SRP or the compound is analyzed.

An assay may simply test binding of a test compound to the polypeptide, wherein binding is detected by a fluorophore, radioisotope, enzyme conjugate, or other detectable label. For example, the assay may comprise the steps of combining at least one test compound with SRP, either in solution or affixed to a solid support, and detecting the binding of SRP to the compound.

Alternatively, the assay may detect or measure binding of a test compound in the presence of a labeled competitor. Additionally, the assay may be carried out using cell-free preparations, chemical libraries, or natural product mixtures, and the test compound(s) may be free in solution or affixed to a solid support.

SRP of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds that modulate the activity of SRP. Such compounds may include agonists, antagonists, or partial or inverse agonists. In one embodiment, an assay is performed under conditions permissive for SRP activity, wherein SRP is combined with at least one test compound, and the activity of SRP in the presence of a test compound is compared with the activity of SRP in the absence of the test compound. A change in the activity of SRP in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of SRP. Alternatively, a test compound is combined with an in vitro or cell-free system comprising SRP under conditions suitable for SRP activity, and the assay is performed. In either of these assays, a test compound which modulates the activity of SRP may do so indirectly and need not come in direct contact with the test compound. At least one and up to a plurality of test compounds may be screened.

In another embodiment, polynucleotides encoding SRP or their mammalian homologs may be "knocked out" in an animal model system using homologous recombination in embryonic stem (ES) cells. Such techniques are well known in the art and are useful for the generation of animal models of human disease. (See, e.g., U.S. Patent Number 5,175,383 and U.S. Patent Number 5,767,337.) For example, mouse ES cells, such as the mouse 129/SvJ cell line, are derived from the early mouse embryo and grown in culture. The ES cells are transformed with a vector containing the gene of interest disrupted by a marker gene, e.g., the neomycin phosphotransferase gene (neo; Capecchi, M.R. (1989) Science 244:1288-1292). The vector integrates into the corresponding region of the host genome by homologous recombination. Alternatively, homologous recombination takes place using the Cre-loxP system to knockout a gene of interest in a tissue- or developmental stage-specific manner (Marth, J.D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002; Wagner, K.U. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:4323-4330). Transformed ES cells are identified and microinjected into mouse cell blastocysts such as those from the C57BL/6 mouse strain. The blastocysts are surgically transferred to pseudopregnant dams, and the resulting chimeric progeny are genotyped and bred to produce heterozygous or homozygous strains. Transgenic animals thus generated may be tested with potential therapeutic or toxic agents.

Polynucleotides encoding SRP may also be manipulated in vitro in ES cells derived from human blastocysts. Human ES cells have the potential to differentiate into at least eight separate cell lineages including endoderm, mesoderm, and ectodermal cell types. These cell lineages differentiate into, for example, neural cells, hematopoietic lineages, and cardiomyocytes (Thomson, J.A. et al.

(1998) Science 282:1145-1147).

Polynucleotides encoding SRP can also be used to create "knockin" humanized animals (pigs) or transgenic animals (mice or rats) to model human disease. With knockin technology, a region of a polynucleotide encoding SRP is injected into animal ES cells, and the injected sequence integrates into the animal cell genome. Transformed cells are injected into blastulae, and the blastulae are implanted as described above. Transgenic progeny or inbred lines are studied and treated with potential pharmaceutical agents to obtain information on treatment of a human disease. Alternatively, a mammal inbred to overexpress SRP, e.g., by secreting SRP in its milk, may also serve as a convenient source of that protein (Janne, J. et al. (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4:55-74).

THERAPEUTICS

Chemical and structural similarity, e.g., in the context of sequences and motifs, exists between regions of SRP and secreted redox proteins. In addition, the expression of SRP is closely associated with diseased tissues. Therefore, SRP appears to play a role in cell proliferative, neurological, and metabolic disorders. In the treatment of disorders associated with increased SRP expression or activity, it is desirable to decrease the expression or activity of SRP. In the treatment of disorders associated with decreased SRP expression or activity, it is desirable to increase the expression or activity of SRP.

Therefore, in one embodiment, SRP or a fragment or derivative thereof may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with decreased expression or activity of SRP. Examples of such disorders include, but are not limited to, a cell proliferative disorder such as actinic keratosis, arteriosclerosis, atherosclerosis, bursitis, cirrhosis, hepatitis, mixed connective tissue disease (MCTD), myelofibrosis, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, polycythemia vera, psoriasis, primary thrombocythemia, and cancers including adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, melanoma, myeloma, sarcoma, teratocarcinoma, and, in particular, cancers of the adrenal gland, bladder, bone, bone marrow, brain, breast, cervix, gall bladder, ganglia, gastrointestinal tract, heart, kidney, liver, lung, muscle, ovary, pancreas, parathyroid, penis, prostate, salivary glands, skin, spleen, testis, thymus, thyroid, and uterus; a neurological disorder such as epilepsy, ischemic cerebrovascular disease, stroke, cerebral neoplasms, Alzheimer's disease, Pick's disease, Huntington's disease, dementia, Parkinson's disease and other extrapyramidal disorders, amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders, progressive neural muscular atrophy, retinitis pigmentosa, hereditary ataxias, multiple sclerosis and other demyelinating diseases, bacterial and viral meningitis, brain abscess, subdural empyema, epidural abscess, suppurative intracranial thrombophlebitis, myelitis and radiculitis, viral central nervous system disease; prion diseases including kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome; fatal familial insomnia, nutritional and metabolic diseases of the nervous system, neurofibromatosis, tuberous sclerosis, cerebelloretinal

hemangioblastomatosis, encephalotrigeminal syndrome, mental retardation and other developmental disorders of the central nervous system, cerebral palsy, neuroskeletal disorders, autonomic nervous system disorders, cranial nerve disorders, spinal cord diseases, muscular dystrophy and other neuromuscular disorders, peripheral nervous system disorders, dermatomyositis and polymyositis; inherited, metabolic, endocrine, and toxic myopathies; myasthenia gravis, periodic paralysis; mental disorders including mood, anxiety, and schizophrenic disorders; seasonal affective disorder (SAD); akathesia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, Tourette's disorder, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and familial frontotemporal dementia; a genetic disorder such as adrenoleukodystrophy, Alport's syndrome, choroideremia, Duchenne and Becker muscular dystrophy, Down's syndrome, cystic fibrosis, chronic granulomatous disease, Gaucher's disease, Huntington's chorea, Marfan's syndrome, muscular dystrophy, myotonic dystrophy, pycnodysostosis, Refsum's syndrome, retinoblastoma, sickle cell anemia, thalassemia, Werner syndrome, von Willebrand's disease, Wilms' tumor, Zellweger syndrome, peroxisomal acyl-CoA oxidase deficiency, peroxisomal thiolase deficiency, peroxisomal bifunctional protein deficiency, mitochondrial carnitine palmitoyl transferase and carnitine deficiency, mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, mitochondrial medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, mitochondrial short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, mitochondrial electron transport flavoprotein and electron transport flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase deficiency, mitochondrial trifunctional protein deficiency, and mitochondrial short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency; and a smooth muscle disorder such as angina, anaphylactic shock, arrhythmias, asthma, cardiovascular shock, Cushing's syndrome, hypertension, hypoglycemia, myocardial infarction, migraine, and pheochromocytoma, and myopathies including cardiomyopathy, encephalopathy, epilepsy, Kearns-Sayre syndrome, lactic acidosis, myoclonic disorder, and ophthalmoplegia, and other metabolic disorders, such as hyperammonemia, trimethylaminuria (fish-odor syndrome), 3-hydroxydicarboxylic aciduria, dicarboxylic aciduria, xanthinuria, congenital lipoid adrenal hyperplasia (CLAH), albinism type III, hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome (HHS), glutaric acidemia type I (GA-I), familial recurrent myoglobinuria, insulin resistance, hereditary thymine-uraciluria (familial pyrimidinemia), idiopathic sidereoblastic anemia (AISA), neonatal adrenoleukodystrophy, hypoxia, increased damage to tissues caused by trauma, radiation and ultraviolet exposure, liver dysfunction, marked obesity, methemoglobinemia (HM1, HM2, and HM3), hypertrophic hirsutism with amenorrhea, and Hermansky-Pudlack syndrome.

In another embodiment, a vector capable of expressing SRP or a fragment or derivative thereof may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with decreased

expression or activity of SRP including, but not limited to, those described above.

In a further embodiment, a composition comprising a substantially purified SRP in conjunction with a suitable pharmaceutical carrier may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with decreased expression or activity of SRP including, but not limited to, those provided above.

In still another embodiment, an agonist which modulates the activity of SRP may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with decreased expression or activity of SRP including, but not limited to, those listed above.

In a further embodiment, an antagonist of SRP may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with increased expression or activity of SRP. Examples of such disorders include, but are not limited to, those cell proliferative, neurological, and metabolic disorders described above. In one aspect, an antibody which specifically binds SRP may be used directly as an antagonist or indirectly as a targeting or delivery mechanism for bringing a pharmaceutical agent to cells or tissues which express SRP.

In an additional embodiment, a vector expressing the complement of the polynucleotide encoding SRP may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with increased expression or activity of SRP including, but not limited to, those described above.

In other embodiments, any of the proteins, antagonists, antibodies, agonists, complementary sequences, or vectors of the invention may be administered in combination with other appropriate therapeutic agents. Selection of the appropriate agents for use in combination therapy may be made by one of ordinary skill in the art, according to conventional pharmaceutical principles. The combination of therapeutic agents may act synergistically to effect the treatment or prevention of the various disorders described above. Using this approach, one may be able to achieve therapeutic efficacy with lower dosages of each agent, thus reducing the potential for adverse side effects.

An antagonist of SRP may be produced using methods which are generally known in the art. In particular, purified SRP may be used to produce antibodies or to screen libraries of pharmaceutical agents to identify those which specifically bind SRP. Antibodies to SRP may also be generated using methods that are well known in the art. Such antibodies may include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, and single chain antibodies, Fab fragments, and fragments produced by a Fab expression library. Neutralizing antibodies (i.e., those which inhibit dimer formation) are generally preferred for therapeutic use.

For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice, humans, and others may be immunized by injection with SRP or with any fragment or oligopeptide thereof which has immunogenic properties. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral

gels such as aluminum hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, KLH, and dinitrophenol. Among adjuvants used in humans, BCG (bacilli Calmette-Guerin) and Corynebacterium parvum are especially preferable.

It is preferred that the oligopeptides, peptides, or fragments used to induce antibodies to SRP have an amino acid sequence consisting of at least about 5 amino acids, and generally will consist of at least about 10 amino acids. It is also preferable that these oligopeptides, peptides, or fragments are identical to a portion of the amino acid sequence of the natural protein. Short stretches of SRP amino acids may be fused with those of another protein, such as KLH, and antibodies to the chimeric molecule may be produced.

Monoclonal antibodies to SRP may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique. (See, e.g., Kohler, G. et al. (1975) Nature 256:495-497; Kozbor, D. et al. (1985) J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote, R.J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; and Cole, S.P. et al. (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120.)

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," such as the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity, can be used. (See, e.g., Morrison, S.L. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Neuberger, M.S. et al. (1984) Nature 312:604-608; and Takeda, S. et al. (1985) Nature 314:452-454.) Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies may be adapted, using methods known in the art, to produce SRP-specific single chain antibodies. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, may be generated by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries. (See, e.g., Burton, D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137.)

Antibodies may also be produced by inducing in vivo production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature. (See, e.g., Orlandi, R. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837; Winter, G. et al. (1991) Nature 349:293-299.)

Antibody fragments which contain specific binding sites for SRP may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, $F(ab')_2$ fragments produced by pepsin digestion of the antibody molecule and Fab fragments generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')2 fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity. (See, e.g., Huse, W.D. et al. (1989) Science 246:1275-1281.)

Various immunoassays may be used for screening to identify antibodies having the desired

specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or monoclonal antibodies with established specificities are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between SRP and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering SRP epitopes is generally used, but a competitive binding assay may also be employed (Pound, supra).

Various methods such as Scatchard analysis in conjunction with radioimmunoassay techniques may be used to assess the affinity of antibodies for SRP. Affinity is expressed as an association constant, K_a, which is defined as the molar concentration of SRP-antibody complex divided by the molar concentrations of free antigen and free antibody under equilibrium conditions. The K_a determined for a preparation of polyclonal antibodies, which are heterogeneous in their affinities for multiple SRP epitopes, represents the average affinity, or avidity, of the antibodies for SRP. The K_a determined for a preparation of monoclonal antibodies, which are monospecific for a particular SRP epitope, represents a true measure of affinity. High-affinity antibody preparations with K_a ranging from about 10^9 to 10^{12} L/mole are preferred for use in immunoassays in which the SRP-antibody complex must withstand rigorous manipulations. Low-affinity antibody preparations with K_a ranging from about 10^6 to 10^7 L/mole are preferred for use in immunopurification and similar procedures which ultimately require dissociation of SRP, preferably in active form, from the antibody (Catty, D. (1988) Antibodies, Volume I: A Practical Approach. IRL Press, Washington DC; Liddell, J.E. and A. Cryer (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies. John Wiley & Sons, New York NY).

The titer and avidity of polyclonal antibody preparations may be further evaluated to determine the quality and suitability of such preparations for certain downstream applications. For example, a polyclonal antibody preparation containing at least 1-2 mg specific antibody/ml, preferably 5-10 mg specific antibody/ml, is generally employed in procedures requiring precipitation of SRP-antibody complexes. Procedures for evaluating antibody specificity, titer, and avidity, and guidelines for antibody quality and usage in various applications, are generally available. (See, e.g., Catty, supra, and Coligan et al. supra.)

In another embodiment of the invention, the polynucleotides encoding SRP, or any fragment or complement thereof, may be used for therapeutic purposes. In one aspect, modifications of gene expression can be achieved by designing complementary sequences or antisense molecules (DNA, RNA, PNA, or modified oligonucleotides) to the coding or regulatory regions of the gene encoding SRP. Such technology is well known in the art, and antisense oligonucleotides or larger fragments can be designed from various locations along the coding or control regions of sequences encoding SRP. (See, e.g., Agrawal, S., ed. (1996) Antisense Therapeutics. Humana Press Inc., Totawa NJ.)

In therapeutic use, any gene delivery system suitable for introduction of the antisense sequences into appropriate target cells can be used. Antisense sequences can be delivered intracellularly in the form of an expression plasmid which, upon transcription, produces a sequence complementary to at least a portion of the cellular sequence encoding the target protein. (See, e.g., Slater, J.E. et al. (1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102(3):469-475; and Scanlon, K.J. et al. (1995) 9(13):1288-1296.) Antisense sequences can also be introduced intracellularly through the use of viral vectors, such as retrovirus and adeno-associated virus vectors. (See, e.g., Miller, A.D. (1990) Blood 76:271; Ausubel, supra; Uckert, W. and W. Walther (1994) Pharmacol. Ther. 63(3):323-347.) Other gene delivery mechanisms include liposome-derived systems, artificial viral envelopes, and other systems known in the art. (See, e.g., Rossi, J.J. (1995) Br. Med. Bull. 51(1):217-225; Boado, R.J. et al. (1998) J. Pharm. Sci. 87(11):1308-1315; and Morris, M.C. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25(14):2730-2736.)

In another embodiment of the invention, polynucleotides encoding SRP may be used for somatic or germline gene therapy. Gene therapy may be performed to (i) correct a genetic deficiency (e.g., in the cases of severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease characterized by X-linked inheritance (Cavazzana-Calvo, M. et al. (2000) Science 288:669-672), severe combined immunodeficiency syndrome associated with an inherited adenosine deaminase (ADA) deficiency (Blaese, R.M. et al. (1995) Science 270:475-480; Bordignon, C. et al. (1995) Science 270:470-475), cystic fibrosis (Zabner, J. et al. (1993) Cell 75:207-216; Crystal, R.G. et al. (1995) Hum. Gene Therapy 6:643-666; Crystal, R.G. et al. (1995) Hum. Gene Therapy 6:667-703), thalassamias, familial hypercholesterolemia, and hemophilia resulting from Factor VIII or Factor IX deficiencies (Crystal, R.G. (1995) Science 270:404-410; Verma, I.M. and N. Somia (1997) Nature 389:239-242)), (ii) express a conditionally lethal gene product (e.g., in the case of cancers which result from unregulated cell proliferation), or (iii) express a protein which affords protection against intracellular parasites (e.g., against human retroviruses, such as human immunodeficiency virus (HIV) (Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396; Poeschla, E. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:11395-11399), hepatitis B or C virus (HBV, HCV); fungal parasites, such as Candida albicans and Paracoccidioides brasiliensis; and protozoan parasites such as Plasmodium falciparum and Trypanosoma cruzi). In the case where a genetic deficiency in SRP expression or regulation causes disease, the expression of SRP from an appropriate population of transduced cells may alleviate the clinical manifestations caused by the genetic deficiency.

In a further embodiment of the invention, diseases or disorders caused by deficiencies in SRP are treated by constructing mammalian expression vectors encoding SRP and introducing these vectors by mechanical means into SRP-deficient cells. Mechanical transfer technologies for use with cells in vivo or ex vitro include (i) direct DNA microinjection into individual cells, (ii) ballistic gold

particle delivery, (iii) liposome-mediated transfection, (iv) receptor-mediated gene transfer, and (v) the use of DNA transposons (Morgan, R.A. and W.F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217; Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J-L. and H. Récipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450).

Expression vectors that may be effective for the expression of SRP include, but are not limited to, the PCDNA 3.1, EPITAG, PRCCMV2, PREP, PVAX vectors (Invitrogen, Carlsbad CA), PCMV-SCRIPT, PCMV-TAG, PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA), and PTET-OFF, PTET-ON, PTRE2, PTRE2-LUC, PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA). SRP may be expressed using (i) a constitutively active promoter, (e.g., from cytomegalovirus (CMV), Rous sarcoma virus (RSV), SV40 virus, thymidine kinase (TK), or β-actin genes), (ii) an inducible promoter (e.g., the tetracycline-regulated promoter (Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551; Gossen, M. et al. (1995) Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456), commercially available in the T-REX plasmid (Invitrogen)); the ecdysone-inducible promoter (available in the plasmids PVGRXR and PIND; Invitrogen); the FK506/rapamycin inducible promoter; or the RU486/mifepristone inducible promoter (Rossi, F.M.V. and Blau, H.M. supra)), or (iii) a tissue-specific promoter or the native promoter of the endogenous gene encoding SRP from a normal individual.

Commercially available liposome transformation kits (e.g., the PERFECT LIPID TRANSFECTION KIT, available from Invitrogen) allow one with ordinary skill in the art to deliver polynucleotides to target cells in culture and require minimal effort to optimize experimental parameters. In the alternative, transformation is performed using the calcium phosphate method (Graham, F.L. and A.J. Eb (1973) Virology 52:456-467), or by electroporation (Neumann, E. et al. (1982) EMBO J. 1:841-845). The introduction of DNA to primary cells requires modification of these standardized mammalian transfection protocols.

In another embodiment of the invention, diseases or disorders caused by genetic defects with respect to SRP expression are treated by constructing a retrovirus vector consisting of (i) the polynucleotide encoding SRP under the control of an independent promoter or the retrovirus long terminal repeat (LTR) promoter, (ii) appropriate RNA packaging signals, and (iii) a Rev-responsive element (RRE) along with additional retrovirus *cis*-acting RNA sequences and coding sequences required for efficient vector propagation. Retrovirus vectors (e.g., PFB and PFBNEO) are commercially available (Stratagene) and are based on published data (Riviere, I. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6733-6737), incorporated by reference herein. The vector is propagated in an appropriate vector producing cell line (VPCL) that expresses an envelope gene with a tropism for receptors on the target cells or a promiscuous envelope protein such as VSVg (Armentano, D. et al. (1987) J. Virol. 61:1647-1650; Bender, M.A. et al. (1987) J. Virol. 61:1639-1646; Adam, M.A. and

A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806; Dull, T. et al. (1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zufferey, R. et al. (1998) J. Virol. 72:9873-9880). U.S. Patent Number 5,910,434 to Rigg ("Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant") discloses a method for obtaining retrovirus packaging cell lines and is hereby incorporated by reference. Propagation of retrovirus vectors, transduction of a population of cells (e.g., CD4+ T-cells), and the return of transduced cells to a patient are procedures well known to persons skilled in the art of gene therapy and have been well documented (Ranga, U. et al. (1997) J. Virol. 71:7020-7029; Bauer, G. et al. (1997) Blood 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716; Ranga, U. et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1201-1206; Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290).

In the alternative, an adenovirus-based gene therapy delivery system is used to deliver polynucleotides encoding SRP to cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of SRP. The construction and packaging of adenovirus-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. Replication defective adenovirus vectors have proven to be versatile for importing genes encoding immunoregulatory proteins into intact islets in the pancreas (Csete, M.E. et al. (1995) Transplantation 27:263-268). Potentially useful adenoviral vectors are described in U.S. Patent Number 5,707,618 to Armentano ("Adenovirus vectors for gene therapy"), hereby incorporated by reference. For adenoviral vectors, see also Antinozzi, P.A. et al. (1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544 and Verma, I.M. and N. Somia (1997) Nature 18:389:239-242, both incorporated by reference herein.

In another alternative, a herpes-based, gene therapy delivery system is used to deliver polynucleotides encoding SRP to target cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of SRP. The use of herpes simplex virus (HSV)-based vectors may be especially valuable for introducing SRP to cells of the central nervous system, for which HSV has a tropism. The construction and packaging of herpes-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. A replication-competent herpes simplex virus (HSV) type 1-based vector has been used to deliver a reporter gene to the eyes of primates (Liu, X. et al. (1999) Exp. Eye Res. 169:385-395). The construction of a HSV-1 virus vector has also been disclosed in detail in U.S. Patent Number 5,804,413 to DeLuca ("Herpes simplex virus strains for gene transfer"), which is hereby incorporated by reference. U.S. Patent Number 5,804,413 teaches the use of recombinant HSV d92 which consists of a genome containing at least one exogenous gene to be transferred to a cell under the control of the appropriate promoter for purposes including human gene therapy. Also taught by this patent are the construction and use of recombinant HSV strains deleted for ICP4, ICP27 and ICP22. For HSV vectors, see also Goins, W.F. et al. (1999) J. Virol. 73:519-532 and Xu, H. et al. (1994) Dev. Biol. 163:152-161, hereby incorporated by reference. The manipulation of cloned

herpesvirus sequences, the generation of recombinant virus following the transfection of multiple plasmids containing different segments of the large herpesvirus genomes, the growth and propagation of herpesvirus, and the infection of cells with herpesvirus are techniques well known to those of ordinary skill in the art.

In another alternative, an alphavirus (positive, single-stranded RNA virus) vector is used to deliver polynucleotides encoding SRP to target cells. The biology of the prototypic alphavirus, Semliki Forest Virus (SFV), has been studied extensively and gene transfer vectors have been based on the SFV genome (Garoff, H. and K.-J. Li (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:464-469). During alphavirus RNA replication, a subgenomic RNA is generated that normally encodes the viral capsid proteins. This subgenomic RNA replicates to higher levels than the full length genomic RNA, resulting in the overproduction of capsid proteins relative to the viral proteins with enzymatic activity (e.g., protease and polymerase). Similarly, inserting the coding sequence for SRP into the alphavirus genome in place of the capsid-coding region results in the production of a large number of SRP-coding RNAs and the synthesis of high levels of SRP in vector transduced cells. While alphavirus infection is typically associated with cell lysis within a few days, the ability to establish a persistent infection in hamster normal kidney cells (BHK-21) with a variant of Sindbis virus (SIN) indicates that the lytic replication of alphaviruses can be altered to suit the needs of the gene therapy application (Dryga, S.A. et al. (1997) Virology 228:74-83). The wide host range of alphaviruses will allow the introduction of SRP into a variety of cell types. The specific transduction of a subset of cells in a population may require the sorting of cells prior to transduction. The methods of manipulating infectious cDNA clones of alphaviruses, performing alphavirus cDNA and RNA transfections, and performing alphavirus infections, are well known to those with ordinary skill in the art.

Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, e.g., between about positions -10 and +10 from the start site, may also be employed to inhibit gene expression. Similarly, inhibition can be achieved using triple helix base-pairing methodology. Triple helix pairing is useful because it causes inhibition of the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or regulatory molecules. Recent therapeutic advances using triplex DNA have been described in the literature. (See, e.g., Gee, J.E. et al. (1994) in Huber, B.E. and B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing, Mt. Kisco NY, pp. 163-177.) A complementary sequence or antisense molecule may also be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes.

Ribozymes, enzymatic RNA molecules, may also be used to catalyze the specific cleavage of RNA. The mechanism of ribozyme action involves sequence-specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. For example, engineered hammerhead motif ribozyme molecules may specifically and efficiently catalyze

endonucleolytic cleavage of sequences encoding SRP.

Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites, including the following sequences: GUA, GUU, and GUC. Once identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides, corresponding to the region of the target gene containing the cleavage site, may be evaluated for secondary structural features which may render the oligonucleotide inoperable. The suitability of candidate targets may also be evaluated by testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays.

Complementary ribonucleic acid molecules and ribozymes of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of nucleic acid molecules. These include techniques for chemically synthesizing oligonucleotides such as solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by in vitro and in vivo transcription of DNA sequences encoding SRP. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors with suitable RNA polymerase promoters such as T7 or SP6. Alternatively, these cDNA constructs that synthesize complementary RNA, constitutively or inducibly, can be introduced into cell lines, cells, or tissues.

RNA molecules may be modified to increase intracellular stability and half-life. Possible modifications include, but are not limited to, the addition of flanking sequences at the 5' and/or 3' ends of the molecule, or the use of phosphorothioate or 2' O-methyl rather than phosphodiesterase linkages within the backbone of the molecule. This concept is inherent in the production of PNAs and can be extended in all of these molecules by the inclusion of nontraditional bases such as inosine, queosine, and wybutosine, as well as acetyl-, methyl-, thio-, and similarly modified forms of adenine, cytidine, guanine, thymine, and uridine which are not as easily recognized by endogenous endonucleases.

An additional embodiment of the invention encompasses a method for screening for a compound which is effective in altering expression of a polynucleotide encoding SRP. Compounds which may be effective in altering expression of a specific polynucleotide may include, but are not limited to, oligonucleotides, antisense oligonucleotides, triple helix-forming oligonucleotides, transcription factors and other polypeptide transcriptional regulators, and non-macromolecular chemical entities which are capable of interacting with specific polynucleotide sequences. Effective compounds may alter polynucleotide expression by acting as either inhibitors or promoters of polynucleotide expression. Thus, in the treatment of disorders associated with increased SRP expression or activity, a compound which specifically inhibits expression of the polynucleotide encoding SRP may be therapeutically useful, and in the treatment of disorders associated with decreased SRP expression or activity, a compound which specifically promotes expression of the

polynucleotide encoding SRP may be therapeutically useful.

At least one, and up to a plurality, of test compounds may be screened for effectiveness in altering expression of a specific polynucleotide. A test compound may be obtained by any method commonly known in the art, including chemical modification of a compound known to be effective in altering polynucleotide expression; selection from an existing, commercially-available or proprietary library of naturally-occurring or non-natural chemical compounds; rational design of a compound based on chemical and/or structural properties of the target polynucleotide; and selection from a library of chemical compounds created combinatorially or randomly. A sample comprising a polynucleotide encoding SRP is exposed to at least one test compound thus obtained. The sample may comprise, for example, an intact or permeabilized cell, or an in vitro cell-free or reconstituted biochemical system. Alterations in the expression of a polynucleotide encoding SRP are assayed by any method commonly known in the art. Typically, the expression of a specific nucleotide is detected by hybridization with a probe having a nucleotide sequence complementary to the sequence of the polynucleotide encoding SRP. The amount of hybridization may be quantified, thus forming the basis for a comparison of the expression of the polynucleotide both with and without exposure to one or more test compounds. Detection of a change in the expression of a polynucleotide exposed to a test compound indicates that the test compound is effective in altering the expression of the polynucleotide. A screen for a compound effective in altering expression of a specific polynucleotide can be carried out, for example, using a Schizosaccharomyces pombe gene expression system (Atkins, D. et al. (1999) U.S. Patent No. 5,932,435; Arndt, G.M. et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28:E15) or a human cell line such as HeLa cell (Clarke, M.L. et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:8-13). A particular embodiment of the present invention involves screening a combinatorial library of oligonucleotides (such as deoxyribonucleotides, ribonucleotides, peptide nucleic acids, and modified oligonucleotides) for antisense activity against a specific polynucleotide sequence (Bruice, T.W. et al. (1997) U.S. Patent No. 5,686,242; Bruice, T.W. et al. (2000) U.S. Patent No. 6,022,691).

Many methods for introducing vectors into cells or tissues are available and equally suitable for use in vivo, in vitro, and ex vivo. For ex vivo therapy, vectors may be introduced into stem cells taken from the patient and clonally propagated for autologous transplant back into that same patient. Delivery by transfection, by liposome injections, or by polycationic amino polymers may be achieved using methods which are well known in the art. (See, e.g., Goldman, C.K. et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15:462-466.)

Any of the therapeutic methods described above may be applied to any subject in need of such therapy, including, for example, mammals such as humans, dogs, cats, cows, horses, rabbits, and monkeys.

An additional embodiment of the invention relates to the administration of a composition which generally comprises an active ingredient formulated with a pharmaceutically acceptable excipient. Excipients may include, for example, sugars, starches, celluloses, gums, and proteins. Various formulations are commonly known and are thoroughly discussed in the latest edition of Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing, Easton PA). Such compositions may consist of SRP, antibodies to SRP, and mimetics, agonists, antagonists, or inhibitors of SRP.

The compositions utilized in this invention may be administered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal, intraventricular, pulmonary, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, enteral, topical, sublingual, or rectal means.

Compositions for pulmonary administration may be prepared in liquid or dry powder form. These compositions are generally aerosolized immediately prior to inhalation by the patient. In the case of small molecules (e.g. traditional low molecular weight organic drugs), aerosol delivery of fast-acting formulations is well-known in the art. In the case of macromolecules (e.g. larger peptides and proteins), recent developments in the field of pulmonary delivery via the alveolar region of the lung have enabled the practical delivery of drugs such as insulin to blood circulation (see, e.g., Patton, J.S. et al., U.S. Patent No. 5,997,848). Pulmonary delivery has the advantage of administration without needle injection, and obviates the need for potentially toxic penetration enhancers.

Compositions suitable for use in the invention include compositions wherein the active ingredients are contained in an effective amount to achieve the intended purpose. The determination of an effective dose is well within the capability of those skilled in the art.

Specialized forms of compositions may be prepared for direct intracellular delivery of macromolecules comprising SRP or fragments thereof. For example, liposome preparations containing a cell-impermeable macromolecule may promote cell fusion and intracellular delivery of the macromolecule. Alternatively, SRP or a fragment thereof may be joined to a short cationic N-terminal portion from the HIV Tat-1 protein. Fusion proteins thus generated have been found to transduce into the cells of all tissues, including the brain, in a mouse model system (Schwarze, S.R. et al. (1999) Science 285:1569-1572).

For any compound, the therapeutically effective dose can be estimated initially either in cell culture assays, e.g., of neoplastic cells, or in animal models such as mice, rats, rabbits, dogs, monkeys, or pigs. An animal model may also be used to determine the appropriate concentration range and route of administration. Such information can then be used to determine useful doses and routes for administration in humans.

A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient, for example SRP or fragments thereof, antibodies of SRP, and agonists, antagonists or inhibitors of SRP, which

ameliorates the symptoms or condition. Therapeutic efficacy and toxicity may be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or with experimental animals, such as by calculating the ED_{50} (the dose therapeutically effective in 50% of the population) or LD_{50} (the dose lethal to 50% of the population) statistics. The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, which can be expressed as the LD_{50}/ED_{50} ratio. Compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies are used to formulate a range of dosage for human use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that includes the ED_{50} with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, the sensitivity of the patient, and the route of administration.

The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of factors related to the subject requiring treatment. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active moiety or to maintain the desired effect. Factors which may be taken into account include the severity of the disease state, the general health of the subject, the age, weight, and gender of the subject, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and response to therapy. Long-acting compositions may be administered every 3 to 4 days, every week, or biweekly depending on the half-life and clearance rate of the particular formulation.

Normal dosage amounts may vary from about 0.1 μg to 100,000 μg, up to a total dose of about 1 gram, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature and generally available to practitioners in the art. Those skilled in the art will employ different formulations for nucleotides than for proteins or their inhibitors. Similarly, delivery of polynucleotides or polypeptides will be specific to particular cells, conditions, locations, etc.

DIAGNOSTICS

In another embodiment, antibodies which specifically bind SRP may be used for the diagnosis of disorders characterized by expression of SRP, or in assays to monitor patients being treated with SRP or agonists, antagonists, or inhibitors of SRP. Antibodies useful for diagnostic purposes may be prepared in the same manner as described above for therapeutics. Diagnostic assays for SRP include methods which utilize the antibody and a label to detect SRP in human body fluids or in extracts of cells or tissues. The antibodies may be used with or without modification, and may be labeled by covalent or non-covalent attachment of a reporter molecule. A wide variety of reporter molecules, several of which are described above, are known in the art and may be used.

A variety of protocols for measuring SRP, including ELISAs, RIAs, and FACS, are known in the art and provide a basis for diagnosing altered or abnormal levels of SRP expression. Normal or standard values for SRP expression are established by combining body fluids or cell extracts taken

from normal mammalian subjects, for example, human subjects, with antibodies to SRP under conditions suitable for complex formation. The amount of standard complex formation may be quantitated by various methods, such as photometric means. Quantities of SRP expressed in subject, control, and disease samples from biopsied tissues are compared with the standard values. Deviation between standard and subject values establishes the parameters for diagnosing disease.

In another embodiment of the invention, the polynucleotides encoding SRP may be used for diagnostic purposes. The polynucleotides which may be used include oligonucleotide sequences, complementary RNA and DNA molecules, and PNAs. The polynucleotides may be used to detect and quantify gene expression in biopsied tissues in which expression of SRP may be correlated with disease. The diagnostic assay may be used to determine absence, presence, and excess expression of SRP, and to monitor regulation of SRP levels during therapeutic intervention.

In one aspect, hybridization with PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding SRP or closely related molecules may be used to identify nucleic acid sequences which encode SRP. The specificity of the probe, whether it is made from a highly specific region, e.g., the 5' regulatory region, or from a less specific region, e.g., a conserved motif, and the stringency of the hybridization or amplification will determine whether the probe identifies only naturally occurring sequences encoding SRP, allelic variants, or related sequences.

Probes may also be used for the detection of related sequences, and may have at least 50% sequence identity to any of the SRP encoding sequences. The hybridization probes of the subject invention may be DNA or RNA and may be derived from the sequence of SEQ ID NO:4-6 or from genomic sequences including promoters, enhancers, and introns of the SRP gene.

Means for producing specific hybridization probes for DNAs encoding SRP include the cloning of polynucleotide sequences encoding SRP or SRP derivatives into vectors for the production of mRNA probes. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes in vitro by means of the addition of the appropriate RNA polymerases and the appropriate labeled nucleotides. Hybridization probes may be labeled by a variety of reporter groups, for example, by radionuclides such as ^{32}P or ^{35}S, or by enzymatic labels, such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems, and the like.

Polynucleotide sequences encoding SRP may be used for the diagnosis of disorders associated with expression of SRP. Examples of such disorders include, but are not limited to, a cell proliferative disorder such as actinic keratosis, arteriosclerosis, atherosclerosis, bursitis, cirrhosis, hepatitis, mixed connective tissue disease (MCTD), myelofibrosis, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, polycythemia vera, psoriasis, primary thrombocythemia, and cancers including adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, melanoma, myeloma, sarcoma, teratocarcinoma, and, in

particular, cancers of the adrenal gland, bladder, bone, bone marrow, brain, breast, cervix, gall bladder, ganglia, gastrointestinal tract, heart, kidney, liver, lung, muscle, ovary, pancreas, parathyroid, penis, prostate, salivary glands, skin, spleen, testis, thymus, thyroid, and uterus; a neurological disorder such as epilepsy, ischemic cerebrovascular disease, stroke, cerebral neoplasms, Alzheimer's disease, Pick's disease, Huntington's disease, dementia, Parkinson's disease and other extrapyramidal disorders, amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders, progressive neural muscular atrophy, retinitis pigmentosa, hereditary ataxias, multiple sclerosis and other demyelinating diseases, bacterial and viral meningitis, brain abscess, subdural empyema, epidural abscess, suppurative intracranial thrombophlebitis, myelitis and radiculitis, viral central nervous system disease; prion diseases including kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome; fatal familial insomnia, nutritional and metabolic diseases of the nervous system, neurofibromatosis, tuberous sclerosis, cerebelloretinal hemangioblastomatosis, encephalotrigeminal syndrome, mental retardation and other developmental disorders of the central nervous system, cerebral palsy, neuroskeletal disorders, autonomic nervous system disorders, cranial nerve disorders, spinal cord diseases, muscular dystrophy and other neuromuscular disorders, peripheral nervous system disorders, dermatomyositis and polymyositis; inherited, metabolic, endocrine, and toxic myopathies; myasthenia gravis, periodic paralysis; mental disorders including mood, anxiety, and schizophrenic disorders; seasonal affective disorder (SAD); akathesia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, Tourette's disorder, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and familial frontotemporal dementia; a genetic disorder such as adrenoleukodystrophy, Alport's syndrome, choroideremia, Duchenne and Becker muscular dystrophy, Down's syndrome, cystic fibrosis, chronic granulomatous disease, Gaucher's disease, Huntington's chorea, Marfan's syndrome, muscular dystrophy, myotonic dystrophy, pycnodysostosis, Refsum's syndrome, retinoblastoma, sickle cell anemia, thalassemia, Werner syndrome, von Willebrand's disease, Wilms' tumor, Zellweger syndrome, peroxisomal acyl-CoA oxidase deficiency, peroxisomal thiolase deficiency, peroxisomal bifunctional protein deficiency, mitochondrial carnitine palmitoyl transferase and carnitine deficiency, mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, mitochondrial medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, mitochondrial short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, mitochondrial electron transport flavoprotein and electron transport flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase deficiency, mitochondrial trifunctional protein deficiency, and mitochondrial short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency; and a smooth muscle disorder such as angina, anaphylactic shock, arrhythmias, asthma, cardiovascular shock, Cushing's syndrome, hypertension, hypoglycemia, myocardial infarction, migraine, and pheochromocytoma,

and myopathies including cardiomyopathy, encephalopathy, epilepsy, Kearns-Sayre syndrome, lactic acidosis, myoclonic disorder, and ophthalmoplegia, and other metabolic disorders, such as hyperammonemia, trimethylaminuria (fish-odor syndrome), 3-hydroxydicarboxylic aciduria, dicarboxylic aciduria, xanthinuria, congenital lipoid adrenal hyperplasia (CLAH), albinism type III, hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome (HHS), glutaric acidemia type I (GA-I), familial recurrent myoglobinuria, insulin resistance, hereditary thymine- uraciluria (familial pyrimidinemia), idiopathic sidereoblastic anemia (AISA), neonatal adrenoleukodystrophy, hypoxia, increased damage to tissues caused by trauma, radiation and ultraviolet exposure, liver dysfunction, marked obesity, methemoglobinemia (HM1, HM2, and HM3), hypertrophic hirsutism with amenorrhea, and Hermansky-Pudlack syndrome. The polynucleotide sequences encoding SRP may be used in Southern or northern analysis, dot blot, or other membrane-based technologies; in PCR technologies; in dipstick, pin, and multiformat ELISA-like assays; and in microarrays utilizing fluids or tissues from patients to detect altered SRP expression. Such qualitative or quantitative methods are well known in the art.

In a particular aspect, the nucleotide sequences encoding SRP may be useful in assays that detect the presence of associated disorders, particularly those mentioned above. The nucleotide sequences encoding SRP may be labeled by standard methods and added to a fluid or tissue sample from a patient under conditions suitable for the formation of hybridization complexes. After a suitable incubation period, the sample is washed and the signal is quantified and compared with a standard value. If the amount of signal in the patient sample is significantly altered in comparison to a control sample then the presence of altered levels of nucleotide sequences encoding SRP in the sample indicates the presence of the associated disorder. Such assays may also be used to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regimen in animal studies, in clinical trials, or to monitor the treatment of an individual patient.

In order to provide a basis for the diagnosis of a disorder associated with expression of SRP, a normal or standard profile for expression is established. This may be accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with a sequence, or a fragment thereof, encoding SRP, under conditions suitable for hybridization or amplification. Standard hybridization may be quantified by comparing the values obtained from normal subjects with values from an experiment in which a known amount of a substantially purified polynucleotide is used. Standard values obtained in this manner may be compared with values obtained from samples from patients who are symptomatic for a disorder. Deviation from standard values is used to establish the presence of a disorder.

Once the presence of a disorder is established and a treatment protocol is initiated, hybridization assays may be repeated on a regular basis to determine if the level of expression in the

patient begins to approximate that which is observed in the normal subject. The results obtained from successive assays may be used to show the efficacy of treatment over a period ranging from several days to months.

With respect to cancer, the presence of an abnormal amount of transcript (either under- or overexpressed) in biopsied tissue from an individual may indicate a predisposition for the development of the disease, or may provide a means for detecting the disease prior to the appearance of actual clinical symptoms. A more definitive diagnosis of this type may allow health professionals to employ preventative measures or aggressive treatment earlier thereby preventing the development or further progression of the cancer.

Additional diagnostic uses for oligonucleotides designed from the sequences encoding SRP may involve the use of PCR. These oligomers may be chemically synthesized, generated enzymatically, or produced in vitro. Oligomers will preferably contain a fragment of a polynucleotide encoding SRP, or a fragment of a polynucleotide complementary to the polynucleotide encoding SRP, and will be employed under optimized conditions for identification of a specific gene or condition. Oligomers may also be employed under less stringent conditions for detection or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

In a particular aspect, oligonucleotide primers derived from the polynucleotide sequences encoding SRP may be used to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs). SNPs are substitutions, insertions and deletions that are a frequent cause of inherited or acquired genetic disease in humans. Methods of SNP detection include, but are not limited to, single-stranded conformation polymorphism (SSCP) and fluorescent SSCP (fSSCP) methods. In SSCP, oligonucleotide primers derived from the polynucleotide sequences encoding SRP are used to amplify DNA using the polymerase chain reaction (PCR). The DNA may be derived, for example, from diseased or normal tissue, biopsy samples, bodily fluids, and the like. SNPs in the DNA cause differences in the secondary and tertiary structures of PCR products in single-stranded form, and these differences are detectable using gel electrophoresis in non-denaturing gels. In fSCCP, the oligonucleotide primers are fluorescently labeled, which allows detection of the amplimers in high-throughput equipment such as DNA sequencing machines. Additionally, sequence database analysis methods, termed in silico SNP (isSNP), are capable of identifying polymorphisms by comparing the sequence of individual overlapping DNA fragments which assemble into a common consensus sequence. These computer-based methods filter out sequence variations due to laboratory preparation of DNA and sequencing errors using statistical models and automated analyses of DNA sequence chromatograms. In the alternative, SNPs may be detected and characterized by mass spectrometry using, for example, the high throughput MASSARRAY system (Sequenom, Inc., San Diego CA).

Methods which may also be used to quantify the expression of SRP include radiolabeling or

biotinylating nucleotides, coamplification of a control nucleic acid, and interpolating results from standard curves. (See, e.g., Melby, P.C. et al. (1993) J. Immunol. Methods 159:235-244; Duplaa, C. et al. (1993) Anal. Biochem. 212:229-236.) The speed of quantitation of multiple samples may be accelerated by running the assay in a high-throughput format where the oligomer or polynucleotide of interest is presented in various dilutions and a spectrophotometric or colorimetric response gives rapid quantitation.

In further embodiments, oligonucleotides or longer fragments derived from any of the polynucleotide sequences described herein may be used as elements on a microarray. The microarray can be used in transcript imaging techniques which monitor the relative expression levels of large numbers of genes simultaneously as described below. The microarray may also be used to identify genetic variants, mutations, and polymorphisms. This information may be used to determine gene function, to understand the genetic basis of a disorder, to diagnose a disorder, to monitor progression/regression of disease as a function of gene expression, and to develop and monitor the activities of therapeutic agents in the treatment of disease. In particular, this information may be used to develop a pharmacogenomic profile of a patient in order to select the most appropriate and effective treatment regimen for that patient. For example, therapeutic agents which are highly effective and display the fewest side effects may be selected for a patient based on his/her pharmacogenomic profile.

In another embodiment, SRP, fragments of SRP, or antibodies specific for SRP may be used as elements on a microarray. The microarray may be used to monitor or measure protein-protein interactions, drug-target interactions, and gene expression profiles, as described above.

A particular embodiment relates to the use of the polynucleotides of the present invention to generate a transcript image of a tissue or cell type. A transcript image represents the global pattern of gene expression by a particular tissue or cell type. Global gene expression patterns are analyzed by quantifying the number of expressed genes and their relative abundance under given conditions and at a given time. (See Seilhamer et al., "Comparative Gene Transcript Analysis," U.S. Patent Number 5,840,484, expressly incorporated by reference herein.) Thus a transcript image may be generated by hybridizing the polynucleotides of the present invention or their complements to the totality of transcripts or reverse transcripts of a particular tissue or cell type. In one embodiment, the hybridization takes place in high-throughput format, wherein the polynucleotides of the present invention or their complements comprise a subset of a plurality of elements on a microarray. The resultant transcript image would provide a profile of gene activity.

Transcript images may be generated using transcripts isolated from tissues, cell lines, biopsies, or other biological samples. The transcript image may thus reflect gene expression in vivo, as in the case of a tissue or biopsy sample, or in vitro, as in the case of a cell line.

Transcript images which profile the expression of the polynucleotides of the present invention may also be used in conjunction with in vitro model systems and preclinical evaluation of pharmaceuticals, as well as toxicological testing of industrial and naturally-occurring environmental compounds. All compounds induce characteristic gene expression patterns, frequently termed molecular fingerprints or toxicant signatures, which are indicative of mechanisms of action and toxicity (Nuwaysir, E.F. et al. (1999) Mol. Carcinog. 24:153-159; Steiner, S. and N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471, expressly incorporated by reference herein). If a test compound has a signature similar to that of a compound with known toxicity, it is likely to share those toxic properties. These fingerprints or signatures are most useful and refined when they contain expression information from a large number of genes and gene families. Ideally, a genome-wide measurement of expression provides the highest quality signature. Even genes whose expression is not altered by any tested compounds are important as well, as the levels of expression of these genes are used to normalize the rest of the expression data. The normalization procedure is useful for comparison of expression data after treatment with different compounds. While the assignment of gene function to elements of a toxicant signature aids in interpretation of toxicity mechanisms, knowledge of gene function is not necessary for the statistical matching of signatures which leads to prediction of toxicity. (See, for example, Press Release 00-02 from the National Institute of Environmental Health Sciences, released February 29, 2000, available at http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm.) Therefore, it is important and desirable in toxicological screening using toxicant signatures to include all expressed gene sequences.

In one embodiment, the toxicity of a test compound is assessed by treating a biological sample containing nucleic acids with the test compound. Nucleic acids that are expressed in the treated biological sample are hybridized with one or more probes specific to the polynucleotides of the present invention, so that transcript levels corresponding to the polynucleotides of the present invention may be quantified. The transcript levels in the treated biological sample are compared with levels in an untreated biological sample. Differences in the transcript levels between the two samples are indicative of a toxic response caused by the test compound in the treated sample.

Another particular embodiment relates to the use of the polypeptide sequences of the present invention to analyze the proteome of a tissue or cell type. The term proteome refers to the global pattern of protein expression in a particular tissue or cell type. Each protein component of a proteome can be subjected individually to further analysis. Proteome expression patterns, or profiles, are analyzed by quantifying the number of expressed proteins and their relative abundance under given conditions and at a given time. A profile of a cell's proteome may thus be generated by separating and analyzing the polypeptides of a particular tissue or cell type. In one embodiment, the separation is achieved using two-dimensional gel electrophoresis, in which proteins from a sample are

separated by isoelectric focusing in the first dimension, and then according to molecular weight by sodium dodecyl sulfate slab gel electrophoresis in the second dimension (Steiner and Anderson, supra). The proteins are visualized in the gel as discrete and uniquely positioned spots, typically by staining the gel with an agent such as Coomassie Blue or silver or fluorescent stains. The optical density of each protein spot is generally proportional to the level of the protein in the sample. The optical densities of equivalently positioned protein spots from different samples, for example, from biological samples either treated or untreated with a test compound or therapeutic agent, are compared to identify any changes in protein spot density related to the treatment. The proteins in the spots are partially sequenced using, for example, standard methods employing chemical or enzymatic cleavage followed by mass spectrometry. The identity of the protein in a spot may be determined by comparing its partial sequence, preferably of at least 5 contiguous amino acid residues, to the polypeptide sequences of the present invention. In some cases, further sequence data may be obtained for definitive protein identification.

A proteomic profile may also be generated using antibodies specific for SRP to quantify the levels of SRP expression. In one embodiment, the antibodies are used as elements on a microarray, and protein expression levels are quantified by exposing the microarray to the sample and detecting the levels of protein bound to each array element (Lueking, A. et al. (1999) Anal. Biochem. 270:103-111; Mendoze, L.G. et al. (1999) Biotechniques 27:778-788). Detection may be performed by a variety of methods known in the art, for example, by reacting the proteins in the sample with a thiol- or amino-reactive fluorescent compound and detecting the amount of fluorescence bound at each array element.

Toxicant signatures at the proteome level are also useful for toxicological screening, and should be analyzed in parallel with toxicant signatures at the transcript level. There is a poor correlation between transcript and protein abundances for some proteins in some tissues (Anderson, N.L. and J. Seilhamer (1997) Electrophoresis 18:533-537), so proteome toxicant signatures may be useful in the analysis of compounds which do not significantly affect the transcript image, but which alter the protcomic profile. In addition, the analysis of transcripts in body fluids is difficult, due to rapid degradation of mRNA, so proteomic profiling may be more reliable and informative in such cases.

In another embodiment, the toxicity of a test compound is assessed by treating a biological sample containing proteins with the test compound. Proteins that are expressed in the treated biological sample are separated so that the amount of each protein can be quantified. The amount of each protein is compared to the amount of the corresponding protein in an untreated biological sample. A difference in the amount of protein between the two samples is indicative of a toxic response to the test compound in the treated sample. Individual proteins are identified by sequencing

the amino acid residues of the individual proteins and comparing these partial sequences to the polypeptides of the present invention.

In another embodiment, the toxicity of a test compound is assessed by treating a biological sample containing proteins with the test compound. Proteins from the biological sample are incubated with antibodies specific to the polypeptides of the present invention. The amount of protein recognized by the antibodies is quantified. The amount of protein in the treated biological sample is compared with the amount in an untreated biological sample. A difference in the amount of protein between the two samples is indicative of a toxic response to the test compound in the treated sample.

Microarrays may be prepared, used, and analyzed using methods known in the art. (See, e.g., Brennan, T.M. et al. (1995) U.S. Patent No. 5,474,796; Schena, M. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619; Baldeschweiler et al. (1995) PCT application WO95/251116; Shalon, D. et al. (1995) PCT application WO95/35505; Heller, R.A. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155; and Heller, M.J. et al. (1997) U.S. Patent No. 5,605,662.) Various types of microarrays are well known and thoroughly described in DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, ed. (1999) Oxford University Press, London, hereby expressly incorporated by reference.

In another embodiment of the invention, nucleic acid sequences encoding SRP may be used to generate hybridization probes useful in mapping the naturally occurring genomic sequence. Either coding or noncoding sequences may be used, and in some instances, noncoding sequences may be preferable over coding sequences. For example, conservation of a coding sequence among members of a multi-gene family may potentially cause undesired cross hybridization during chromosomal mapping. The sequences may be mapped to a particular chromosome, to a specific region of a chromosome, or to artificial chromosome constructions, e.g., human artificial chromosomes (HACs), yeast artificial chromosomes (YACs), bacterial artificial chromosomes (BACs), bacterial P1 constructions, or single chromosome cDNA libraries. (See, e.g., Harrington, J.J. et al. (1997) Nat. Genet. 15:345-355; Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134; and Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154.) Once mapped, the nucleic acid sequences of the invention may be used to develop genetic linkage maps, for example, which correlate the inheritance of a disease state with the inheritance of a particular chromosome region or restriction fragment length polymorphism (RFLP). (See, for example, Lander, E.S. and D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357.)

Fluorescent in situ hybridization (FISH) may be correlated with other physical and genetic map data. (See, e.g., Heinz-Ulrich, et al. (1995) in Meyers, supra, pp. 965-968.) Examples of genetic map data can be found in various scientific journals or at the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) World Wide Web site. Correlation between the location of the gene encoding SRP on a physical map and a specific disorder, or a predisposition to a specific disorder, may help define the

region of DNA associated with that disorder and thus may further positional cloning efforts.

In situ hybridization of chromosomal preparations and physical mapping techniques, such as linkage analysis using established chromosomal markers, may be used for extending genetic maps. Often the placement of a gene on the chromosome of another mammalian species, such as mouse, may reveal associated markers even if the exact chromosomal locus is not known. This information is valuable to investigators searching for disease genes using positional cloning or other gene discovery techniques. Once the gene or genes responsible for a disease or syndrome have been crudely localized by genetic linkage to a particular genomic region, e.g., ataxia-telangiectasia to 11q22-23, any sequences mapping to that area may represent associated or regulatory genes for further investigation. (See, e.g., Gatti, R.A. et al. (1988) Nature 336:577-580.) The nucleotide sequence of the instant invention may also be used to detect differences in the chromosomal location due to translocation, inversion, etc., among normal, carrier, or affected individuals.

In another embodiment of the invention, SRP, its catalytic or immunogenic fragments, or oligopeptides thereof can be used for screening libraries of compounds in any of a variety of drug screening techniques. The fragment employed in such screening may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The formation of binding complexes between SRP and the agent being tested may be measured.

Another technique for drug screening provides for high throughput screening of compounds having suitable binding affinity to the protein of interest. (See, e.g., Geysen, et al. (1984) PCT application WO84/03564.) In this method, large numbers of different small test compounds are synthesized on a solid substrate. The test compounds are reacted with SRP, or fragments thereof, and washed. Bound SRP is then detected by methods well known in the art. Purified SRP can also be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. Alternatively, non-neutralizing antibodies can be used to capture the peptide and immobilize it on a solid support.

In another embodiment, one may use competitive drug screening assays in which neutralizing antibodies capable of binding SRP specifically compete with a test compound for binding SRP. In this manner, antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with SRP.

In additional embodiments, the nucleotide sequences which encode SRP may be used in any molecular biology techniques that have yet to be developed, provided the new techniques rely on properties of nucleotide sequences that are currently known, including, but not limited to, such properties as the triplet genetic code and specific base pair interactions.

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding description, utilize the present invention to its fullest extent. The following embodiments are, therefore, to be construed as merely illustrative, and not limitative of the remainder of the disclosure

in any way whatsoever.

The disclosures of all patents, applications and publications, mentioned above and below, including U.S. Ser. No. 60/213,957, are expressly incorporated by reference herein.

EXAMPLES

I. Construction of cDNA Libraries

Incyte cDNAs were derived from cDNA libraries described in the LIFESEQ GOLD database (Incyte Genomics, Palo Alto CA) and shown in Table 4, column 5. Some tissues were homogenized and lysed in guanidinium isothiocyanate, while others were homogenized and lysed in phenol or in a suitable mixture of denaturants, such as TRIZOL (Life Technologies), a monophasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate. The resulting lysates were centrifuged over CsCl cushions or extracted with chloroform. RNA was precipitated from the lysates with either isopropanol or sodium acetate and ethanol, or by other routine methods.

Phenol extraction and precipitation of RNA were repeated as necessary to increase RNA purity. In some cases, RNA was treated with DNase. For most libraries, poly(A)+ RNA was isolated using oligo d(T)-coupled paramagnetic particles (Promega), OLIGOTEX latex particles (QIAGEN, Chatsworth CA), or an OLIGOTEX mRNA purification kit (QIAGEN). Alternatively, RNA was isolated directly from tissue lysates using other RNA isolation kits, e.g., the POLY(A)PURE mRNA purification kit (Ambion, Austin TX).

In some cases, Stratagene was provided with RNA and constructed the corresponding cDNA libraries. Otherwise, cDNA was synthesized and cDNA libraries were constructed with the UNIZAP vector system (Stratagene) or SUPERSCRIPT plasmid system (Life Technologies), using the recommended procedures or similar methods known in the art. (See, e.g., Ausubel, 1997, supra, units 5.1-6.6.) Reverse transcription was initiated using oligo d(T) or random primers. Synthetic oligonucleotide adapters were ligated to double stranded cDNA, and the cDNA was digested with the appropriate restriction enzyme or enzymes. For most libraries, the cDNA was size-selected (300-1000 bp) using SEPHACRYL S1000, SEPHAROSE CL2B, or SEPHAROSE CL4B column chromatography (Amersham Pharmacia Biotech) or preparative agarose gel electrophoresis. cDNAs were ligated into compatible restriction enzyme sites of the polylinker of a suitable plasmid, e.g., PBLUESCRIPT plasmid (Stratagene), PSPORT1 plasmid (Life Technologies), PCDNA2.1 plasmid (Invitrogen, Carlsbad CA), PBK-CMV plasmid (Stratagene), or pINCY (Incyte Genomics, Palo Alto CA), or derivatives thereof. Recombinant plasmids were transformed into competent E. coli cells including XL1-Blue, XL1-BlueMRF, or SOLR from Stratagene or DH5α, DH10B, or ElectroMAX DH10B from Life Technologies.

II. Isolation of cDNA Clones

Plasmids obtained as described in Example I were recovered from host cells by in vivo excision using the UNIZAP vector system (Stratagene) or by cell lysis. Plasmids were purified using at least one of the following: a Magic or WIZARD Minipreps DNA purification system (Promega); an AGTC Miniprep purification kit (Edge Biosystems, Gaithersburg MD); and QIAWELL 8 Plasmid, QIAWELL 8 Plus Plasmid, QIAWELL 8 Ultra Plasmid purification systems or the R.E.A.L. PREP 96 plasmid purification kit from QIAGEN. Following precipitation, plasmids were resuspended in 0.1 ml of distilled water and stored, with or without lyophilization, at 4°C.

Alternatively, plasmid DNA was amplified from host cell lysates using direct link PCR in a high-throughput format (Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14). Host cell lysis and thermal cycling steps were carried out in a single reaction mixture. Samples were processed and stored in 384-well plates, and the concentration of amplified plasmid DNA was quantified fluorometrically using PICOGREEN dye (Molecular Probes, Eugene OR) and a FLUOROSKAN II fluorescence scanner (Labsystems Oy, Helsinki, Finland).

III. Sequencing and Analysis

Incyte cDNA recovered in plasmids as described in Example II were sequenced as follows. Sequencing reactions were processed using standard methods or high-throughput instrumentation such as the ABI CATALYST 800 (Applied Biosystems) thermal cycler or the PTC-200 thermal cycler (MJ Research) in conjunction with the HYDRA microdispenser (Robbins Scientific) or the MICROLAB 2200 (Hamilton) liquid transfer system. cDNA sequencing reactions were prepared using reagents provided by Amersham Pharmacia Biotech or supplied in ABI sequencing kits such as the ABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems). Electrophoretic separation of cDNA sequencing reactions and detection of labeled polynucleotides were carried out using the MEGABACE 1000 DNA sequencing system (Molecular Dynamics); the ABI PRISM 373 or 377 sequencing system (Applied Biosystems) in conjunction with standard ABI protocols and base calling software; or other sequence analysis systems known in the art. Reading frames within the cDNA sequences were identified using standard methods (reviewed in Ausubel, 1997, supra, unit 7.7). Some of the cDNA sequences were selected for extension using the techniques disclosed in Example VIII.

The polynucleotide sequences derived from Incyte cDNAs were validated by removing vector, linker, and poly(A) sequences and by masking ambiguous bases, using algorithms and programs based on BLAST, dynamic programming, and dinucleotide nearest neighbor analysis. The Incyte cDNA sequences or translations thereof were then queried against a selection of public databases such as the GenBank primate, rodent, mammalian, vertebrate, and eukaryote databases, and BLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOM, and hidden Markov model (HMM)-based protein family databases such as PFAM. (HMM is a probabilistic approach which analyzes consensus primary

structures of gene families. See, for example, Eddy, S.R. (1996) Curr. Opin. Struct. Biol. 6:361-365.) The queries were performed using programs based on BLAST, FASTA, BLIMPS, and HMMER. The Incyte cDNA sequences were assembled to produce full length polynucleotide sequences. Alternatively, GenBank cDNAs, GenBank ESTs, stitched sequences, stretched sequences, or Genscan-predicted coding sequences (see Examples IV and V) were used to extend Incyte cDNA assemblages to full length. Assembly was performed using programs based on Phred, Phrap, and Consed, and cDNA assemblages were screened for open reading frames using programs based on GeneMark, BLAST, and FASTA. The full length polynucleotide sequences were translated to derive the corresponding full length polypeptide sequences. Alternatively, a polypeptide of the invention may begin at any of the methionine residues of the full length translated polypeptide. Full length polypeptide sequences were subsequently analyzed by querying against databases such as the GenBank protein databases (genpept), SwissProt, BLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOM, Prosite, and hidden Markov model (HMM)-based protein family databases such as PFAM. Full length polynucleotide sequences are also analyzed using MACDNASIS PRO software (Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA) and LASERGENE software (DNASTAR). Polynucleotide and polypeptide sequence alignments are generated using default parameters specified by the CLUSTAL algorithm as incorporated into the MEGALIGN multisequence alignment program (DNASTAR), which also calculates the percent identity between aligned sequences.

Table 7 summarizes the tools, programs, and algorithms used for the analysis and assembly of Incyte cDNA and full length sequences and provides applicable descriptions, references, and threshold parameters. The first column of Table 7 shows the tools, programs, and algorithms used, the second column provides brief descriptions thereof, the third column presents appropriate references, all of which are incorporated by reference herein in their entirety, and the fourth column presents, where applicable, the scores, probability values, and other parameters used to evaluate the strength of a match between two sequences (the higher the score or the lower the probability value, the greater the identity between two sequences).

The programs described above for the assembly and analysis of full length polynucleotide and polypeptide sequences were also used to identify polynucleotide sequence fragments from SEQ ID NO:4-6. Fragments from about 20 to about 4000 nucleotides which are useful in hybridization and amplification technologies are described in Table 4, column 4.

IV. Identification and Editing of Coding Sequences from Genomic DNA

Putative secreted redox proteins were initially identified by running the Genscan gene identification program against public genomic sequence databases (e.g., gbpri and gbhtg). Genscan is a general-purpose gene identification program which analyzes genomic DNA sequences from a variety of organisms (See Burge, C. and S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94, and Burge, C. and

S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8:346-354). The program concatenates predicted exons to form an assembled cDNA sequence extending from a methionine to a stop codon. The output of Genscan is a FASTA database of polynucleotide and polypeptide sequences. The maximum range of sequence for Genscan to analyze at once was set to 30 kb. To determine which of these Genscan predicted cDNA sequences encode secreted redox proteins, the encoded polypeptides were analyzed by querying against PFAM models for secreted redox proteins. Potential secreted redox proteins were also identified by homology to Incyte cDNA sequences that had been annotated as secreted redox proteins. These selected Genscan-predicted sequences were then compared by BLAST analysis to the genpept and gbpri public databases. Where necessary, the Genscan-predicted sequences were then edited by comparison to the top BLAST hit from genpept to correct errors in the sequence predicted by Genscan, such as extra or omitted exons. BLAST analysis was also used to find any Incyte cDNA or public cDNA coverage of the Genscan-predicted sequences, thus providing evidence for transcription. When Incyte cDNA coverage was available, this information was used to correct or confirm the Genscan predicted sequence. Full length polynucleotide sequences were obtained by assembling Genscan-predicted coding sequences with Incyte cDNA sequences and/or public cDNA sequences using the assembly process described in Example III. Alternatively, full length polynucleotide sequences were derived entirely from edited or unedited Genscan-predicted coding sequences.

V. Assembly of Genomic Sequence Data with cDNA Sequence Data

"Stitched" Sequences

Partial cDNA sequences were extended with exons predicted by the Genscan gene identification program described in Example IV. Partial cDNAs assembled as described in Example III were mapped to genomic DNA and parsed into clusters containing related cDNAs and Genscan exon predictions from one or more genomic sequences. Each cluster was analyzed using an algorithm based on graph theory and dynamic programming to integrate cDNA and genomic information, generating possible splice variants that were subsequently confirmed, edited, or extended to create a full length sequence. Sequence intervals in which the entire length of the interval was present on more than one sequence in the cluster were identified, and intervals thus identified were considered to be equivalent by transitivity. For example, if an interval was present on a cDNA and two genomic sequences, then all three intervals were considered to be equivalent. This process allows unrelated but consecutive genomic sequences to be brought together, bridged by cDNA sequence. Intervals thus identified were then "stitched" together by the stitching algorithm in the order that they appear along their parent sequences to generate the longest possible sequence, as well as sequence variants. Linkages between intervals which proceed along one type of parent sequence (cDNA to cDNA or genomic sequence to genomic sequence) were given preference over linkages which change parent

type (cDNA to genomic sequence). The resultant stitched sequences were translated and compared by BLAST analysis to the genpept and gbpri public databases. Incorrect exons predicted by Genscan were corrected by comparison to the top BLAST hit from genpept. Sequences were further extended with additional cDNA sequences, or by inspection of genomic DNA, when necessary.

"Stretched" Sequences

Partial DNA sequences were extended to full length with an algorithm based on BLAST analysis. First, partial cDNAs assembled as described in Example III were queried against public databases such as the GenBank primate, rodent, mammalian, vertebrate, and eukaryote databases using the BLAST program. The nearest GenBank protein homolog was then compared by BLAST analysis to either Incyte cDNA sequences or GenScan exon predicted sequences described in Example IV. A chimeric protein was generated by using the resultant high-scoring segment pairs (HSPs) to map the translated sequences onto the GenBank protein homolog. Insertions or deletions may occur in the chimeric protein with respect to the original GenBank protein homolog. The GenBank protein homolog, the chimeric protein, or both were used as probes to search for homologous genomic sequences from the public human genome databases. Partial DNA sequences were therefore "stretched" or extended by the addition of homologous genomic sequences. The resultant stretched sequences were examined to determine whether it contained a complete gene.

VI. Chromosomal Mapping of SRP Encoding Polynucleotides

The sequences which were used to assemble SEQ ID NO:4-6 were compared with sequences from the Incyte LIFESEQ database and public domain databases using BLAST and other implementations of the Smith-Waterman algorithm. Sequences from these databases that matched SEQ ID NO:4-6 were assembled into clusters of contiguous and overlapping sequences using assembly algorithms such as Phrap (Table 7). Radiation hybrid and genetic mapping data available from public resources such as the Stanford Human Genome Center (SHGC), Whitehead Institute for Genome Research (WIGR), and Généthon were used to determine if any of the clustered sequences had been previously mapped. Inclusion of a mapped sequence in a cluster resulted in the assignment of all sequences of that cluster, including its particular SEQ ID NO:, to that map location.

Map locations are represented by ranges, or intervals, of human chromosomes. The map position of an interval, in centiMorgans, is measured relative to the terminus of the chromosome's p-arm. (The centiMorgan (cM) is a unit of measurement based on recombination frequencies between chromosomal markers. On average, 1 cM is roughly equivalent to 1 megabase (Mb) of DNA in humans, although this can vary widely due to hot and cold spots of recombination.) The cM distances are based on genetic markers mapped by Généthon which provide boundaries for radiation hybrid markers whose sequences were included in each of the clusters. Human genome maps and other resources available to the public, such as the NCBI "GeneMap'99" World Wide Web site

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/), can be employed to determine if previously identified disease genes map within or in proximity to the intervals indicated above.

VII. Analysis of Polynucleotide Expression

Northern analysis is a laboratory technique used to detect the presence of a transcript of a gene and involves the hybridization of a labeled nucleotide sequence to a membrane on which RNAs from a particular cell type or tissue have been bound. (See, e.g., Sambrook, supra, ch. 7; Ausubel (1995) supra, ch. 4 and 16.)

Analogous computer techniques applying BLAST were used to search for identical or related molecules in cDNA databases such as GenBank or LIFESEQ (Incyte Genomics). This analysis is much faster than multiple membrane-based hybridizations. In addition, the sensitivity of the computer search can be modified to determine whether any particular match is categorized as exact or similar. The basis of the search is the product score, which is defined as:

$$\frac{\text{BLAST Score} \times \text{Percent Identity}}{5 \times \text{minimum}\{\text{length(Seq. 1)}, \text{length(Seq. 2)}\}}$$

The product score takes into account both the degree of similarity between two sequences and the length of the sequence match. The product score is a normalized value between 0 and 100, and is calculated as follows: the BLAST score is multiplied by the percent nucleotide identity and the product is divided by (5 times the length of the shorter of the two sequences). The BLAST score is calculated by assigning a score of +5 for every base that matches in a high-scoring segment pair (HSP), and -4 for every mismatch. Two sequences may share more than one HSP (separated by gaps). If there is more than one HSP, then the pair with the highest BLAST score is used to calculate the product score. The product score represents a balance between fractional overlap and quality in a BLAST alignment. For example, a product score of 100 is produced only for 100% identity over the entire length of the shorter of the two sequences being compared. A product score of 70 is produced either by 100% identity and 70% overlap at one end, or by 88% identity and 100% overlap at the other. A product score of 50 is produced either by 100% identity and 50% overlap at one end, or 79% identity and 100% overlap.

Alternatively, polynucleotide sequences encoding SRP are analyzed with respect to the tissue sources from which they were derived. For example, some full length sequences are assembled, at least in part, with overlapping Incyte cDNA sequences (see Example III). Each cDNA sequence is derived from a cDNA library constructed from a human tissue. Each human tissue is classified into one of the following organ/tissue categories: cardiovascular system; connective tissue; digestive system; embryonic structures; endocrine system; exocrine glands; genitalia, female; genitalia, male;

germ cells; hemic and immune system; liver; musculoskeletal system; nervous system; pancreas; respiratory system; sense organs; skin; stomatognathic system; unclassified/mixed; or urinary tract. The number of libraries in each category is counted and divided by the total number of libraries across all categories. Similarly, each human tissue is classified into one of the following disease/condition categories: cancer, cell line, developmental, inflammation, neurological, trauma, cardiovascular, pooled, and other, and the number of libraries in each category is counted and divided by the total number of libraries across all categories. The resulting percentages reflect the tissue- and disease-specific expression of cDNA encoding SRP. cDNA sequences and cDNA library/tissue information are found in the LIFESEQ GOLD database (Incyte Genomics, Palo Alto CA).

VIII. Extension of SRP Encoding Polynucleotides

Full length polynucleotide sequences were also produced by extension of an appropriate fragment of the full length molecule using oligonucleotide primers designed from this fragment. One primer was synthesized to initiate 5' extension of the known fragment, and the other primer was synthesized to initiate 3' extension of the known fragment. The initial primers were designed using OLIGO 4.06 software (National Biosciences), or another appropriate program, to be about 22 to 30 nucleotides in length, to have a GC content of about 50% or more, and to anneal to the target sequence at temperatures of about 68°C to about 72°C. Any stretch of nucleotides which would result in hairpin structures and primer-primer dimerizations was avoided.

Selected human cDNA libraries were used to extend the sequence. If more than one extension was necessary or desired, additional or nested sets of primers were designed.

High fidelity amplification was obtained by PCR using methods well known in the art. PCR was performed in 96-well plates using the PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Inc.). The reaction mix contained DNA template, 200 nmol of each primer, reaction buffer containing Mg^{2+}, $(NH_4)_2SO_4$, and 2-mercaptoethanol, Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech), ELONGASE enzyme (Life Technologies), and Pfu DNA polymerase (Stratagene), with the following parameters for primer pair PCI A and PCI B: Step 1: 94°C, 3 min; Step 2: 94°C, 15 sec; Step 3: 60°C, 1 min; Step 4: 68°C, 2 min; Step 5: Steps 2, 3, and 4 repeated 20 times; Step 6: 68°C, 5 min; Step 7: storage at 4°C. In the alternative, the parameters for primer pair T7 and SK+ were as follows: Step 1: 94°C, 3 min; Step 2: 94°C, 15 sec; Step 3: 57°C, 1 min; Step 4: 68°C, 2 min; Step 5: Steps 2, 3, and 4 repeated 20 times; Step 6: 68°C, 5 min; Step 7: storage at 4°C.

The concentration of DNA in each well was determined by dispensing 100 µl PICOGREEN quantitation reagent (0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR) dissolved in 1X TE and 0.5 µl of undiluted PCR product into each well of an opaque fluorimeter plate (Corning Costar, Acton MA), allowing the DNA to bind to the reagent. The plate was scanned in a Fluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) to measure the fluorescence of the sample and to quantify the

concentration of DNA. A 5 μl to 10 μl aliquot of the reaction mixture was analyzed by electrophoresis on a 1 % agarose gel to determine which reactions were successful in extending the sequence.

The extended nucleotides were desalted and concentrated, transferred to 384-well plates, digested with CviJI cholera virus endonuclease (Molecular Biology Research, Madison WI), and sonicated or sheared prior to religation into pUC 18 vector (Amersham Pharmacia Biotech). For shotgun sequencing, the digested nucleotides were separated on low concentration (0.6 to 0.8%) agarose gels, fragments were excised, and agar digested with Agar ACE (Promega). Extended clones were religated using T4 ligase (New England Biolabs, Beverly MA) into pUC 18 vector (Amersham Pharmacia Biotech), treated with Pfu DNA polymerase (Stratagene) to fill-in restriction site overhangs, and transfected into competent E. coli cells. Transformed cells were selected on antibiotic-containing media, and individual colonies were picked and cultured overnight at 37°C in 384-well plates in LB/2x carb liquid media.

The cells were lysed, and DNA was amplified by PCR using Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech) and Pfu DNA polymerase (Stratagene) with the following parameters: Step 1: 94°C, 3 min; Step 2: 94°C, 15 sec; Step 3: 60°C, 1 min; Step 4: 72°C, 2 min; Step 5: steps 2, 3, and 4 repeated 29 times; Step 6: 72°C, 5 min; Step 7: storage at 4°C. DNA was quantified by PICOGREEN reagent (Molecular Probes) as described above. Samples with low DNA recoveries were reamplified using the same conditions as described above. Samples were diluted with 20% dimethysulfoxide (1:2, v/v), and sequenced using DYENAMIC energy transfer sequencing primers and the DYENAMIC DIRECT kit (Amersham Pharmacia Biotech) or the ABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems).

In like manner, full length polynucleotide sequences are verified using the above procedure or are used to obtain 5' regulatory sequences using the above procedure along with oligonucleotides designed for such extension, and an appropriate genomic library.

IX. Labeling and Use of Individual Hybridization Probes

Hybridization probes derived from SEQ ID NO:4-6 are employed to screen cDNAs, genomic DNAs, or mRNAs. Although the labeling of oligonucleotides, consisting of about 20 base pairs, is specifically described, essentially the same procedure is used with larger nucleotide fragments. Oligonucleotides are designed using state-of-the-art software such as OLIGO 4.06 software (National Biosciences) and labeled by combining 50 pmol of each oligomer, 250 μCi of [γ-^{32}P] adenosine triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech), and T4 polynucleotide kinase (DuPont NEN, Boston MA). The labeled oligonucleotides are substantially purified using a SEPHADEX G-25 superfine size exclusion dextran bead column (Amersham Pharmacia Biotech). An aliquot containing 10^7 counts per minute of the labeled probe is used in a typical membrane-based hybridization analysis of

human genomic DNA digested with one of the following endonucleases: Ase I, Bgl II, Eco RI, Pst I, Xba I, or Pvu II (DuPont NEN).

The DNA from each digest is fractionated on a 0.7% agarose gel and transferred to nylon membranes (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH). Hybridization is carried out for 16 hours at 40°C. To remove nonspecific signals, blots are sequentially washed at room temperature under conditions of up to, for example, 0.1 x saline sodium citrate and 0.5% sodium dodecyl sulfate. Hybridization patterns are visualized using autoradiography or an alternative imaging means and compared.

X. Microarrays

The linkage or synthesis of array elements upon a microarray can be achieved utilizing photolithography, piezoelectric printing (ink-jet printing, See, e.g., Baldeschweiler, supra.), mechanical microspotting technologies, and derivatives thereof. The substrate in each of the aforementioned technologies should be uniform and solid with a non-porous surface (Schena (1999), supra). Suggested substrates include silicon, silica, glass slides, glass chips, and silicon wafers. Alternatively, a procedure analogous to a dot or slot blot may also be used to arrange and link elements to the surface of a substrate using thermal, UV, chemical, or mechanical bonding procedures. A typical array may be produced using available methods and machines well known to those of ordinary skill in the art and may contain any appropriate number of elements. (See, e.g., Schena, M. et al. (1995) Science 270:467-470; Shalon, D. et al. (1996) Genome Res. 6:639-645; Marshall, A. and J. Hodgson (1998) Nat. Biotechnol. 16:27-31.)

Full length cDNAs, Expressed Sequence Tags (ESTs), or fragments or oligomers thereof may comprise the elements of the microarray. Fragments or oligomers suitable for hybridization can be selected using software well known in the art such as LASERGENE software (DNASTAR). The array elements are hybridized with polynucleotides in a biological sample. The polynucleotides in the biological sample are conjugated to a fluorescent label or other molecular tag for ease of detection. After hybridization, nonhybridized nucleotides from the biological sample are removed, and a fluorescence scanner is used to detect hybridization at each array element. Alternatively, laser desorbtion and mass spectrometry may be used for detection of hybridization. The degree of complementarity and the relative abundance of each polynucleotide which hybridizes to an element on the microarray may be assessed. In one embodiment, microarray preparation and usage is described in detail below.

Tissue or Cell Sample Preparation

Total RNA is isolated from tissue samples using the guanidinium thiocyanate method and poly(A)$^+$ RNA is purified using the oligo-(dT) cellulose method. Each poly(A)$^+$ RNA sample is reverse transcribed using MMLV reverse-transcriptase, 0.05 pg/μl oligo-(dT) primer (21mer), 1X

first strand buffer, 0.03 units/μl RNase inhibitor, 500 μM dATP, 500 μM dGTP, 500 μM dTTP, 40 μM dCTP, 40 μM dCTP-Cy3 (BDS) or dCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech). The reverse transcription reaction is performed in a 25 ml volume containing 200 ng poly(A)$^+$ RNA with GEMBRIGHT kits (Incyte). Specific control poly(A)$^+$ RNAs are synthesized by in vitro transcription from non-coding yeast genomic DNA. After incubation at 37°C for 2 hr, each reaction sample (one with Cy3 and another with Cy5 labeling) is treated with 2.5 ml of 0.5M sodium hydroxide and incubated for 20 minutes at 85°C to the stop the reaction and degrade the RNA. Samples are purified using two successive CHROMA SPIN 30 gel filtration spin columns (CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA) and after combining, both reaction samples are ethanol precipitated using 1 ml of glycogen (1 mg/ml), 60 ml sodium acetate, and 300 ml of 100% ethanol. The sample is then dried to completion using a SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY) and resuspended in 14 μl 5X SSC/0.2% SDS.

Microarray Preparation

Sequences of the present invention are used to generate array elements. Each array element is amplified from bacterial cells containing vectors with cloned cDNA inserts. PCR amplification uses primers complementary to the vector sequences flanking the cDNA insert. Array elements are amplified in thirty cycles of PCR from an initial quantity of 1-2 ng to a final quantity greater than 5 μg. Amplified array elements are then purified using SEPHACRYL-400 (Amersham Pharmacia Biotech).

Purified array elements are immobilized on polymer-coated glass slides. Glass microscope slides (Corning) are cleaned by ultrasound in 0.1% SDS and acetone, with extensive distilled water washes between and after treatments. Glass slides are etched in 4% hydrofluoric acid (VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA), washed extensively in distilled water, and coated with 0.05% aminopropyl silane (Sigma) in 95% ethanol. Coated slides are cured in a 110°C oven.

Array elements are applied to the coated glass substrate using a procedure described in US Patent No. 5,807,522, incorporated herein by reference. 1 μl of the array element DNA, at an average concentration of 100 ng/μl, is loaded into the open capillary printing element by a high-speed robotic apparatus. The apparatus then deposits about 5 nl of array element sample per slide.

Microarrays are UV-crosslinked using a STRATALINKER UV-crosslinker (Stratagene). Microarrays are washed at room temperature once in 0.2% SDS and three times in distilled water. Non-specific binding sites are blocked by incubation of microarrays in 0.2% casein in phosphate buffered saline (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) for 30 minutes at 60°C followed by washes in 0.2% SDS and distilled water as before.

Hybridization

Hybridization reactions contain 9 µl of sample mixture consisting of 0.2 µg each of Cy3 and Cy5 labeled cDNA synthesis products in 5X SSC, 0.2% SDS hybridization buffer. The sample mixture is heated to 65°C for 5 minutes and is aliquoted onto the microarray surface and covered with an 1.8 cm^2 coverslip. The arrays are transferred to a waterproof chamber having a cavity just slightly larger than a microscope slide. The chamber is kept at 100% humidity internally by the addition of 140 µl of 5X SSC in a corner of the chamber. The chamber containing the arrays is incubated for about 6.5 hours at 60°C. The arrays are washed for 10 min at 45°C in a first wash buffer (1X SSC, 0.1% SDS), three times for 10 minutes each at 45°C in a second wash buffer (0.1X SSC), and dried.

Detection

Reporter-labeled hybridization complexes are detected with a microscope equipped with an Innova 70 mixed gas 10 W laser (Coherent, Inc., Santa Clara CA) capable of generating spectral lines at 488 nm for excitation of Cy3 and at 632 nm for excitation of Cy5. The excitation laser light is focused on the array using a 20X microscope objective (Nikon, Inc., Melville NY). The slide containing the array is placed on a computer-controlled X-Y stage on the microscope and raster-scanned past the objective. The 1.8 cm x 1.8 cm array used in the present example is scanned with a resolution of 20 micrometers.

In two separate scans, a mixed gas multiline laser excites the two fluorophores sequentially. Emitted light is split, based on wavelength, into two photomultiplier tube detectors (PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ) corresponding to the two fluorophores. Appropriate filters positioned between the array and the photomultiplier tubes are used to filter the signals. The emission maxima of the fluorophores used are 565 nm for Cy3 and 650 nm for Cy5. Each array is typically scanned twice, one scan per fluorophore using the appropriate filters at the laser source, although the apparatus is capable of recording the spectra from both fluorophores simultaneously.

The sensitivity of the scans is typically calibrated using the signal intensity generated by a cDNA control species added to the sample mixture at a known concentration. A specific location on the array contains a complementary DNA sequence, allowing the intensity of the signal at that location to be correlated with a weight ratio of hybridizing species of 1:100,000. When two samples from different sources (e.g., representing test and control cells), each labeled with a different fluorophore, are hybridized to a single array for the purpose of identifying genes that are differentially expressed, the calibration is done by labeling samples of the calibrating cDNA with the two fluorophores and adding identical amounts of each to the hybridization mixture.

The output of the photomultiplier tube is digitized using a 12-bit RTI-835H analog-to-digital

(A/D) conversion board (Analog Devices, Inc., Norwood MA) installed in an IBM-compatible PC computer. The digitized data are displayed as an image where the signal intensity is mapped using a linear 20-color transformation to a pseudocolor scale ranging from blue (low signal) to red (high signal). The data is also analyzed quantitatively. Where two different fluorophores are excited and measured simultaneously, the data are first corrected for optical crosstalk (due to overlapping emission spectra) between the fluorophores using each fluorophore's emission spectrum.

A grid is superimposed over the fluorescence signal image such that the signal from each spot is centered in each element of the grid. The fluorescence signal within each element is then integrated to obtain a numerical value corresponding to the average intensity of the signal. The software used for signal analysis is the GEMTOOLS gene expression analysis program (Incyte).

XI. Complementary Polynucleotides

Sequences complementary to the SRP-encoding sequences, or any parts thereof, are used to detect, decrease, or inhibit expression of naturally occurring SRP. Although use of oligonucleotides comprising from about 15 to 30 base pairs is described, essentially the same procedure is used with smaller or with larger sequence fragments. Appropriate oligonucleotides are designed using OLIGO 4.06 software (National Biosciences) and the coding sequence of SRP. To inhibit transcription, a complementary oligonucleotide is designed from the most unique 5' sequence and used to prevent promoter binding to the coding sequence. To inhibit translation, a complementary oligonucleotide is designed to prevent ribosomal binding to the SRP-encoding transcript.

XII. Expression of SRP

Expression and purification of SRP is achieved using bacterial or virus-based expression systems. For expression of SRP in bacteria, cDNA is subcloned into an appropriate vector containing an antibiotic resistance gene and an inducible promoter that directs high levels of cDNA transcription. Examples of such promoters include, but are not limited to, the *trp-lac* (*tac*) hybrid promoter and the T5 or T7 bacteriophage promoter in conjunction with the *lac* operator regulatory element. Recombinant vectors are transformed into suitable bacterial hosts, e.g., BL21(DE3). Antibiotic resistant bacteria express SRP upon induction with isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Expression of SRP in eukaryotic cells is achieved by infecting insect or mammalian cell lines with recombinant Autographica californica nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV), commonly known as baculovirus. The nonessential polyhedrin gene of baculovirus is replaced with cDNA encoding SRP by either homologous recombination or bacterial-mediated transposition involving transfer plasmid intermediates. Viral infectivity is maintained and the strong polyhedrin promoter drives high levels of cDNA transcription. Recombinant baculovirus is used to infect Spodoptera frugiperda (Sf9) insect cells in most cases, or human hepatocytes, in some cases. Infection of the latter requires additional genetic modifications to baculovirus. (See Engelhard, E.K. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

91:3224-3227; Sandig, V. et al. (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.)

In most expression systems, SRP is synthesized as a fusion protein with, e.g., glutathione S-transferase (GST) or a peptide epitope tag, such as FLAG or 6-His, permitting rapid, single-step, affinity-based purification of recombinant fusion protein from crude cell lysates. GST, a 26-kilodalton enzyme from Schistosoma japonicum, enables the purification of fusion proteins on immobilized glutathione under conditions that maintain protein activity and antigenicity (Amersham Pharmacia Biotech). Following purification, the GST moiety can be proteolytically cleaved from SRP at specifically engineered sites. FLAG, an 8-amino acid peptide, enables immunoaffinity purification using commercially available monoclonal and polyclonal anti-FLAG antibodies (Eastman Kodak). 6-His, a stretch of six consecutive histidine residues, enables purification on metal-chelate resins (QIAGEN). Methods for protein expression and purification are discussed in Ausubel (1995, supra, ch. 10 and 16). Purified SRP obtained by these methods can be used directly in the assays shown in Examples XVI, XVII, and XVIII, where applicable.

XIII. Functional Assays

SRP function is assessed by expressing the sequences encoding SRP at physiologically elevated levels in mammalian cell culture systems. cDNA is subcloned into a mammalian expression vector containing a strong promoter that drives high levels of cDNA expression. Vectors of choice include PCMV SPORT (Life Technologies) and PCR3.1 (Invitrogen, Carlsbad CA), both of which contain the cytomegalovirus promoter. 5-10 μg of recombinant vector are transiently transfected into a human cell line, for example, an endothelial or hematopoietic cell line, using either liposome formulations or electroporation. 1-2 μg of an additional plasmid containing sequences encoding a marker protein are co-transfected. Expression of a marker protein provides a means to distinguish transfected cells from nontransfected cells and is a reliable predictor of cDNA expression from the recombinant vector. Marker proteins of choice include, e.g., Green Fluorescent Protein (GFP; Clontech), CD64, or a CD64-GFP fusion protein. Flow cytometry (FCM), an automated, laser optics-based technique, is used to identify transfected cells expressing GFP or CD64-GFP and to evaluate the apoptotic state of the cells and other cellular properties. FCM detects and quantifies the uptake of fluorescent molecules that diagnose events preceding or coincident with cell death. These events include changes in nuclear DNA content as measured by staining of DNA with propidium iodide; changes in cell size and granularity as measured by forward light scatter and 90 degree side light scatter; down-regulation of DNA synthesis as measured by decrease in bromodeoxyuridine uptake; alterations in expression of cell surface and intracellular proteins as measured by reactivity with specific antibodies; and alterations in plasma membrane composition as measured by the binding of fluorescein-conjugated Annexin V protein to the cell surface. Methods in flow cytometry are discussed in Ormerod, M.G. (1994) Flow Cytometry, Oxford, New York NY.

The influence of SRP on gene expression can be assessed using highly purified populations of cells transfected with sequences encoding SRP and either CD64 or CD64-GFP. CD64 and CD64-GFP are expressed on the surface of transfected cells and bind to conserved regions of human immunoglobulin G (IgG). Transfected cells are efficiently separated from nontransfected cells using magnetic beads coated with either human IgG or antibody against CD64 (DYNAL, Lake Success NY). mRNA can be purified from the cells using methods well known by those of skill in the art. Expression of mRNA encoding SRP and other genes of interest can be analyzed by northern analysis or microarray techniques.

XIV. Production of SRP Specific Antibodies

SRP substantially purified using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE; see, e.g., Harrington, M.G. (1990) Methods Enzymol. 182:488-495), or other purification techniques, is used to immunize rabbits and to produce antibodies using standard protocols.

Alternatively, the SRP amino acid sequence is analyzed using LASERGENE software (DNASTAR) to determine regions of high immunogenicity, and a corresponding oligopeptide is synthesized and used to raise antibodies by means known to those of skill in the art. Methods for selection of appropriate epitopes, such as those near the C-terminus or in hydrophilic regions are well described in the art. (See, e.g., Ausubel, 1995, supra, ch. 11.)

Typically, oligopeptides of about 15 residues in length are synthesized using an ABI 431A peptide synthesizer (Applied Biosystems) using FMOC chemistry and coupled to KLH (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) by reaction with N-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS) to increase immunogenicity. (See, e.g., Ausubel, 1995, supra.) Rabbits are immunized with the oligopeptide-KLH complex in complete Freund's adjuvant. Resulting antisera are tested for antipeptide and anti-SRP activity by, for example, binding the peptide or SRP to a substrate, blocking with 1% BSA, reacting with rabbit antisera, washing, and reacting with radio-iodinated goat anti-rabbit IgG.

XV. Purification of Naturally Occurring SRP Using Specific Antibodies

Naturally occurring or recombinant SRP is substantially purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for SRP. An immunoaffinity column is constructed by covalently coupling anti-SRP antibody to an activated chromatographic resin, such as CNBr-activated SEPHAROSE (Amersham Pharmacia Biotech). After the coupling, the resin is blocked and washed according to the manufacturer's instructions.

Media containing SRP are passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of SRP (e.g., high ionic strength buffers in the presence of detergent). The column is eluted under conditions that disrupt antibody/SRP binding (e.g., a buffer of pH 2 to pH 3, or a high concentration of a chaotrope, such as urea or thiocyanate

ion), and SRP is collected.

XVI. Identification of Molecules Which Interact with SRP

SRP, or biologically active fragments thereof, are labeled with ^{125}I Bolton-Hunter reagent. (See, e.g., Bolton A.E. and W.M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529-539.) Candidate molecules previously arrayed in the wells of a multi-well plate are incubated with the labeled SRP, washed, and any wells with labeled SRP complex are assayed. Data obtained using different concentrations of SRP are used to calculate values for the number, affinity, and association of SRP with the candidate molecules.

Alternatively, molecules interacting with SRP are analyzed using the yeast two-hybrid system as described in Fields, S. and O. Song (1989) Nature 340:245-246, or using commercially available kits based on the two-hybrid system, such as the MATCHMAKER system (Clontech).

SRP may also be used in the PATHCALLING process (CuraGen Corp., New Haven CT) which employs the yeast two-hybrid system in a high-throughput manner to determine all interactions between the proteins encoded by two large libraries of genes (Nandabalan, K. et al. (2000) U.S. Patent No. 6,057,101).

XVII. Demonstration of SRP Activity

SRP activity is determined by measuring the enzyme catalyzed conjugation of GSH with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), a common substrate for most GSTs. SRP is incubated with 1 mM CDNB and 2.5 mM GSH together in 0.1M potassium phosphate buffer, pH 6.5, at 25 °C. The conjugation reaction is measured by the change in absorbance at 340 nm using an ultraviolet spectrophotometer. Enzyme activity is proportional to the change in absorbance at 340 nm.

In the alternative, SRP activity is measured based upon the increase in extinction coefficient of NADH coenzyme at 340 nm for the measurement of oxidation activity, or the decrease in extinction coefficient of NADH coenzyme at 340 nm for the measurement of reduction activity (Dalziel, K. (1963) J. Biol. Chem. 238:2850-2858). One of the following substrates may be used: 3-phosphoglycerate, hydroxypyruvate, ethanol, acetaldehyde, glycine, or hypotaurine. The reaction mixture contains 1-2 mg/ml (OR), 15 mM substrate, 2.4 mM NAD^+ or 2.0 mM NADH, in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.1 (NAD^+, oxidation reaction) or 0.1 M Na_2HPO_4 buffer, pH 7.4 (NADH, reduction reaction) in a total volume of 0.1 ml. Changes in absorbance at 340 nm (A_{340}) are measured at ambient temperature using a recording spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Pleasanton CA). The amount of NADH is stoichiometrically equivalent to the amount of substrate initially present, and the change in A_{340} is a direct measure of the amount of NADH produced; ΔA_{340} = 6620[NADH].

XVIII. Plasmapheresis of a Patient's Blood to Remove Toxins

SRP is used to purify a patient's blood after exposure to a chemical toxin. In this case, rather than administering a pharmaceutical composition of SRP to the patient, the toxin is removed from the blood by plasmapheresis in a manner similar to that used for kidney dialysis. SRP is stabilized in a mini-filtration column and the patient's plasma is passed through the column where the toxin is removed by binding to SRP before the plasma is returned to the patient.

Various modifications and variations of the described methods and systems of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with certain embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in molecular biology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

Table 1

Incyte Project ID	Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Polynucleotide ID
2457018	1	2457018CD1	4	2457018CB1
4907793	2	4907793CD1	5	4907793CB1
888992	3	888992CD1	6	888992CB1

Table 2

Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte polypeptide ID	GenBank ID NO:	Probability Score	GenBank Homolog
2	4907793CD1	g7331888	1.50E-123	Contains similarity to Mycoplasma genitalium glycerol-3-phospate dehydrogenase (SW:P47285) [Caenorhabditis elegans] The C. elegans Sequencing Consortium (1998) Science 282:2012-2018
3	888992CD1	g6018392	5.40E-74	Similar to Thioredoxins; cDNA EST yk491h3.5 comes from this gene [Caenorhabditis elegans] The C. elegans Sequencing Consortium (1998) Science 282:2012-2018
		g12654285	0	Similar to peptide N-glycanase homolog (S.cerevisiae) [Homo sapiens]

Table 3

SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
1	2457018CD1	71	T39 S43		Histidinol dehydrogenase signature: A14-P70	ProfileScan
					Signal cleavage: M1-G17	SPScan
2	4907793CD1	463	S31 S47 S63 S107 S130 T215 Y238 T245 S263 T316 S344 T381 T393	N364	FAD-DEPENDENT GLYCEROL-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE DM08855|P13032|6-270: T46-L288	BLAST-DOMO
					CONSERVED GLYCEROL3PHOSPHATE DEHYDROGENASE GLPA ALPHA&BP TRANSMEMBRANE PD011273: F49-V161	BLAST-PRODOM
					Similarity to ganglion mother cells (GMC) oxidoreductases: BL00623A: D50-I68; Q253-T273; V303-L325	BLIMPS-BLOCKS
					DbsH/CQ6 monooxygenase protein: BL01304A: D50-S63	BLIMPS-PRINTS
					flavin-containing rat monoamine oxidase: PR00757A: D50-I69, V96-Q115	BLIMPS-PRINTS
					DIMETHYLANILINE MONOOXYGENASE [N-OXIDE FORMING] 3 (HEPATIC FLAVIN-CONTAINING MONO-OXYGENASE 3; FMO 3) (DIMETHYL-ANILINE OXIDASE 3): PR00370A: D50-R65	BLIMPS-PRINTS
					FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase: PR01001A: P49-L61, K81-M93	BLIMPS-PRINTS
					Peptide reductase protein: PD018888A: A375-P390	BLIMPS-PRODOM
					RGD (cell surface receptor domain): R282-D284	MOTIFS
					Signal cleavage: M1-A64	SPScan

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
3	6889920D1	654	T27 T37 Y51 S53 S62 S94 S110 S111 S116 S119 S224 S287 Y282 S289 S380 S515 S602 S619 S636 S207 S374 T388 S392 S446 T449 T479 S552 S568	N117 N222 N511	Transglutaminase-like superfamily: T304-C355 RGD (Cell surface receptor domain): R620-D622 Signal cleavage: M1-A13	HMMER-PFAM MOTIFS SPScan

Table 4

Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Polynucleotide ID	Sequence Length	Selected Fragments	Sequence Fragments	5' Position	3' Position
4	2457018CB1	2305	1-131, 2170-2305, 1082-1143	6709408F8 (HEAADIR01)	1533	2286
				726028GH1 (UTRTMC01)	1	494
				1313086F6 (BLADTUT02)	878	1473
				5742422R9 (LUNGNOT03)	1094	1617
				2457018F6 (ENDANOT01)	449	1066
				6121238F6 (MENDTUN03)	1654	2305
				2330732F6 (COLNNOT11)	488	1075
5	4907193CB1	1742	872-1018	7079063JV1	1125	1629
				7078736V1	1163	1742
				7078952V1	556	1068
				7078169V1	952	1570
				7078897V1	412	1049
				4216786F6 (ADRENOT15)	1	488
6	888992CB1	2187	921-942	7071560V1	701	1239
				6597709H1 (ARTANOT06)	1300	2025
				4264406R6 (BLADNOT01)	1210	1758
				6592336H1 (UTRDTT14)	1581	2187
				2604204F6 (LUNGTUT07)	1	539
				4761979F6 (PLACNOT05)	513	1109

Table 5

Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Project ID	Representative Library
4	2457018CB1	COLNNOT16
5	4907793CB1	ADRENOT15
6	888992CB1	BRAITUT08

Table 6

Library	Vector	Library Description
ADRENOT15	pINCY	Library was constructed using RNA isolated from adrenal tissue removed from a Caucasian female fetus, who died from anencephalus after 16-weeks' gestation.
BRAITUT08	pINCY	Library was constructed using RNA isolated from brain tumor tissue removed from the left frontal lobe of a 47-year-old Caucasian male during excision of cerebral meningeal tissue. Pathology indicated grade 4 fibrillary astrocytoma with focal tumoral radionecrosis. Patient history included cerebrovascular disease, deficiency anemia, hyperlipidemia, epilepsy, and tobacco use. Family history included cerebrovascular disease and a malignant prostate neoplasm.
COLANOT16	pINCY	Library was constructed using RNA isolated from sigmoid colon tissue removed from a 62-year-old Caucasian male during a sigmoidectomy and permanent colostomy.

Table 7

Program	Description	Reference	Parameter Threshold
ABI FACTURA	A program that removes vector sequences and masks ambiguous bases in nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	A Fast Data Finder useful in comparing and annotating amino acid or nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	Mismatch <50%
ABI AutoAssembler	A program that assembles nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	A Basic Local Alignment Search Tool useful in sequence similarity search for amino acid and nucleic acid sequences. BLAST includes five functions: blastp, blastn, blastx, tblastn, and tblastx.	Altschul, S.F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	*ESTs*: Probability value= 1.0E-8 or less *Full Length sequences*: Probability value= 1.0E-10 or less
FASTA	A Pearson and Lipman algorithm that searches for similarity between a query sequence and a group of sequences of the same type. FASTA comprises as least five functions: fasta, tfasta, fastx, tfastx, and ssearch.	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad Sci. USA 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183:63-98; and Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	*ESTs*: fasta E value=1.06E-6 *Assembled ESTs*: fasta Identity= 95% or greater and Match length=200 bases or greater; fastx E value=1.0E-8 or less *Full Length sequences*: fastx score=100 or greater
BLIMPS	A BLocks IMProved Searcher that matches a sequence against those in BLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOM, and PFAM databases to search for gene families, sequence homology, and structural fingerprint regions.	Henikoff, S. and J.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572; Henikoff, J.G. and S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; and Attwood, T.K. et al. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	Probability value= 1.0E-3 or less
HMMER	An algorithm for searching a query sequence against hidden Markov model (HMM)-based databases of protein family consensus sequences, such as PFAM.	Krogh, A. et al. (1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. et al. (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. et al. (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	*PFAM hits*: Probability value= 1.0E-3 or less *Signal peptide hits*: Score= 0 or greater

Table 7 (cont.)

Program	Description	Reference	Parameter Threshold
ProfileScan	An algorithm that searches for structural and sequence motifs in protein sequences that match sequence patterns defined in Prosite.	Gribskov, M. et al. (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. et al. (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	Normalized quality score≥GCG-specified "HIGH" value for that particular Prosite motif. Generally, score=1.4-2.1.
Pmod	A base-calling algorithm that examines automated sequencer traces with high sensitivity and probability.	Ewing, B. et al. (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Prep	A Phils Revised Assembly Program including SWAT and CrossMatch, programs based on efficient implementation of the Smith-Waterman algorithm, useful in searching sequence homology and assembling DNA sequences.	Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; and Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	Score=120 or greater; Match length=56 or greater
Consed	A graphical tool for viewing and editing Prep assemblies.	Gordon, D. et al. (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	A weight matrix analysis program that scans protein sequences for the presence of secretory signal peptides.	Nielson, H. et al. (1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. and S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	Score=3.5 or greater
TMAP	A program that uses weight matrices to delineate transmembrane segments on protein sequences and determine orientation.	Persson, B. and P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. and P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	A program that uses a hidden Markov model (HMM) to delineate transmembrane segments on protein sequences and determine orientation.	Sonnhammer, E.L. et al. (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow et al., eds., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, pp. 175-182.	
Motifs	A program that searches amino acid sequences for patterns that matched those defined in Prosite.	Bairoch, A. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

What is claimed is:

1. An isolated polypeptide selected from the group consisting of:

a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3,

b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3,

c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, and

d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3.

2. An isolated polypeptide of claim 1 selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3.

3. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 1.

4. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 2.

5. An isolated polynucleotide of claim 4 selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6.

6. A recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a polynucleotide of claim 3.

7. A cell transformed with a recombinant polynucleotide of claim 6.

8. A transgenic organism comprising a recombinant polynucleotide of claim 6.

9. A method for producing a polypeptide of claim 1, the method comprising:

a) culturing a cell under conditions suitable for expression of the polypeptide, wherein said cell is transformed with a recombinant polynucleotide, and said recombinant polynucleotide comprises a promoter sequence operably linked to a polynucleotide encoding the polypeptide of claim 1, and

b) recovering the polypeptide so expressed.

10. An isolated antibody which specifically binds to a polypeptide of claim 1.

11. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of:

a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6,

b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4-6,

c) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of a),

d) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of b), and

e) an RNA equivalent of a)-d).

12. An isolated polynucleotide comprising at least 60 contiguous nucleotides of a polynucleotide of claim 11.

13. A method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide of claim 11, the method comprising:

a) hybridizing the sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides comprising a sequence complementary to said target polynucleotide in the sample, and which probe specifically hybridizes to said target polynucleotide, under conditions whereby a hybridization complex is formed between said probe and said target polynucleotide or fragments thereof, and

b) detecting the presence or absence of said hybridization complex, and, optionally, if present, the amount thereof.

14. A method of claim 13, wherein the probe comprises at least 60 contiguous nucleotides.

15. A method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide of claim 11, the method comprising:

a) amplifying said target polynucleotide or fragment thereof using polymerase chain reaction amplification, and

b) detecting the presence or absence of said amplified target polynucleotide or fragment thereof, and, optionally, if present, the amount thereof.

16. A composition comprising a polypeptide of claim 1 and a pharmaceutically acceptable excipient.

17. A composition of claim 16, wherein the polypeptide has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3.

18. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional SRP, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition of claim 16.

19. A method for screening a compound for effectiveness as an agonist of a polypeptide of claim 1, the method comprising:

a) exposing a sample comprising a polypeptide of claim 1 to a compound, and

b) detecting agonist activity in the sample.

20. A composition comprising an agonist compound identified by a method of claim 19 and a pharmaceutically acceptable excipient.

21. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional SRP, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition of claim 20.

22. A method for screening a compound for effectiveness as an antagonist of a polypeptide of claim 1, the method comprising:

a) exposing a sample comprising a polypeptide of claim 1 to a compound, and

b) detecting antagonist activity in the sample.

23. A composition comprising an antagonist compound identified by a method of claim 22 and a pharmaceutically acceptable excipient.

24. A method for treating a disease or condition associated with overexpression of functional SRP, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition of claim 23.

25. A method of screening for a compound that specifically binds to the polypeptide of claim 1, said method comprising the steps of:

a) combining the polypeptide of claim 1 with at least one test compound under suitable conditions, and

b) detecting binding of the polypeptide of claim 1 to the test compound, thereby identifying a

compound that specifically binds to the polypeptide of claim 1.

26. A method of screening for a compound that modulates the activity of the polypeptide of claim 1, said method comprising:

a) combining the polypeptide of claim 1 with at least one test compound under conditions permissive for the activity of the polypeptide of claim 1,

b) assessing the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound, and

c) comparing the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound with the activity of the polypeptide of claim 1 in the absence of the test compound, wherein a change in the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of the polypeptide of claim 1.

27. A method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a target polynucleotide, wherein said target polynucleotide comprises a sequence of claim 5, the method comprising:

a) exposing a sample comprising the target polynucleotide to a compound, under conditions suitable for the expression of the target polynucleotide,

b) detecting altered expression of the target polynucleotide, and

c) comparing the expression of the target polynucleotide in the presence of varying amounts of the compound and in the absence of the compound.

28. A method for assessing toxicity of a test compound, said method comprising:

a) treating a biological sample containing nucleic acids with the test compound;

b) hybridizing the nucleic acids of the treated biological sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides of a polynucleotide of claim 11 under conditions whereby a specific hybridization complex is formed between said probe and a target polynucleotide in the biological sample, said target polynucleotide comprising a polynucleotide sequence of a polynucleotide of claim 11 or fragment thereof;

c) quantifying the amount of hybridization complex; and

d) comparing the amount of hybridization complex in the treated biological sample with the amount of hybridization complex in an untreated biological sample, wherein a difference in the amount of hybridization complex in the treated biological sample is indicative of toxicity of the test compound.

29. A diagnostic test for a condition or disease associated with the expression of SRP in a biological sample comprising the steps of:

a) combining the biological sample with an antibody of claim 10, under conditions suitable for the antibody to bind the polypeptide and form an antibody:polypeptide complex; and

b) detecting the complex, wherein the presence of the complex correlates with the presence of the polypeptide in the biological sample.

30. The antibody of claim 10, wherein the antibody is:

a) a chimeric antibody,

b) a single chain antibody,

c) a Fab fragment,

d) a $F(ab')_2$ fragment, or

e) a humanized antibody.

31. A composition comprising an antibody of claim 10 and an acceptable excipient.

32. A method of diagnosing a condition or disease associated with the expression of SRP in a subject, comprising administering to said subject an effective amount of the composition of claim 31.

33. A composition of claim 31, wherein the antibody is labeled.

34. A method of diagnosing a condition or disease associated with the expression of SRP in a subject, comprising administering to said subject an effective amount of the composition of claim 33.

35. A method of preparing a polyclonal antibody with the specificity of the antibody of claim 10 comprising:

a) immunizing an animal with a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an antibody response;

b) isolating antibodies from said animal; and

c) screening the isolated antibodies with the polypeptide, thereby identifying a polyclonal antibody which binds specifically to a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3.

36. An antibody produced by a method of claim 35.

37. A composition comprising the antibody of claim 36 and a suitable carrier.

38. A method of making a monoclonal antibody with the specificity of the antibody of claim 10 comprising:

a) immunizing an animal with a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an antibody response;

b) isolating antibody producing cells from the animal;

c) fusing the antibody producing cells with immortalized cells to form monoclonal antibody-producing hybridoma cells;

d) culturing the hybridoma cells; and

e) isolating from the culture monoclonal antibody which binds specifically to a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3.

39. A monoclonal antibody produced by a method of claim 38.

40. A composition comprising the antibody of claim 39 and a suitable carrier.

41. The antibody of claim 10, wherein the antibody is produced by screening a Fab expression library.

42. The antibody of claim 10, wherein the antibody is produced by screening a recombinant immunoglobulin library.

43. A method for detecting a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3 in a sample, comprising the steps of:

a) incubating the antibody of claim 10 with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the polypeptide; and

b) detecting specific binding, wherein specific binding indicates the presence of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3 in the sample.

44. A method of purifying a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3 from a sample, the method comprising:

a) incubating the antibody of claim 10 with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the polypeptide; and

b) separating the antibody from the sample and obtaining the purified polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-3.

45. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

46. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

47. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.

48. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:4.

49. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:5.

50. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:6.

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
LAL, Preeti
GANDHI, Ameena R.
YAO, Monique G.
NGUYEN, Danniel B.
TANG, Y. Tom
YUE, Henry

<120> SECRETED REDOX PROTEINS

<130> PF-0796 PCT

<140> To Be Assigned
<141> Herewith

<150> 60/213,957
<151> 2000-06-22

<160> 6
<170> PERL Program

<210> 1
<211> 71
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2457018CD1

<400> 1
Met His Ser Leu Phe Gly Asp Tyr Arg Ala Gln Met Glu Ala Glu
1 5 10 15
Trp Arg Glu Ala Leu Arg Ala Leu Arg Ala Ala Ala Tyr Ser Ala
20 25 30
Gln Val Gln Pro Val Asp Gly Ala Thr Arg Lys Lys Ser Gln Arg
35 40 45
Val Cys Arg Pro Arg Ser Ile Trp Arg Ala Lys Ala Thr Leu Asp
50 55 60
Met Pro Asp Glu Glu Phe Arg Phe Asn Phe Phe
65 70

<210> 2
<211> 463
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 4907793CD1

<400> 2
Met Val Pro Ala Leu Arg Tyr Leu Val Gly Ala Cys Gly Arg Ala
1 5 10 15
Arg Gly Leu Phe Ala Gly Gly Ser Pro Gly Ala Cys Gly Phe Ala
20 25 30
Ser Gly Arg Pro Arg Pro Leu Cys Gly Gly Ser Arg Ser Ala Ser
35 40 45
Thr Ser Ser Phe Asp Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ile Val Gly
50 55 60
Leu Ala Ser Ala Arg Ala Leu Ile Leu Arg His Pro Ser Leu Ser
65 70 75

```
Ile Gly Val Leu Glu Lys Glu Lys Asp Leu Ala Val His Gln Thr
                80                  85                  90
Gly His Asn Ser Gly Val Ile His Ser Gly Ile Tyr Tyr Lys Pro
                95                 100                 105
Glu Ser Leu Lys Ala Lys Leu Cys Val Gln Gly Ala Ala Leu Leu
               110                 115                 120
Tyr Glu Tyr Cys Gln Gln Lys Gly Ile Ser Tyr Lys Gln Cys Gly
               125                 130                 135
Lys Leu Ile Val Ala Val Glu Gln Glu Glu Ile Pro Arg Leu Gln
               140                 145                 150
Ala Leu Tyr Glu Lys Gly Leu Gln Asn Gly Val Pro Gly Leu Arg
               155                 160                 165
Leu Ile Gln Gln Glu Asp Ile Lys Lys Lys Glu Pro Tyr Cys Arg
               170                 175                 180
Gly Leu Met Ala Ile Asp Cys Pro His Thr Gly Ile Val Asp Tyr
               185                 190                 195
Arg Gln Val Ala Leu Ser Phe Ala Gln Asp Phe Gln Glu Ala Gly
               200                 205                 210
Gly Ser Val Leu Thr Asn Phe Glu Val Lys Gly Ile Glu Met Ala
               215                 220                 225
Lys Glu Ser Pro Ser Arg Ser Ile Asp Gly Met Gln Tyr Pro Ile
               230                 235                 240
Val Ile Lys Asn Thr Lys Gly Glu Glu Ile Arg Cys Gln Tyr Val
               245                 250                 255
Val Thr Cys Ala Gly Leu Tyr Ser Asp Arg Ile Ser Glu Leu Ser
               260                 265                 270
Gly Cys Thr Pro Asp Pro Arg Ile Val Pro Phe Arg Gly Asp Tyr
               275                 280                 285
Leu Leu Leu Lys Pro Glu Lys Cys Tyr Leu Val Lys Gly Asn Ile
               290                 295                 300
Tyr Pro Val Pro Asp Ser Arg Phe Pro Phe Leu Gly Val His Phe
               305                 310                 315
Thr Pro Arg Met Asp Gly Ser Ile Trp Leu Gly Pro Asn Ala Val
               320                 325                 330
Leu Ala Phe Lys Arg Glu Gly Tyr Arg Pro Phe Asp Phe Ser Ala
               335                 340                 345
Thr Asp Val Met Asp Ile Ile Ile Asn Ser Gly Leu Ile Lys Leu
               350                 355                 360
Ala Ser Gln Asn Phe Ser Tyr Gly Val Thr Glu Met Tyr Lys Ala
               365                 370                 375
Cys Phe Leu Gly Ala Thr Val Lys Tyr Leu Gln Lys Phe Ile Pro
               380                 385                 390
Glu Ile Thr Ile Ser Asp Ile Leu Arg Gly Pro Ala Gly Val Arg
               395                 400                 405
Ala Gln Ala Leu Asp Arg Asp Gly Asn Leu Val Glu Asp Phe Val
               410                 415                 420
Phe Asp Ala Gly Val Gly Asp Ile Gly Asn Arg Ile Leu His Val
               425                 430                 435
Arg Asn Ala Pro Ser Pro Ala Ala Thr Ser Ser Ile Ala Ile Ser
               440                 445                 450
Gly Met Ile Ala Asp Glu Val Gln Gln Arg Phe Glu Leu
               455                 460

<210> 3
<211> 654
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 888992CD1

<400> 3
```

```
Met Ala Ala Ala Ala Leu Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ser Pro
 1               5                  10                  15
Ala Val Ala Glu Leu Cys Gln Asn Thr Pro Glu Thr Phe Leu Glu
            20                  25                  30
Ala Ser Lys Leu Leu Leu Thr Tyr Ala Asp Asn Ile Leu Arg Asn
        35                  40                  45
Pro Asn Asp Glu Lys Tyr Arg Ser Ile Arg Ile Gly Asn Thr Ala
    50                  55                  60
Phe Ser Thr Arg Leu Leu Pro Val Arg Gly Ala Val Glu Cys Leu
65                  70                  75                  80
Phe Glu Met Gly Phe Glu Glu Gly Glu Thr His Leu Ile Phe Pro
                85                  90                  95
Lys Lys Ala Ser Val Glu Gln Leu Gln Lys Ile Arg Asp Leu Ile
            100                 105                 110
Ala Ile Glu Arg Ser Ser Arg Leu Asp Gly Ser Asn Lys Ser His
        115                 120                 125
Lys Val Lys Ser Ser Gln Gln Pro Ala Ala Ser Thr Gln Leu Pro
    130                 135                 140
Thr Thr Pro Ser Ser Asn Pro Ser Gly Leu Asn Gln His Thr Arg
145                 150                 155                 160
Asp Arg Gln Gly Gln Ser Ser Asp Pro Pro Ser Ala Ser Thr Val
                165                 170                 175
Ala Ala Asp Ser Ala Ile Leu Glu Val Leu Gln Ser Asn Ile Gln
            180                 185                 190
His Val Leu Val Tyr Glu Asn Pro Ala Leu Gln Glu Lys Ala Leu
        195                 200                 205
Ala Cys Ile Pro Val Gln Glu Leu Lys Arg Lys Ser Gln Glu Lys
    210                 215                 220
Leu Ser Arg Ala Arg Lys Leu Asp Lys Gly Ile Asn Ile Ser Asp
225                 230                 235                 240
Glu Asp Phe Leu Leu Glu Leu Leu His Trp Phe Lys Glu Glu
                245                 250                 255
Phe Phe His Trp Val Asn Asn Val Leu Cys Ser Lys Cys Gly Gly
            260                 265                 270
Gln Thr Arg Ser Arg Asp Arg Ser Leu Leu Pro Ser Asp Asp Glu
        275                 280                 285
Leu Lys Trp Gly Ala Lys Glu Val Glu Asp His Tyr Cys Asp Ala
    290                 295                 300
Cys Gln Phe Ser Asn Arg Phe Pro Arg Tyr Asn Asn Pro Glu Lys
305                 310                 315                 320
Leu Leu Glu Thr Arg Cys Gly Arg Cys Gly Glu Trp Ala Asn Cys
                325                 330                 335
Phe Thr Leu Cys Cys Arg Ala Val Gly Phe Glu Ala Arg Tyr Val
            340                 345                 350
Trp Asp Tyr Thr Asp His Val Trp Thr Glu Val Tyr Ser Pro Ser
        355                 360                 365
Gln Gln Arg Trp Leu His Cys Asp Ala Cys Glu Asp Val Cys Asp
    370                 375                 380
Lys Pro Leu Leu Tyr Glu Ile Gly Trp Gly Lys Lys Leu Ser Tyr
385                 390                 395                 400
Val Ile Ala Phe Ser Lys Asp Glu Val Val Asp Val Thr Trp Arg
                405                 410                 415
Tyr Ser Cys Lys His Glu Glu Val Ile Ala Arg Arg Thr Lys Val
            420                 425                 430
Lys Glu Ala Leu Leu Arg Asp Thr Ile Asn Gly Leu Asn Lys Gln
        435                 440                 445
Arg Gln Leu Phe Leu Ser Glu Asn Arg Arg Lys Glu Leu Leu Gln
    450                 455                 460
Arg Ile Ile Val Glu Leu Val Glu Phe Ile Ser Pro Lys Thr Pro
465                 470                 475                 480
Lys Pro Gly Glu Leu Gly Gly Arg Ile Ser Gly Ser Val Ala Trp
                485                 490                 495
Arg Val Ala Arg Gly Glu Met Gly Leu Gln Arg Lys Glu Thr Leu
```

```
                470                 475                 480
Phe Ile Pro Cys Glu Asn Glu Lys Ile Ser Lys Gln Leu His Leu
                485                 490                 495
Cys Tyr Asn Ile Val Lys Asp Arg Tyr Val Arg Val Ser Asn Asn
                500                 505                 510
Asn Gln Thr Ile Ser Gly Trp Glu Asn Gly Val Trp Lys Met Glu
                515                 520                 525
Ser Ile Phe Arg Lys Val Glu Thr Asp Trp His Met Val Tyr Leu
                530                 535                 540
Ala Arg Lys Glu Gly Ser Ser Phe Ala Tyr Ile Ser Trp Lys Phe
                545                 550                 555
Glu Cys Gly Ser Val Gly Leu Lys Val Asp Ser Ile Ser Ile Arg
                560                 565                 570
Thr Ser Ser Gln Thr Phe Gln Thr Gly Thr Val Glu Trp Lys Leu
                575                 580                 585
Arg Ser Asp Thr Ala Gln Val Glu Leu Thr Gly Asp Asn Ser Leu
                590                 595                 600
His Ser Tyr Ala Asp Phe Ser Gly Ala Thr Glu Val Ile Leu Glu
                605                 610                 615
Ala Glu Leu Ser Arg Gly Asp Gly Asp Val Ala Trp Gln His Thr
                620                 625                 630
Gln Leu Phe Arg Gln Ser Leu Asn Asp His Glu Glu Asn Cys Leu
                635                 640                 645
Glu Ile Ile Ile Lys Phe Ser Asp Leu
                650
```

<210> 4
<211> 2305
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2457018CB1

<400> 4

```
ctctgcgccc cgcgtagttc cggtggcgac tgcggcgcat ggcggtgagc ggtgtggaga 60
agacgcgcgg gtggctgggc cttgcattgt tggcggctct cggtgacgct cgtgctaccc 120
ccctttctcc aggcctgggg acatcttgct ggggaggcag cggcggcccc aggcccgggt 180
actcctgcg cgtcccgcgg agcccggctt cccggcccag tttccagcgc ccggaatcct 240
tccactgtct gtctctgccc agagcaacct acgtgcagta acgctgactc cagagcgcac 300
ccgttgggcg atgaaggcgg cacagcgtcg aaaaaacaaa agaataagaa gaaaacgcgg 360
aacagggcct ctgtggcaaa tggaggcgag aaggcctcag agaaactcgc cccagaagaa 420
gttcccctaa gcgctgaggc ccaggcacaa cagttggccc aggaattggc ttggtgtgtg 480
gagcaactgg agctgggcct caagaggcag aaacccaccc cgaaacagaa agagcaggct 540
attggagcaa tccgaaccct gcgcagcaaa agaacgccct tgccccggaa gaggcagctg 600
atgcactcct tgtttggaga ctatagggct cagatggaag ccgaatggcg tgaggccctg 660
cgggctctca gagctgctgc ttattcagcc caggtgcaac ctgtagatgg agccaccaga 720
aagaagagcc aaagggtctg caggcctcgc tctatatgga gagccaaagc cactctggac 780
atgcctgatg aagagtttag gttcaatttc ttttagcgtc tccccgaacc tgaaacaatc 840
cccctcccct gcggtggtgt agcggtttgt tttgagtgca gagcctttac aggacttctg 900
ttgtcagaga accctggagt tggtctgtcc ctggctggtc caaggatttg tagctgttgt 960
gaaggtgtga gaccatcaga taggcaaaag accccgttcg ttttctgatg aaatgttctc 1020
tctttcagaa gagagagaga ggtgcattta gaaaatatgc aataaattga agtgagtgtt 1080
caaagtattg tagaggaat atgtactca gtctttagga ttagattaag tggctgttgg 1140
taacaaagat tagtggagaa gctgtataat cgtacactgg ttttcacttt tgaaaggaat 1200
cctgtcaaa tggtttagtg cttaatgctg ttatgtcatn ttgcctaat ctctatttt 1260
gataaaattg gataaggagt gaaagagtat gctgaccacc tatgttagag gaagtacaga 1320
agatgcaggg gtgtggtatc cctgggtcca gtcctcacc tggtaccttt gtgcatgttg 1380
cctcattcc tgagcaggta tcatcctcag ggaaccagca tggcacctac caggccaggc 1440
tctgttctta ggagcaagga gcttcttgcg ctaacagttc tggcctgaga cctggattga 1500
gccttggcag acttcttgtc taaatgttgg ccattcagtc tcaggcctc tgttccatgg 1560
aattgggaat ctccaggtga cctaatcctc attggtggct tgatgtttgc tggtatcttc 1620
```

caaactcagt tcccagacta gattgatacc tggagcccag ctgcctactc agcatttcca 1680
cttgggtgct tcataggcat ttcaaacctg atgtgtttaa aacacttgat taggctccgg 1740
ttttctttg gcttctgctt ttcagtgaat ggcatgactg cctatgtggg tggcaagcca 1800
cccaggtgcc gaggaaagag actgagggca cgagccgttc cagtataata aaatatataa 1860
aataagaaga gttatactag atctagatca tagacatgat tatatgtgag tatcattaat 1920
cattagttta tagcaattac tctttattcc aatattataa taatcctcac tctacaatca 1980
taacctagga aaaaccaggc catacagaga taggagccga ggggacatag tgcgaagtgg 2040
ccagaagaca agagtgtgag ccttctcttg tgcctggaca gggccaccag agggcttggt 2100
ctagcagtaa caccagtgtc tgggaagatg cctgttgcaa agtggaccat ggtctagcag 2160
tagcatcagt gtcaaggaaa aacacccact acttagcaga ctgggaaaag gagcctccct 2220
ttccccgggg ggaagtttag agaagactac tcctccnctc ttgtgggagg ggcctgacat 2280
caggtcaggc cgccgcagtt atcaa 2305

<210> 5
<211> 1742
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 4907793CB1

<400> 5
ggccgtggag ggtcaagtgg cttcttctga gcgctgaggg aggggagcgt gcgtagggga 60
tggtgccagc gctgcgttat ttggttggtg cctgcggacg ggcccgcggg cttttcgccg 120
gtggctcccc tggggcgtgc gggttcgcgt ctgggaggcc aagaccgctg tgtggaggta 180
gccgcagcgc cagcaccagc tcatttgata tagtcattgt tggtggcgga attgtggggc 240
ttgcctctgc cagagcactc atcctgcgac atccatcact ttctattggt gttctggaaa 300
aggagaaaga tttagctgtt caccagactg gacataacag tggtgtcata catagtggaa 360
tttattataa acctgagtct ctgaaagccs aattatgtgt acaaggtgca gccctcctct 420
atgagtactg tcagcaaaag gyaatttcct acaagcagtg tggcaagctt atagtagctg 480
ttgaacaaga agaaatttcc agacttcagg ccctatatga gaaaggcctc cagcatggty 540
tcccgggcct gaggcrgatc cagcaggagg atataaaaaa gaaggagcca tattgtaggg 600
gtctaatggc tattgattgt ccacatactg gcattgtgga ctatcggcag gtggctttgt 660
catttgccca ggatttccaa gcagcaggtg gctctgtctt gaccaatttt gaagtaaaag 720
gtattgaaat ggctaaagaa agtcctccaa gaagtataga tggaatgcaa tatccaattg 780
ttataaagca tacaaaggga gaggaaattc gatgtcagta tgttgtgaca tgtgcaggac 840
tttactcaga ccgtatttca gagttgagtg gctgcactcc tgatcctcga attgtaccat 900
tccgggagta ttacctgctt ttgaagccag aaaaatgtta tcttgtaaaa ggaaatattt 960
atccggtccc agatagccgg tttcctttcc taggagttca cttcacacca aggatggatg 1020
gcagtatttg gctagggcct aatgcagttc ttgcctttaa acgagagggt tacagaccct 1080
ttgacttcag tgccacagat gttatggata taattatcaa tagtggcttg attaaactgg 1140
catcccagaa tttttcctat ggagttactg aaatgtataa agcatgtttt cttggtgcaa 1200
cagtgaagta tcttcaaaaa ttcatccctg aaattactat cagtgatata cttaggggcc 1260
cagctggagt aagagcccag gccctggata gagatggaaa tctggtagaa gattttgtat 1320
ttgatgcagg agttggggat attggaaatc gcattcttca tgtgagaaat gcaccttctc 1380
ctgctgctac ttcttccatt gcaattcctg gaatgattgc agatgaagta caacaaagat 1440
ttgaattata aataatgaaa ggagctaggt atgcactgta atcttcatgt cagcaacaag 1500
aatgtactaa ttgcattctt taatttaaaa aatggttttt aaacttcgt tttaggtca 1560
aagataacca ctgcattgtt aaaatgatgt aacatagaaa taataatttt ctacaaaaat 1620
tagccaggcg tggtggcgca tgcctgtaat ctcagctact caggaggctg aggcaggaga 1680
atcaattgaa ccgagcagac ggaggtgagc tgagagctga gattgcacca ctgcactcca 1740
gc 1742

<210> 6
<211> 3187
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 888992CB1

<400> 6

```
gggcggcggc ggcgcccgct ggcgctcaag catggcggcg gcggcattgg gcagctcctc 60
aggctcggcg tccccggccg tggctgagct ctgccagaac accccggaga ccttttggga 120
ggcctccaag ctgctgctca cctatgctga caacatcctc agaaacccta atgatgaaaa 180
atatagatcc atccggattg gaaacacagc cttttctact agactcttgc ctgtcagagg 240
agctgttgaa tgtttatttg aaatgggctt tgaagaggga gaaacacatc tcatctttcc 300
taaaaaagct tcagtggagc agctgcaaaa aattcgtgac ctgattgcca tagagagaag 360
tagcagactg gatggctcaa ataagagcca caaagtaaag tcatctcagc aacctgcagc 420
cagtacccag cttcctacaa caccatcttc aaatcccagt gggttaaacc agcacacaag 480
gaaccgtcaa gggcagtcat cagatccacc atctgcttca acggttgctg ctgactcagc 540
cattctagaa gttcttcagt ccaacattca gcatgtgctg gtctatgaaa atcctgctct 600
tcaggagaaa gcgttggctt gtattccggt ccaagaacta aaaaggaaat cacaagaaaa 660
gttatcgaga gctagaaaat tggataaagg tatcaatata agtgatgagg attttctttt 720
gctggagctt ttgcactggt ttaaggaaga attttttcac tgggtgaata acgttttgtg 780
cagcaaatgt ggtggacaga ctaggtctag agatagatca ttactgccca gtgatgatga 840
gctgaagtgg ggtgcaaagg aagtggaaga tcattacngt gatgcctgcc agttcagcaa 900
tcgattccca agatataata accctgagaa acttttggaa acaagatgtg gacggtgtgg 960
cgagtgggcc aattgtttta cactgtgctg ccgagctgta gggtttgaag ctcgctatgt 1020
ttgggattac acagaccatg tctggacaga agtctattct ccttctcagc agcggtggct 1080
gcactgtgat gcatgtgaag atgtctgtga caagccactc ctttatgaaa taggatgggg 1140
caagaagctt tcctatgtca tagcattttc aaaagatgag gtagttgatg tcacttggcg 1200
atattcctgc aaacatgaag aggtgattgc cagaagaact aaggttaaag aagcattact 1260
tcgagacact attaatgggc ttaatcaagca gaggcaactg tttttgtcag aaaacagaag 1320
gaaagaactt ctccagagga taattgtgga gcttgttgaa tttatatctc ccaaaacccc 1380
taaacctgga gaacttgggg gaagaatatc tgggtcagtg gcttggagag tagcccgagg 1440
tgaaatgggt ctacagagaa aagaaacctt gtttattccc tgtgaaaatg agaagatttc 1500
taaacagctc caccttttgtt acaatattgt gaaagatcgt tatgttcgag tttcaaatca 1560
caatcaaacc atttctggat gggagaatgg cgtgtggaaa atggaatcta tattcagaaa 1620
agttgaaaca gactggcaca tggtatattt ggcccgaaag gaaggatcat ctttgctta 1680
tatttcctgg aagtttgagt gtgggtcagt tggcctaaaa gtagatagca tttctattag 1740
aacaagtagt caaactttc agactggaac agtagaatgg aaattgcgat ctgatacagc 1800
acaaglagaa ctgacaggcg ataacagtct tcactcctat gctgattttt ctggtgccac 1860
tgaagttatt ttggaagcag aattaagcag aggagatggt gatgtcgctt ggcaacacac 1920
ccagctgttt agacaaagct taaatgacca tgaagaaaat tgtttggaga taattataaa 1980
attcagtgac ctttgagaac ctgaacatta tagaaaagct ggcaataatc aaggacttac 2040
tgaagtagtc tgttggttca gtgcatgctt agttggcagt taccaccctg tgctagcata 2100
tttcttttgc tagctatcca tcatgtaacc ctcatgaaaa ttatctttat acgtggacta 2160
tnataaaata ttgaattaan aaaaaaa 2187
```

【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
27 December 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/098332 A3

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/53, 9/08, C07K 16/40, C12Q 1/68, G01N 33/577, 33/68, A01K 67/027

(21) International Application Number: PCT/US01/19930

(22) International Filing Date: 22 June 2001 (22.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/213,057 22 June 2000 (22.06.2000) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): INCYTE GENOMICS, INC. [US/US]; 3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): LAL, Preeti [IN/US]; P.O. Box 5142, Santa Clara, CA 95056 (US). GANDHI, Ameena, R. [US/US]; 837 Roble Avenue, #1, Menlo Park, CA 94025 (US). YAO, Monique, G. [US/US]; 111 Frederick Court, Mountain View, CA 94043 (US). NGUYEN, Danniel, B. [US/US]; 1403 Ridgewood Drive, San Jose, CA 94043 (US). TANG, Y., Tom [US/US]; 4230 Ranwick Court, San Jose, CA 95118 (US). YUE, Henry [US/US]; 826 Lois Avenue, Sunnyvale, CA 94087 (US).

(74) Agents: HAMLET-COX, Diana et al.; Incyte Genomics, Inc., 3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
26 September 2002

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 01/098332 A3

(54) Title: SECRETED REDOX PROTEINS

(57) Abstract: The invention provides human secreted redox proteins (SRP) and polynucleotides which identify and encode SRP. The invention also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists. The invention also provides methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of SRP.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/19930

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/53 C12N9/08 C07K16/40 C12Q1/68 G01N33/577
G01N33/68 A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C07K C12Q G01N A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
WPI Data, PAJ, CAB Data, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 00 55173 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;ROSEN CRAIG A (US); RUBEN STEVEN M (US)) 21 September 2000 (2000-09-21) SEQ ID No. 190;- claims 1-23 ---	3,12
X	DATABASE EMBL SEQUENCE DATABASE [Online] Hinxton, UK; 23 August 1999 (1999-08-23) "wq55b05.x1 NCI_CGAP_GC6 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2475153 3', mRNA sequence" XP002191395 EMBL Accession no. AI962696; abstract --- -/--	3,12

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document 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
26 February 2002	31 05 2002
Name and mailing address of the ISA: European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer: HORNIG H.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/19930

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL SEQUENCE DATABASE [Online] Hinxton, UK; 12 March 1999 (1999-03-12) A. QUESTERHOEFT ET AL.: "Homo sapiens mRNA; EST DKFZp564D2063_r1" XP002191396 EMBL Accession no. AL036688; abstract ---	3,12
A	SODERBERG ANITA ET AL: "Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: Presence in human plasma." CANCER RESEARCH, vol. 60, no. 8, April 2000 (2000-04), pages 2281-2289, XP002191393 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document ---	
A	GASDASKA PAMELA Y ET AL: "Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase." FEBS LETTERS, vol. 373, no. 1, 1995, pages 5-9, XP002191394 ISSN: 0014-5793 the whole document ---	
A	STATHAKIS PAUL ET AL: "Generation of angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin. Catalysis by a plasmin reductase secreted by cultured cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 33, 1997, pages 20641-20645, XP002191397 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/19930

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. [X] Claims Nos.: (20,21,23 and 24)-partially
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-44 (all partially); 45, 48 (completely)

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/US 01/19930

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 18,35 and 38 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
Although claim(s) 32 and 34 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: (20,21,23 and 24)-partially

Present claim 20, 21, 23 and 24 relate to a composition comprising an agonist and /or antagonist and a method for treating a disease, comprising administering to a patient in need of such treatment said agonist and/or antagonist without giving a true technical characterization. Moreover no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to antibodies, antisense molecules, ribozymes, polypeptides and nucleic acids, the structure which can be directly derived from SEQ ID Nos. 1 and 4.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International Application No. PCT/US 01/19930

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: (45,48)-completely, (1-44)-partially

An isolated polypeptide sequence of SEQ ID Nos. 1; an isolated polynucleotide sequence of SEQ ID No. 4 encoding said polypeptide; a cell transformed with saic polynucleotide sequence; a trangenic organsm comprising said polynucleotide sequence; a method for producing said polypeptide encoded by said polynucleotide sequence; an isolated polyclonal and/or monoclonal antibody which binds to said polypeptide sequence; a method for detecting a target polynucleotide sequence comprising SEQ ID No. 4; a composition comprising said polypeptide and a pharmaceutical acceptable excipient; a method for screening a compound for effectiveness as an agonist and/or antagonist of said polypeptide; a method for assessing toxicity of a test compound usinf said polynucleotide sequence; a diagnostic test for a condition or disease using said antibody; a method for detecting said polypeptide in a sample;

2. Claims: (46,49)-completely, (1-44)-partially

Idem as invention 1 but limited to SEQ ID Nos. 2 and 5;

3. Claims: (47,50)-completely, (1-44)-partially

Idem as invention 1 but limited to SEQ ID Nos. 3 and 6;

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/19930

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0055173 A	21-09-2000	AU	3395900 A	04-10-2000
		AU	3617600 A	04-10-2000
		AU	3617700 A	04-10-2000
		AU	3619400 A	04-10-2000
		AU	3619500 A	04-10-2000
		AU	3869400 A	04-10-2000
		EP	1168917 A2	09-01-2002
		EP	1165588 A1	02-01-2002
		EP	1169469 A1	09-01-2002
		EP	1165589 A1	02-01-2002
		EP	1159420 A1	05-12-2001
		EP	1163358 A1	19-12-2001
		WO	0055173 A1	21-09-2000
		WO	0055350 A1	21-09-2000
		WO	0055351 A1	21-09-2000
		WO	0055180 A2	21-09-2000
		WO	0055174 A1	21-09-2000
		WO	0055320 A1	21-09-2000
		US	2002039764 A1	04-04-2002
		US	2002055627 A1	09-05-2002
		US	2002052308 A1	02-05-2002
		US	2002044941 A1	18-04-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 3/04	Ａ６１Ｐ 3/08		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ 3/08	Ａ６１Ｐ 3/10		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ 3/10	Ａ６１Ｐ 5/38		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 5/38	Ａ６１Ｐ 7/00		
Ａ６１Ｐ 7/00	Ａ６１Ｐ 7/06		
Ａ６１Ｐ 7/06	Ａ６１Ｐ 9/02		
Ａ６１Ｐ 9/02	Ａ６１Ｐ 9/10		
Ａ６１Ｐ 9/10	Ａ６１Ｐ 9/10	１０１	
Ａ６１Ｐ 9/12	Ａ６１Ｐ 9/12		
Ａ６１Ｐ 11/00	Ａ６１Ｐ 11/00		
Ａ６１Ｐ 11/06	Ａ６１Ｐ 11/06		
Ａ６１Ｐ 17/00	Ａ６１Ｐ 17/00		
Ａ６１Ｐ 17/06	Ａ６１Ｐ 17/06		
Ａ６１Ｐ 19/00	Ａ６１Ｐ 19/00		
Ａ６１Ｐ 21/04	Ａ６１Ｐ 21/04		
Ａ６１Ｐ 25/00	Ａ６１Ｐ 25/00		
Ａ６１Ｐ 25/02	Ａ６１Ｐ 25/00	１０１	
Ａ６１Ｐ 25/04	Ａ６１Ｐ 25/02		
Ａ６１Ｐ 25/06	Ａ６１Ｐ 25/02	１０３	
Ａ６１Ｐ 25/08	Ａ６１Ｐ 25/04		
Ａ６１Ｐ 25/14	Ａ６１Ｐ 25/06		
Ａ６１Ｐ 25/16	Ａ６１Ｐ 25/08		
Ａ６１Ｐ 25/18	Ａ６１Ｐ 25/14		
Ａ６１Ｐ 25/20	Ａ６１Ｐ 25/16		
Ａ６１Ｐ 25/28	Ａ６１Ｐ 25/18		
Ａ６１Ｐ 27/02	Ａ６１Ｐ 25/20		
Ａ６１Ｐ 29/00	Ａ６１Ｐ 25/28		
Ａ６１Ｐ 31/12	Ａ６１Ｐ 27/02		
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 29/00		
Ａ６１Ｐ 35/02	Ａ６１Ｐ 31/12		
Ａ６１Ｐ 39/00	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 39/06	Ａ６１Ｐ 35/02		
Ａ６１Ｐ 43/00	Ａ６１Ｐ 39/00		
Ｃ０７Ｋ 14/47	Ａ６１Ｐ 39/06		
Ｃ０７Ｋ 16/18	Ａ６１Ｐ 43/00	１１１	
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ０７Ｋ 14/47		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ０７Ｋ 16/18		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｐ 21/08	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｃ１２Ｐ 21/08		
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	

G01N 33/566
C12N 5/00 A
A61K 37/50

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,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,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ガンディー、アミーナ・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４０２５・メンロパーク・＃１・ローブルアベニュー ８３７
(72)発明者 ヤオ、モニーク・ジー
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４０２３・マウンテンビュー・フレデリックコート １１１
(72)発明者 ニュエン、ダニエル・ビー
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４０４３・サンノゼ・リッジウッドドライブ １４０３
(72)発明者 タング、ワイ・トム
アメリカ合衆国カリフォルニア州９５１１８・サンノゼ・ランウィックコート ４２３０
(72)発明者 ユエ、ヘンリー
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４０８７・サニーベイル・ルイスアベニュー ８２６

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37 DA77
FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04 DA02 EA02 GA11 HA01 HA12
HA15
4B063 QA18 QQ42 QQ52 QQ79 QR56 QR62 QR82 QS25 QS34 QS39
4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA01 AA17 BA01 BA02 BA08 BA20 BA22 DC23 DC50 MA01
NA14 ZA011 ZA021 ZA051 ZA061 ZA081 ZA151 ZA161 ZA181 ZA201
ZA221 ZA241 ZA331 ZA361 ZA421 ZA451 ZA511 ZA551 ZA591 ZA701
ZA751 ZA811 ZA891 ZA941 ZA961 ZB261 ZB271 ZC031 ZC081 ZC192
ZC202 ZC351 ZC371 ZC412
4C085 AA03 BB11
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA20 EA21
EA27 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	分泌性氧化还原蛋白		
公开(公告)号	JP2004512018A	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2002504287	申请日	2001-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	ラルプリーティ ガンディーアミーナアール ヤオモニークジー ニュエンダニエルビー タングワイトム ユエヘンリー		
发明人	ラル、プリーティ ガンディー、アミーナ·アール ヤオ、モニーク·ジー ニュエン、ダニエル·ビー タング、ワイ·トム ユエ、ヘンリー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/44 A61K39/00 A61K45/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/08 A61P3/10 A61P5/38 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/02 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/04 A61P25/06 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P39/00 A61P39/06 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/02 C12N9/04 C12N15/09 C12N15/53 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/04 A61P25/06 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 C12N9/0006 C12N9/0036 C12Y101/01008 C12Y101/01023 C12Y108/01008		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K45/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/08 A61P3/10 A61P5/38 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/02 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/00.101 A61P25/02 A61P25/02.103 A61P25/04 A61P25/06 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P39/00 A61P39/06 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/50		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA20 4C084/BA22 4C084/DC23 4C084/DC50 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA051 4C084/ZA061 4C084/ZA081 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C084/ZA181 4C084/ZA201 4C084/ZA221 4C084/ZA241 4C084/ZA331 4C084/ZA361 4C084/ZA421 4C084/ZA451 4C084/ZA511 4C084/ZA551 4C084/ZA591 4C084/ZA701 4C084/ZA751 4C084/ZA811		

	4C084/ZA891 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZC031 4C084/ZC081 4C084/ZC192 4C084/ZC202 4C084/ZC351 4C084/ZC371 4C084/ZC412 4C085/AA03 4C085/BB11 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA21 4H045/EA27 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74
优先权	60/213957 2000-06-22 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明提供了人分泌的氧化还原蛋白（SRP）和鉴定和编码SRP的多核苷酸。 本发明还提供表达载体，宿主细胞，抗体，激动剂和拮抗剂。 本发明还提供了用于诊断，治疗或预防与SRP异常表达有关的疾病的方法。