

(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2004-512836

(P2004-512836A)

(43) 公表日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/43	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/04	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 262 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-539487 (P2002-539487)	(71) 出願人	391015708
(86) (22) 出願日	平成13年10月29日 (2001.10.29)		ブリストル-マイヤーズ スクイブ カン
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月30日 (2003.4.30)		パニー
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/046559		B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B
(87) 国際公開番号	W02002/036741		B C O M P A N Y
(87) 国際公開日	平成14年5月10日 (2002.5.10)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 1
(31) 優先権主張番号	60/244, 688		5 4 ニューヨーク パーク アベニュー
(32) 優先日	平成12年10月30日 (2000.10.30)		3 4 5
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	60/308, 706		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成13年7月30日 (2001.7.30)	(74) 代理人	100098925
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 上田 敏夫
		(74) 代理人	100126778
			弁理士 品川 永敏
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ユビキチン結合酵素関連活性化ヒトTリンパ球由来タンパク質をコードするポリヌクレオチド

(57) 【要約】

本発明は、活性化Tリンパ球から単離、同定された新たに発見されたユビキチン結合酵素相同体（本明細書ではR A T L 1 d 6と呼ぶ）およびそのコーディングポリヌクレオチドに関する。本発明の新たに発見されたポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの発現ベクター、宿主細胞、アゴニスト、アンタゴニスト、アンチセンス分子、および活性を伴う抗体、ならびに使用について記載する。R A T L 1 d 6 ユビキチン結合酵素ポリペプチドの発現に関連した障害の治療、診断、予防、およびスクリーニング法について記載する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むユビキチン結合酵素相同体をコードする単離されたポリヌクレオチドまたはその断片、

(b) 配列番号 1 を含む単離されたポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 2 の配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するユビキチン結合酵素アミノ酸配列をコードする単離されたポリヌクレオチドまたはその断片、

(d) ATCC 受託番号 PTA - 3745 の核酸配列を有する単離されたポリヌクレオチド、

(e) 配列番号 1 のヌクレオチド 517 ~ 1782 をコードする核酸配列を有する単離されたポリヌクレオチド（ここで、該ヌクレオチドは出発コドンを除く配列番号 2 のポリペプチドをコードする）、 10

(f) 配列番号 1 のヌクレオチド 520 ~ 1782 の核酸配列を有する単離されたポリヌクレオチド（ここで、該ヌクレオチドは出発コドンを含む配列番号 2 のポリペプチドをコードする）、

(g) (a) ~ (f) のポリヌクレオチドと完全に相補的な単離されたポリヌクレオチドからなる群から選ばれる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

請求項 1 記載のポリヌクレオチドを含むハイブリダイゼーションプローブ。

【請求項 3】

請求項 1 記載の単離されたポリヌクレオチドを含む組成物。 20

【請求項 4】

請求項 1 記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 5】

請求項 4 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 6】

(a) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するユビキチン結合酵素ポリペプチド、

(b) 配列番号 2 に記載の配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むユビキチン結合酵素ポリペプチド、

(c) アミノ酸配列が配列番号 2 と保存的置換によってのみ異なる (a) のポリペプチド 30

(d) アミノ酸配列が配列番号 2 に記載の配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する (a) のポリペプチド、

(e) ATCC 受託番号 PTA - 3745 の核酸配列によりコードされる単離されたユビキチン結合酵素ポリペプチド、

(f) 配列番号 2 のアミノ酸 2 ~ 422 のアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチド（ここで、該アミノ酸は出発メチオニンを除く配列番号 2 のポリペプチドをコードする）

(g) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 422 のアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチド（ここで、該アミノ酸配列は出発メチオニンを含む配列番号 2 のポリペプチドをコードする）、 40

(h) 配列番号 17 に記載の貫膜ドメイン領域を有する単離されたポリペプチド、および
(i) (a) ~ (h) のいずれかに記載のユビキチン結合酵素ポリペプチドの実質的に精製された断片からなる群から選ばれる実質的に精製されたユビキチン結合 (UBC) 酵素ポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号 2 に記載の配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列およびヒト免疫グロブリンタンパク質の Fc 部分のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む実質的に精製されたユビキチン結合酵素融合タンパク質。

【請求項 8】

請求項 6 記載のポリペプチドまたはその機能的部分、および医薬的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 7 記載の融合タンパク質、および医薬的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 6 記載のポリペプチドまたはその抗原性エピトープと特異的に結合する精製された抗体。

【請求項 11】

(a) 被検化合物を、請求項 6 記載の実質的に、もしくは部分的に精製されたポリペプチドと接触させ、
(b) 該ポリペプチドと結合し、そして/またはその活性を調節する被検化合物を候補化合物として選択することを含むユビキチン結合酵素と結合し、そして/またはその活性を調節することができる候補化合物のスクリーニング方法。

【請求項 12】

該候補化合物が小分子、治療薬、生物学的物質、または薬剤である請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

癌または腫瘍細胞中の腫瘍抑制遺伝子のユビキチン作用をブロックするのに有効な量の請求項 6 記載のユビキチン結合酵素ポリペプチドのアンタゴニストまたはインヒビターを投与することを含む癌または腫瘍の治療方法。

【請求項 14】

免疫抑制を生じるのに有効な量の請求項 6 記載のユビキチン結合酵素ポリペプチドのモジュレーターを投与することを含む該抑制を必要とする対象の免疫応答の抑制方法。

【請求項 15】

免疫または神経障害を治療するのに有効な量の請求項 6 記載のユビキチン結合酵素ポリペプチドを投与することを含む哺乳動物の免疫または神経障害の治療方法。

【請求項 16】

癌または腫瘍細胞、リンパ系細胞、または神経系細胞中の腫瘍抑制遺伝子のユビキチン化をブロックすることにより疾患または障害を治療するのに有効な量の請求項 6 記載のユビキチン結合酵素ポリペプチドのアンタゴニストまたはインヒビターを処置または治療を必要とする個体に投与することを含む癌または腫瘍、免疫障害、リンパ増殖性障害、または神経変性障害の治療方法。

【請求項 17】

癌または腫瘍、免疫障害、リンパ増殖性障害、または神経変性障害の治療方法であって、該障害を治療するのに有効な量の請求項 6 記載のユビキチン結合酵素ポリペプチドのアゴニストを処置または治療を必要とする個体に投与することを含む方法。

【請求項 18】

請求項 1 記載の単離されたポリヌクレオチドおよび使用指示書を含むハイブリダイゼーション用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、活性化ヒト T リンパ球 (T 細胞) 中に発現する、ユビキチン結合酵素 (UBC) との類似性を有するポリペプチドを定義する新規ポリヌクレオチド配列およびそのコードアミノ酸配列の同定および単離に関する。さらに、本発明は、該ポリヌクレオチドおよび該ポリペプチドの、細胞増殖および細胞周期連鎖の調節、および細胞タンパク質分解の標的化、および新生物疾患、免疫障害、および発育および神経障害および疾患の診断、治療および予防における使用に関する。

【0002】

10

20

30

40

50

発明の背景

ユビキチン結合系 (UCS) は、真核細胞およびいくつかの細菌における細胞タンパク質分解の主要経路として働く。UCSは、異常 (abnormal) または異常 (aberrant) タンパク質の排除に介在し、細胞プロセス、例えば遺伝子転写や細胞周期連鎖を調節する重要な調節タンパク質の半減期を調節する。UCSは、有糸分裂周期キナーゼ、腫瘍タンパク質、腫瘍抑制遺伝子産物 (例えば p53)、ウイルスタンパク質、シグナル伝達に関連する細胞表面レセプター、転写調節因子、および突然変異または損傷タンパク質の分解に関与すると考えられている (A. Ciechanover, 1994, Cell, 79: 13-21)。

【0003】

ユビキチン結合酵素 (UBC) は、ユビキチン部分の共有結合によりプロテオソーム分解のためのタンパク質を選択的に標的にする。細胞タンパク質のユビキチン化には、ユビキチン結合酵素 (E2) とユビキチンタンパク質リガーゼ (E3) の間の特異的相互作用が介在するらしい (T. P. Moynihanら, 1999, J. Biol. Chem., 274 (43): 30963-8)。ユビキチン介在タンパク質分解は、限定されるものではないが DNA 修復、細胞周期調節、および p53 依存性プロセスを含む真核および哺乳動物細胞における広範な生物学的プロセスを調節する。

【0004】

ユビキチン化経路は、適切な時に分解する、正常、すなわち短命の細胞内真核性タンパク質を標的とするのみならず、細胞由来の異常な、突然変異体もしくはミスホールドタンパク質の排除にも役立つ (T. P. Moynihanら, 1999, Mammalian Genome, 10: 977-982)。ユビキチン経路においてユビキチンと共有結合するタンパク質は細胞による分解の標的となる。破壊の選択性は一連の酵素反応からなるユビキチン化工程における基質特異性により保証される (F. Yamao, 1999, J. Biochem. (Tokyo), 125 (2): 223-9)。ユビキチンリガーゼ (E3) はユビキチン結合酵素 (E2) とともに、基質の認識に根本的役割を演じると考えられてきた。

【0005】

ユビキチン結合およびタンパク質分解プロセスには4つの主要な工程が含まれる (S. Jentsch, 1992, Ann. Rev. Genet., 26: 179-207)。第1工程では、ユビキチン活性化酵素 (E1) が、E1中の内部システイン残基のチオール基を Ub の C 末端と結合する ATP 依存性反応において熱安定性小タンパク質 (76 アミノ酸) であるユビキチン (Ub) を活性化する。次に、活性化 Ub は、数種の Ub 結合酵素 (E2) の1つに伝達される。異なるユビキチン依存性タンパク質分解経路は、特定の分解シグナルを有するタンパク質を指向する認識サブユニットと関連する構造的に同じであるが別のユビキチン結合酵素を用いる。次に、E2はそのC末端グリシンを介して Ub 分子を標的タンパク質の内部リジン (アクセプターリジン) と連結する。ある場合には、ある種のユビキチンの認識においてユビキチンリガーゼ (E3) として知られるアクセサリー因子が E2 と共同して作用する必要がある。さらなる Ub 分子を加え、最終的にマルチ Ub 鎖構造を形成させてよい。次に、ユビキチン化タンパク質は、大きなマルチサブユニットのタンパク質分解酵素複合体であるプロテオソームにより認識され、分解されて Ub が放出され、再利用される。

【0006】

UBC および UBC をコードする遺伝子ファミリーは種々の真核性属、例えば *Saccharomyces*, *Dictyostelium*, *Drosophila*, *Caenorabditis elegans* (*C. elegans*)、*Paramecia*、ならびにマウスおよびヒトで確認されている。UBC または E2 は互いに関連する大きな遺伝子ファミリーによりコードされている。

【0007】

E2 ユビキチン結合酵素は、異なる UCS 経路における基質特異性に重要である。すべて

10

20

30

40

50

の E 2 分子は、すべての他の E 2 と少なくとも 35% 同一な、ユビキチン酵素チオエステル形成に必要な中心に位置するシステイン残基を含む、UBC ドメインと呼ばれる約 16 kDa の保存ドメインを有する (S. Jentsch、上記)。高度に保存されたプロリンが豊富なエレメントが活性システイン残基の N 末端に位置する。この保存ドメイン以上の構造的変動を用いて E 2 酵素を分類する。クラス I の E 2 (E 2 - 1) はほとんどモっぱら保存 UBC ドメインからなり、酵母 E 2 - 1 および UBC 4、5 および 7 を含む。これら E 2 がその活性を示すには E 3 が必要と考えられる (S. Jentsch、上記参照)。UBC 7 は、ユビキチンを基質として認識し、*in vitro* でポリユビキチン鎖を形成することが示されている (S. Van Nocker ら、1996、*J. Biol. Chem.*、271:12150-12158)。クラス II の E 2 (E 2 - 2) は、基質特異性および細胞局在性に寄与する種々の非関連 C 末端伸長部を有する。酵母 E 2 - 2 酵素、UBC 2 および UBC 3 は、塩基性基質、例えばヒストンとの相互作用を助長する高度に酸性な C 末端伸長部を有する。酵母 UBC 6 は、該タンパク質を小胞体に局在させる疎水性シグナルアンカー配列を有する。

10

【0008】

UCS の正常活性の異常もしくは変化は、多くの疾患および障害と関連している。これには、アルツハイマー病 (L. Gregori ら、1994、*Biochem. Biophys. Res. Comm.*、203-1731-1738)、重篤な損傷後にみられるような筋萎縮障害、および癌やエイズのような病気 (*Science express*、2001、10:1126) にみられるような悪液質 (M. Lovera ら、1995、*Int. J. Cancer*、61:138-141)、腫瘍抑制 (サブレッサー) タンパク質 p53 の分解 (A. Ciechanover、上記)、神経崩壊と関連するユビキチン依存性のタンパク質分解の増大が含まれる。ユビキチン結合 (コンジュゲーション) は抗原提示において律速工程であるから、ユビキチン分解経路は抗原に対する免疫応答に役割を果たすようである (E. P. Grant ら、1995、*J. Immunol.*、155:3750-3758)。実際に、本発明のユビキチン結合酵素相同体は活性化 T リンパ球から同定および単離されたので、免疫系における役割との関連は本発明により支持される。

20

【0009】

新規ユビキチン結合酵素およびこれらタンパク質をコードするポリヌクレオチドの発見は、当該分野に、癌および腫瘍を含む新生物疾患、免疫障害、発育および神経障害、病状、または疾患の診断、スクリーニング、モニター、治療および予防のための新規組成物、ならびに使用および治療方法を提供する。

30

【0010】

発明の要約

本発明は、活性化ヒト T 細胞から単離したユビキチン結合酵素相同体をコードする新規ポリヌクレオチド (以後、RATL1d6 という、「Regulated in Activated T Lymphocytes 1d6」) を提供する。RATL1d6 は、CD3 および CD28 細胞表面抗原に対する抗体による Jurkat 系 T 細胞およびヒト末梢血 T リンパ球の刺激を上方制御 (アップレギュレート) することがわかった。RATL1d6 核酸は本明細書に記載の活性化ヒト T リンパ球由来のサブトラクションライブラリー中に確認された。本発明が提供する RATL1d6 核酸配列によりコードされる RATL1d6 ポリペプチドはユビキチン結合酵素との類似性を有する。

40

【0011】

本発明の目的は、配列番号 1 に示す単離された RATL1d6 ポリヌクレオチドを提供することである。本発明によれば、単離された RATL1d6 ポリヌクレオチドは、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含むユビキチン結合酵素をコードする。RATL1d6 ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの断片または部分も本発明に含まれる。好ましくは、単離された RATL1d6 ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはその断片もしくは部分は実質的に精製されている。

50

【0012】

本発明の別の目的は、ATCC受託番号PTA-3745の核酸配列を有する単離されたRATL1d6ポリヌクレオチドを提供することである。

【0013】

本発明の別の目的は、配列番号1のポリヌクレオチドによりコードされる、配列番号2のアミノ酸配列を有するユビキチン結合酵素相同体であるRATL1d6ポリペプチドまたはその機能的または生物学的に活性な部分を提供することである。本明細書に記載のRATL1d6ポリペプチドの貫膜ドメイン領域、およびコーディングポリヌクレオチドも提供する。

【0014】

本発明の別の目的は、配列番号2に記載の配列と少なくとも80%~90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むユビキチン結合酵素ポリペプチドを提供することである。

【0015】

本発明の別の目的は、ATCC受託番号PTA-3745の核酸配列によってコードされる単離され、実質的に精製されたユビキチン結合酵素ポリペプチドを提供することである。

【0016】

本発明の別の目的は、アミノ酸配列が配列番号2と保存的置換でのみ異なるユビキチン結合酵素ポリペプチドを提供することである。

【0017】

本発明の別の目的は、本明細書に記載のN末端、C末端および内部欠失を有するRATL1d6ポリペプチドを提供することである。これら欠失ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。本発明によれば、そのようなRATL1d6ポリペプチドは本明細書に記載の免疫原性および/または抗原性エピトープを含むことができる。

【0018】

本発明のさらなる目的は、開始コドンを除くRATL1d6(配列番号1)のポリヌクレオチド配列、および得られるコードされたポリペプチドを提供することである。本発明によれば、配列番号1のヌクレオチド520~1782に対応するポリヌクレオチドおよび配列番号2のアミノ酸2~422に対応するポリペプチドを提供する。

【0019】

本発明のさらに別の目的は、配列番号2に記載の配列と少なくとも80%~95%の配列同一性を有するユビキチン結合酵素ポリペプチドを提供することである。

【0020】

本発明のさらなる目的は、RATL1d6ポリペプチドのすべてまたは部分がヘテロロガスなポリペプチドまたはペプチドと結合、カップリング、または連結している実質的に精製されたユビキチン結合酵素融合タンパク質を提供することである。より詳細には、本発明は、配列番号2に記載の配列と少なくとも80%~95%の配列同一性を有するアミノ酸配列、およびヒト免疫グロブリンタンパク質のFc部分のアミノ酸配列を提供する。本発明は、アミノ酸配列が配列番号2と保存的置換によってのみ異なるユビキチン結合酵素融合タンパク質を提供する。

【0021】

本発明のさらなる目的は、RATL1d6ポリヌクレオチド配列もしくはその断片、またはコードされたRATL1d6ポリペプチドまたはその断片もしくは部分を含む組成物を提供することである。本発明は、さらに医薬的または生理学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤を含む、少なくとも1種のRATL1d6ポリペプチドまたはその機能的部分を含む医薬組成物も提供する。

【0022】

本発明のさらに別の目的は、RATL1d6ユビキチン結合酵素相同体をコードする、単離され、精製された、好ましくは実質的に精製された新規ポリヌクレオチドを提供することである。詳細な局面において、該ポリヌクレオチドは配列番号1のヌクレオチド配列も

10

20

30

40

50

提供する。本発明は、配列番号1の相補物またはその変異体を含むポリヌクレオチド配列も提供する。さらに、本発明は、中程度にストリンジェントまたは高ストリンジェンシー条件下で配列番号1のポリヌクレオチド配列とハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を特徴とする。さらに本発明は、(i)配列番号1、(ii)遺伝子コードの冗長性の結果として配列番号1由来の核酸配列分解物、または(iii)それと相補的な核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。より詳細には、(iii)の相補的核酸配列は、中程度または高ストリンジェンシー条件下で配列番号1の核酸配列を含む変性、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖とハイブリダイズすることができる。ここで、中程度ストリンジェント条件の非制限的例には、42°Cの、50%ホルムアミド、5x Denhart溶液、5x SSPEまたはSSC、0.2% SDS、次いで約42°C ~ 約50°Cの温度で0.2x SSPEまたはSSCおよび0.2% SDSで洗浄することを含む。高ストリンジェンシー条件は約65°Cの0.018M NaCl中で安定なハイブリッドを形成する核酸配列のハイブリダイゼーションを可能にする。

10

20

30

40

50

【0023】

本発明のさらに別の目的は、RATL1d6ポリペプチドをコードする核酸配列および該核酸配列のアンチセンス、および該核酸分子またはアンチセンス分子のオリゴヌクレオチド、断片または部分を提供することである。RATL1d6核酸配列、特にRATL1d6核酸分子のオリゴヌクレオチド、断片または部分は、体液試料中のRATL1d6を検出、診断またはモニターするためのハイブリダイゼーションプローブとして有用である。RATL1d6ポリペプチドまたはそのペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはその断片もしくは部分を含む発現ベクターおよび宿主細胞も提供する。

【0024】

また、本発明の目的は、(a)ポリヌクレオチドの発現に適した条件下で本発明のRATL1d6ユビキチン結合酵素相同体をコードするポリヌクレオチド配列の少なくとも機能的断片を含む発現ベクターを含む宿主細胞を培養し、(b)該宿主細胞から該ポリペプチドを回収することを含む配列番号2に示すアミノ酸配列またはその断片を含むポリペプチドの製造方法を提供することである。

【0025】

本発明のさらに別の目的は、治療薬および診断薬として用いるRATL1d6ポリペプチドまたはそのエピトープと特異的に結合する抗体およびその結合断片を提供することである。

【0026】

また、本発明の目的は、RATL1d6ポリペプチドと結合し、そして/または調節する物質、例えばアゴニストおよびアンタゴニストのスクリーニング方法、およびモジュレーター、例えばアゴニストおよびアンタゴニスト、特に記載したスクリーニング方法から得られるものを提供することである。

【0027】

本発明の別の目的は、配列番号2のポリペプチドの精製、好ましくは実質的に精製されたアンタゴニストを提供することである。これに関して、例として、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドと結合する精製された抗体を提供する。本発明は、さらに、配列番号2のポリペプチドの実質的に精製されたアゴニストを提供する。

【0028】

本発明のさらに別の目的は、本明細書に記載のポリヌクレオチドおよびそのコードポリペプチドの発現と関連する障害または疾患の診断および/またはスクリーニングに用いるRATL1d6核酸配列、ポリペプチド、ペプチドおよび抗体を提供することである。

【0029】

本発明のさらなる目的は、本明細書に記載のポリヌクレオチドおよびそのコードポリペプチドの発現、および異常または制御されていない細胞発生と関連する障害のスクリーニングおよび診断用キットを提供することである。

【0030】

本発明の別の目的は、癌または腫瘍、免疫障害、リンパ増殖性障害、または神経変性障害の治療または予防方法であって、該疾患または障害を治療または予防するのに有効な量の R A T L 1 d 6 ユビキチン結合酵素の精製されたアンタゴニストまたはインヒビターを治療または予防を必要とする個体に投与することを含む方法を提供することである。例えば、癌または腫瘍の治療方法において、該ユビキチン結合酵素アンタゴニストは、癌または腫瘍細胞中の腫瘍抑制遺伝子のユビキチン化をブロックするのに有効な量で用いるのが好ましい。

【0031】

本発明の別の目的は、免疫抑制を生じるのに有効な量の、R A T L 1 d 6 ユビキチン結合酵素のアンタゴニストまたはインヒビター、または R A T L 1 d 6 ユビキチン結合酵素のアゴニストまたはアクチベーターを投与することを含む免疫応答の抑制を必要とする対象における免疫応答を抑制する方法を提供することである。そのような方法において、免疫抑制は細胞レセプターのユビキチン化およびそれに続くレセプター活性の下方制御（ダウンレギュレーション）の結果であり得る。

10

【0032】

本発明の別の目的は、異常な (a b n o r m a l) または異常な (a b e r r a n t) 細胞増殖、および制御されていない細胞増殖を治療するのに有効な量の、記載した R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはその相同体、またはそのアゴニストまたはアンタゴニストを本発明に従って投与することを含む哺乳動物における細胞の制御されない増殖を生じる異常な (a b n o r m a l) または異常な (a b e r r a n t) 細胞増殖の治療方法を提供することである。

20

【0033】

本発明のさらに別の目的は、ユビキチン結合酵素の発現または活性に関連する哺乳動物における疾患または疾患に対する感受性の診断方法を提供することである。本方法には、哺乳動物由来の試料を R A T L 1 d 6 ポリペプチド、その相同体、またはその抗原性断片に特異的な抗体と抗原抗体複合体を該抗体と試料中のポリペプチドまたは相同体、またはその抗原性断片との間で形成させることができる条件下で接触させ、形成された抗原抗体複合体を検出することが含まれる。該複合体の検出は、試料中に R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはその相同体、または抗原性断片が存在することを示し、被検試料中のポリペプチド、その相同体または断片との間に形成された複合体の量の、正常コントロール試料中の量に比した増加は、哺乳動物における疾患または病状、または疾患または病状に対する感受性を示す。本発明では、該疾患は免疫障害、神経障害、発育障害、または新生物の増殖であり得る。

30

【0034】

本発明のさらなる目的は、疾患、障害または病状の核酸に基づく診断方法であって、本発明の R A T L 1 d 6 ポリヌクレオチドまたはその断片もしくはオリゴを試料の核酸物質とハイブリダイズさせてハイブリダイゼーション複合体を形成させ、該ハイブリダイゼーション複合体を検出する方法を提供することである。該方法において、該複合体の存在は、試料中のユビキチン結合酵素をコードするポリヌクレオチドまたはその断片の存在に関連する疾患、障害または状態を診断する。そのような方法は *i n s i t u* ハイブリダイゼーションを含むことができる。

40

【0035】

本発明のさらに別の目的は、(a) 配列番号 2 をコードするポリヌクレオチド配列の相補物を生物試料の核酸物質とハイブリダイズさせてハイブリダイゼーション複合体を形成させ、(b) ハイブリダイゼーション複合体を検出することを含む、生物試料中の R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの検出方法を提供することである (ここで、該複合体の存在は、生物試料中の R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在と関連する)。さらに、核酸物質をハイブリダイゼーション前にポリメラーゼ連鎖反応により増幅してよい。

【0036】

50

本発明の別の目的は、試料中のユビキチン結合酵素またはその相同体または抗体反応性断片の検出方法であって、試料を R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはその抗原性断片に特異的な抗体と抗原抗体複合体を試料中の該ポリペプチドまたはその抗原性断片と抗体との間に形成させることができる条件下で接触させ、形成された抗原抗体複合体を検出する方法を提供することである。そのような方法において、該複合体の検出は、試料中のユビキチン結合酵素またはその抗原性断片の存在を示す。

【0037】

本発明のさらなる目的は、ポリヌクレオチド配列と特異的に結合する少なくとも1個の分子または化合物を同定するためのポリヌクレオチドを用いて分子または化合物のライブラリーをスクリーニングする方法であって、R A T L 1 d 6 ポリヌクレオチドまたはペプチド、またはその結合可能な部分を分子または化合物のライブラリーと特異的結合を可能にする条件下で結合させ、特異的結合を検出することにより、該ポリヌクレオチド配列と特異的に結合する分子または化合物を同定することを含む方法を提供することである。そのような方法において、該ライブラリーはDNA分子、RNA分子、人工的染色体構築物、PNA、ペプチドおよびタンパク質を含み得る。

10

【0038】

本発明のさらに別の目的は、R A T L 1 d 6 ポリヌクレオチド配列を用いて試料中の R A T L 1 d 6 ポリヌクレオチドと特異的に結合する分子または化合物を精製する方法を提供することである。該方法には、R A T L 1 d 6 ポリヌクレオチド、その結合可能な部分または R A T L 1 d 6 変異体を、特異的結合を可能にする条件下で結合させ、ポリヌクレオチドと該分子または化合物の間の特異的結合を検出し、結合したポリヌクレオチドを回収し、該ポリヌクレオチドを該分子または化合物から分離し、精製された分子または化合物を得ることが含まれる。

20

【0039】

本発明の別の目的は、ユビキチン結合酵素、例えば R A T L 1 d 6 の活性を調節することができる候補化合物または物質のスクリーニング方法を提供することである。該方法は、被検化合物を実質的または部分的に精製された R A T L 1 d 6 ポリペプチド、ペプチドまたは断片と接触させ、該ポリペプチドの活性を調節する被検化合物を候補調節化合物として選択することが含まれる。アッセイ方法は、R A T L 1 d 6 が細胞または組織中で発現する細胞に基づくアッセイ、または無細胞アッセイであってよい。本発明によれば、本明細書に記載のごとく候補化合物は、ユビキチン結合酵素活性のアゴニストもしくはアンタゴニスト、またはアゴニストもしくはアクチベーターである。R A T L 1 d 6 ユビキチン活性化酵素の活性は、リンパ増殖性障害、癌および腫瘍、神経障害、または発育障害と関連するタンパク質分解、または細胞レセプターのユビキチン化であり得る。

30

【0040】

本発明のさらなる目的は、R A T L 1 d 6 ユビキチン結合酵素と結合することができる候補化合物のスクリーニングまたは検出方法を提供することである。該方法には、本発明に従って被検化合物を精製された R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはそのペプチドと接触させ、該ポリペプチドと結合する被検化合物を候補化合物として選択することが含まれる。そのような方法では、R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはペプチド、または候補化合物を固体支持体上に固定することができる。また、該方法では、候補化合物の選択は、候補化合物と該ポリペプチドの間に形成された複合体の熱アンホールディング曲線を分析することによる結合親和性測定値に基づくことができる。

40

【0041】

本発明が提供するスクリーニング法において、候補化合物は小分子、治療薬、生物学的物質、および/または薬剤であり得る。本発明が提供する本明細書に記載のそのような方法は、高処理能力のスクリーニング技術を介して実施するのに完全に適している。

【0042】

本発明のさらなる目的、特徴および利点は、発明の詳細な説明と添付の図面からよりよく理解されよう。

50

【0043】

図面の簡単な説明

図1Aおよび1Bは、別々にRATL1d6ユビキチン結合酵素相同体のポリヌクレオチド配列(配列番号1)(図1A)、およびコードされたRATL1d6タンパク質の推定アミノ酸配列(図1B)を示す。RATL1d6のコーディング配列(CDS)は配列番号1の517~1782である。

図2Aおよび2Bは、RATL1d6ユビキチン結合酵素相同体のヌクレオチド配列(配列番号1)および推定コードアミノ酸配列(配列番号2)を示し、その部分は活性化T細胞サブトラクションライブラリーから単離された。

図3は、RATL1d6ユビキチン結合酵素ポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。配列番号1のヌクレオチドによりコードされたRATL1d6ポリペプチドの推定分子量はMW=46.1Kdである。

図4は、RATL1d6ユビキチン結合酵素(UBC)とそれぞれ仮定*C. elegans*および*Drosophila*(ショウジョウバエ)相同分子種F2H2.8(Genbank受託番号gil3876332、配列番号3)およびEG:25E8.2(Genbank受託番号gil7290306、配列番号4)、およびE2UBCP52483/マウスUB6B(Genbank受託番号gil1717850、配列番号5)、P27924/ヒトUBC1/Huntingtin相互作用タンパク質(HIP)、(Genbank受託番号gil14727922、配列番号6);CAA72184/*Drosophila*UBCD4(Genbank受託番号gil7294892、配列番号7)、およびP14682/酵母UBC3/CDC34(Genbank受託番号gil6320259、配列番号8)のアラインメントを示す。PFAMデータベースの検索により確認されたユビキチン結合ドメインは、RATL1d6に囲いをつけている。3またはそれ以上の一列に並べた配列で同一である残基を強調表示し、標的タンパク質へのチオールエステル中間体を介するユビキチンの伝達に關与するUBC中に示す保存Cys残基に「下向きの矢印」をつけている。RATL1d6と*C. elegans*F2H2.8の同一率は完全ペプチド配列に対して42%、完全ペプチド配列に対して*Drosophila*EG:25E8.2で47%、および残るタンパク質についてのみUBCDメインに対して約25%である。

図5Aおよび5Bは、RATL1d6アミノ酸配列とその推定*Drosophila*相同分子種(図5A、65%同一)および*C. elegans*相同分子種(図5B、61%同一)との間のBLASTアラインメントを示す。クエリー配列はRATL1d6のそれであり、対象配列は、アミノ酸配列、すなわち*Drosophila*(EG:25E8.2)または*C. elegans*(F25H2.8)である(RATL1d6配列との同一率を示す)。

図6は実施例13に記載のRATL1d6のRT-PCR発現プロフィールを示す。

【0044】

発明の説明

本発明は、その発現が非刺激Tリンパ球と対比して抗CD28および抗CD3抗体刺激ヒトTリンパ球で上方制御される単離された新規ポリヌクレオチドおよびコードされたポリペプチドを提供する。この新規ポリペプチドを本明細書ではRATL1d6(「Regulated in Activated T Lymphocytes 1d6」の頭文字)と呼び、さらにユビキチン結合酵素相同体として特徴づける。

【0045】

本発明の種々の局面をより完全に説明するために以下の定義を規定する。定義は手引きや説明として役立つことを意図し、開示した発明やその態様を限定するものではない。

【0046】

定義

RATL1d6ポリペプチド(またはタンパク質)は、あらゆる種、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒト、ならびに天然、合成、半合成、または組換えを含む種々の供給源

由来の実質的に精製された R A T L 1 d 6 のアミノ酸配列を表す。R A T L 1 d 6 ポリペプチドの機能的断片も本発明に含まれる。

【0047】

アゴニストは、R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはその機能的断片と結合すると R A T L 1 d 6 ポリペプチドの効果の持続時間を増大または延長する分子を表す。アゴニストは、R A T L 1 d 6 ポリペプチドと結合し、その効果を調節するタンパク質、核酸、炭化水素、または他のあらゆる分子を包含してよい。アンタゴニストは、R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはその機能的断片と結合すると、R A T L 1 d 6 ポリペプチドの生物活性および免疫活性の量や持続時間を減少させる分子を表す。アンタゴニストは、R A T L 1 d 6 ポリペプチドの効果を下または減少させるタンパク質、核酸、炭化水素、抗体または他のあらゆる分子を包含してよい。

10

【0048】

本明細書で用いている「核酸配列」は、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドおよびその断片または部分、ならびに1本鎖または2本鎖の、センスまたはアンチセンス鎖を表すゲノムまたは合成起源のDNAまたはRNAを表す。非限定的例において、断片には、長さ20 - 60ヌクレオチド以上の核酸配列を含み、好ましくは長さが少なくとも70 - 100ヌクレオチド、または少なくとも1000ヌクレオチド以上の断片を含む。

【0049】

同様に、本明細書で用いている「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列、およびその断片または部分、および天然または合成分子を表す。アミノ酸配列断片は、典型的には長さ約5 ~ 約30、好ましくは約5 ~ 約15アミノ酸であり、R A T L 1 d 6 ポリペプチドの生物活性または機能を保持する。

20

【0050】

「アミノ酸配列」が本明細書で天然タンパク質分子のアミノ酸配列を表す場合、「アミノ酸配列」などの用語、例えば「ポリペプチド」または「タンパク質」は、アミノ酸配列を、示したタンパク質分子と関連する完全で天然のアミノ酸配列に限定することを意味しない。さらに、本明細書において用語R A T L 1 d 6 ポリペプチドおよびR A T L 1 d 6 タンパク質は本発明のR A T L 1 d 6 核酸配列がコードする生成物を表すのに互換的に用いる。

30

【0051】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドの変異体は、1またはそれ以上のアミノ酸が変化しているアミノ酸配列を表す。該変異体は、置換アミノ酸が同様の構造的または化学的特性を有する「保存的」変化、例えばロイシンのイソロイシンによる置換を有してよい。より稀に、変異体は「非保存的」変化、例えばグリシンのトリプトファンによる置換を有してよい。小さな変動はアミノ酸の欠失または挿入、またはその両方を含んでいてもよい。機能的生物活性もしくは免疫活性を失わずにアミノ酸残基が置換、挿入または欠失していることを決定する手引きは、当該分野でよく知られたコンピュータープログラム、例えばDNA STARソフトウェアを用いてみいだすことができよう。

【0052】

アレルまたは対立遺伝子配列はR A T L 1 d 6 核酸配列の別の形である。アレルは核酸配列中の少なくとも1個の突然変異から生じ、構造や機能が変化してもしなくてもよい変化したmRNAまたはポリペプチドを生じることができよう。天然または組換えのあらゆる特定の遺伝子は、1または多くの対立遺伝子形を有するか、有していなくてもよい。アレルを生じる一般的突然変異変化は、一般的にヌクレオチドの天然の欠失、付加または置換による。この種の変化はそれぞれ、単独または他と組み合わせ、特定配列中で1回またはそれ以上生じてよい。

40

【0053】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードする変化した核酸配列には、同じまたは機能的に等価なR A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを生じる異なるヌクレオ

50

チドの欠失、挿入および/または置換を含む核酸配列が含まれる。変化した核酸配列は、さらに R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの多形性を含み、そのような多形性は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できてもできなくてもよい。コードされたタンパク質は、サイレンス変化、および機能的に等価な R A T L 1 d 6 タンパク質を生じるアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換を含んでいてもよい。意図的なアミノ酸置換は、R A T L 1 d 6 タンパク質の生物活性が保持される限り、残基の極性、荷電、可溶性、疎水性、親水性、および/または両親媒性の類似性に基いて行ってよい。例えば、負に荷電したアミノ酸には、アスパラギン酸やグルタミン酸が含まれ、正に荷電したアミノ酸にはリジンやアルギニンが含まれ、同様の親水性値を有する非荷電の極性上部基を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシンおよびバリン、グリシンおよびアラニン、アスパラギンおよびグルタミン、セリンおよびトレオニン、ならびにフェニルアラニンおよびチロシンが含まれよう。

10

【0054】

「ペプチド核酸」(PNA)は、アミド結合を介して共有結合した修飾核酸塩基対のオリゴマーを表す。PNAは、多くのアンチセンスおよび抗遺伝子適用の実用性を有する。これらの小分子は、典型的には、転写を阻害することにより作用する(例えば、P. E. Nielsenら、1993、Anticancer Drug Des.、8:53-63)。PNAは相補的1本鎖DNAおよびRNAと優先的に結合する細胞中での寿命を延長するようにペギレート(pegylate)させてよい。

【0055】

オリゴヌクレオチドまたはオリゴマーは、好ましくは、典型的にはPCR増幅アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイまたはマイクロアレイに用いることができる、長さが少なくとも約6ヌクレオチド~約60ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約8~10ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約12ヌクレオチド、例えば約15~35ヌクレオチドまたは約15~25ヌクレオチド、または約20~35ヌクレオチドの連続したヌクレオチドを含む核酸配列を表す。用語オリゴヌクレオチドは、当該分野で一般に定義されている用語プライマー、プローブ、またはアンプリマー(amplimer)と実質的に同等であると理解されよう。より長いオリゴヌクレオチドプローブまたはプローブ、例えば縮重プローブの混合物を用いて、より長いもしくはより複雑な核酸配列、例えばゲノムDNAを検出することができることも当業者は理解するであろう。そのような場合、該プローブは、少なくとも20-200ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30-100ヌクレオチド、より好ましくは50-100ヌクレオチドを含んでいてよい。

20

30

【0056】

増幅は、核酸配列の更なるコピーを生成することをいい、一般的に当該分野でよく知られ実施されているポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて行われる(D. W. DieffenbachおよびG. S. Dveksler、1995、PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY参照)。

【0057】

マイクロアレイは、基質、例えば紙、ナイロン、または他のタイプの膜、フィルター、チップ、ガラススライド、または他のあらゆるタイプの適切な固体支持体を用いて合成された別個のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのアレイ(配列)である。

40

【0058】

用語アンチセンスは、特異的DNAまたはRNA配列と相補的なヌクレオチド配列および核酸配列を含む組成物を表す。本明細書で用いている用語「アンチセンス鎖」は、「センス」鎖と相補的な核酸鎖に関して使用する。アンチセンス(すなわち、相補的)核酸分子はPNAを含み、合成または転写を含むあらゆる方法により生産してよい。細胞中に導入されると相補的ヌクレオチドは細胞により産生された天然配列と結合し、転写または翻訳をブロックする2本鎖を形成する。用語「ネガティブ」は、アンチセンス鎖について用いることがあり、「ポジティブ」はセンス鎖について用いることがある。

50

【0059】

用語コンセンサスは、一連の関連DNA、RNA、またはタンパク質配列間の各位置の塩基またはアミノ酸の最も一般的な選択を反映する配列を表す。特に十分合意されている領域は、保存された機能的ドメインを表すことが多い。

【0060】

欠失は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の変化を表し、1またはそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の欠如を生じる。これに対し、挿入（「付加」ともいう）は、天然分子と比べて1またはそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の付加を生じるヌクレオチドまたはアミノ酸配列の変化を表す。置換は、1またはそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の異なるヌクレオチドまたはアミノ酸による置換を表す。

10

【0061】

誘導体核酸分子は、コードされたRATL1d6ポリペプチドをコードするかまたは相補的な化学修飾を表す。そのような修飾には、例えば、水素の、アルキル、アシル、またはアミノ基による置換が含まれる。核酸誘導体は、天然分子の実質的な生物学のおよび/または機能的特性を保持するポリペプチドをコードする。誘導体ポリペプチドは、それが誘導されるポリペプチドの生物学のおよび/または機能的もしくは免疫学的活性を保持するグリコシル化、ペギレーション、またはあらゆる同様のプロセスにより修飾されるものである。

【0062】

用語「生物学的に活性な」、すなわち、機能的（な）は、天然分子の構造的、調節的、または生化学的機能を有するタンパク質またはポリペプチドまたはその断片を表す。同様に、「免疫学的に活性な」は、適切な動物または細胞に特異的免疫応答を誘導する、例えば抗体を産生し、特異抗体と結合する、天然、組換え、または合成RATL1d6またはそのあらゆるオリゴペプチドの能力を表す。

20

【0063】

用語ハイブリダイゼーションは、核酸鎖が塩基対化により相補鎖と結合するあらゆるプロセスを表す。

【0064】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的GおよびC鎖、および相補的AおよびT塩基の間で水素結合を形成することにより2つの核酸配列の間に形成される複合体を表す。水素結合は、塩基スタッキング相互作用によりさらに安定するかもしれない。2つの相補的核酸配列は水素結合により逆平行に配置される。ハイブリダイゼーション複合体は溶液中（例えばC。tまたはR。t分析）、または溶液中に存在する1核酸配列と固体支持体（例えば、膜、フィルター、チップ、ピン、またはガラススライド、または細胞またはその核酸が貼りつく他のあらゆる適切な基質）に固定された別の核酸配列の間に形成することができる。

30

【0065】

用語ストリンジェンシーまたはストリンジェント条件は、核酸組成物、塩、および温度により定義されるハイブリダイゼーション条件を表す。これら条件は当該分野でよく知られており、これを変更して試料中の同じまたは関連ポリヌクレオチド配列を同定および/または検出してよい。低、中程度、または高ストリンジェンシーのいずれかを含む種々の等価な条件は、配列（DNA、RNA、塩基組成物）の長さおよび性質、反応環境（溶液中または固体基質上に固定化）、標的核酸（DNA、RNA、塩基組成物）の性質、塩濃度、および他の反応成分（例えばホルムアミド、硫酸デキストランおよび/またはポリエチレングリコール）の存在の有無、および反応温度（該プローブの融解温度より約5低い～該融解温度より約20～25低い温度の範囲内）といった因子に依存する。1またはそれ以上の因子を変更し、前記条件と異なるが等価な低または高ストリンジェンシー条件を生じさせてよい。

40

【0066】

当業者が理解するであろうように、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは同じ

50

または関連ポリヌクレオチド配列を同定または検出するために変更することができよう。さらに当業者が理解するであろうように、 T_m は多くのパラメーター、例えばハイブリッドまたはプローブの長さ(ヌクレオチド数)、またはハイブリダイゼーション緩衝液成分および条件に応じて当該分野で知られた式により概算することができる(例えばT. Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1982、およびJ. Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989; Current Protocols in Molecular Biology、F. M. Ausubelら編、Vol. 1、「Preparation and Analysis of DNA」、John Wiley and Sons、Inc.、1994-1995、Suppl. 26、29、35および42; 2.10.7-2.10.16頁; G. M. WahlおよびS. L. Berger (1987; Methods Enzymol. 152:399-407); およびA. R. Kimmel、1987; Methods of Enzymol. 152:507-511参照)。一般的指針として、 T_m は配列相同性が1%低下するごとに約1 ~ 1.5低下する。また、一般的に、ハイブリッドの安定性は、ナトリウムイオン濃度および温度の機能である。典型的には、ハイブリダイゼーション反応は最初低ストリンジェンシー条件下で行い、次いで異なるより高ストリンジェンシーで洗浄する。ハイブリダイゼーションストリンジェンシー、例えば高、中程度、または低ストリンジェンシーに対する言及は典型的にはそのような洗浄条件に関する。

【0067】

すなわち、非限定的例において、高ストリンジェンシーは、約65 °Cの0.018M NaCl中で安定なハイブリッドを形成するそれら核酸配列のハイブリダイゼーションを可能にする条件を表す(すなわち、ハイブリッドが約65 °Cの0.018M NaClで安定でない場合は高ストリンジェンシー条件下で安定でない)。高ストリンジェンシー条件は、例えば約42 °Cの、50%ホルムアミド、5x Denhart溶液、5x SSPE (リン酸ナトリウムEDTA生理食塩水) (1x SSPE緩衝液は0.15M NaCl、10mM Na_2HPO_4 、1mM EDTAを含む)、(または150mM NaCl、15mMクエン酸 $\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 含有1x SSC緩衝液、pH7.0)、0.2% SDS中でハイブリダイゼーションし、次いで少なくとも約42 °C、好ましくは約55 °C、より好ましくは約65 °Cの温度の1x SSPE (またはクエン酸ナトリウム生理食塩水、SSC) および0.1% SDSで洗浄することにより提供することができる。

【0068】

中程度ストリンジェンシーは、非限定的例により、42 °C (~ 約50 °C)の、50%ホルムアミド、5x Denhart溶液、5x SSPE (またはSSC)、0.2% SDS中でハイブリダイゼーションさせ、次いで少なくとも約42 °C、好ましくは約55 °C、より好ましくは約65 °Cの温度で0.2x SSPE (またはSSC) および0.2% SDSで洗浄する条件を表す。

【0069】

低ストリンジェンシーは、非限定的例により、42 °Cの、10%ホルムアミド、5x Denhart溶液、6x SSPE (またはSSC)、0.2% SDS中でハイブリダイゼーションさせ、次いで約45 °C、好ましくは約50 °Cの温度の1x SSPE (またはSSC) および0.2% SDSで洗浄する条件を表す。

【0070】

さらなるストリンジェンシー条件については、T. Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY (1982)参照。低、中程度、および高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション/

洗浄条件は、当業者によく知られ、実施されている種々の成分、緩衝液、および温度を用いて変更することができよう。

【0071】

用語相補的(な)または相補性は、塩基対化により許容される塩および温度条件下でポリヌクレオチドが天然に結合することを表す。例えば、配列「A - G - T」は相補的配列「T - C - A」と結合する。2本の1本鎖分子間の相補性は、該核酸のいくらかだけが結合する「部分的」であるか、または1本鎖分子間に完全な相補性が存在するときは完全であってよい。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に重要な影響をもたらす。これは核酸鎖間の結合に依存する増幅反応、およびPNA分子の設計および使用において特に重要である。

10

【0072】

用語相同性は相補性の程度を表す。部分的相同性または完全な相同性があり、完全な相同性は同一性と等価である。同一の配列が標的核酸とハイブリダイズするのを少なくとも部分的に阻害する部分的に相補的な配列は、機能的用語「実質的にホモローガスな」を用いて表される。完全に相補的な配列の標的配列に対するハイブリダイゼーションの阻害は、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイゼーションアッセイ(例えばサザンまたはノーザンブロット、溶液ハイブリダイゼーションなど)を用いて試験することができよう。

【0073】

実質的にホモローガスな配列またはプローブは、低ストリンジェンシー条件下で完全にホモローガスな配列またはプローブと標的配列との結合(すなわちハイブリダイゼーション)と競合し、阻害するであろう。それにも関わらず、低ストリンジェンシー条件は非特異結合を許さず、低ストリンジェンシー条件は2つの配列の互いの一方への結合は特異的(すなわち選択的)相互作用であることを要求する。非特異結合がないことは、部分的な相補性もない(例えば約30%以下の相同性)第2の標的配列を用いることにより試験することができよう。非特異結合がなければ、プローブは第2の非相補的標的配列とハイブリダイズしないであろう。

20

【0074】

当業者は、例えば該分野で知られたCLUSTALWコンピュータープログラム(J. D. Thompsonら、1994、Nucleic acids Research、2(22):4673-4680)またはFASTDB(Brutlagら、1990、Comp. App. Biosci.、6:237-245)に基づくようなアルゴリズムを用いて配列間の同一性率を決定する方法を知っているであろう。FASTDBアルゴリズムは典型的にはその計算において配列中に内在する不一致の欠失または付加、すなわちギャップを考慮しないが、これを手動で訂正して同一性%の過剰推定を避けることができる。しかしながら、CLUSTALWは、その同一性計算値において配列ギャップを考慮する。

30

【0075】

特定のポリヌクレオチド配列を含む組成物は、広く特定のポリヌクレオチド配列を含むあらゆる組成物を表す。該組成物は、乾燥製剤または水性溶液剤を含むことができよう。RATL1d6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列(配列番号1)またはその断片を含む組成物をハイブリダイゼーションプローブとして用いてよい。該プローブは凍結乾燥して保存してよく、安定化剤、例えば炭水化物と組み合わせるとよい。ハイブリダイゼーションにおいて、該プローブを塩(例えばNaCl)、洗剤または界面活性剤(例えばSDS)および他の成分(例えば、Denhardt溶液、乾燥ミルク、サケ精子DNAなど)を含む水性溶液中で用いてよい。

40

【0076】

用語「実質的に精製された」は、天然環境から取り出され、単離され、または分離された、それが天然で結合している他の成分を少なくとも60%含まない、好ましくは75%~85%含まない、最も好ましくは90%またはそれ以上含まない核酸配列またはアミノ酸配列を表す。

50

【0077】

用語試料または生物(学的)試料は、その最も広い意味を意味する。R A T L 1 d 6 タンパク質をコードする核酸またはその断片、またはR A T L 1 d 6 タンパク質自身を含むと思われる生物試料には、体液、細胞または組織抽出物、細胞から単離した染色体(例えば有糸分裂中期染色体スプレッド)、細胞から単離した膜またはオルガネラ、細胞、核酸、例えばゲノムDNA(溶液中、またはサザン分析用のような固体支持体と結合)、RNA(溶液中、またはノーザン分析用のような固体支持体と結合)、cDNA(溶液中または固体支持体と結合)組織、組織プリントなどが含まれよう。

【0078】

形質転換は、外因性DNAを導入し、レシピエント細胞を変化させるプロセスを表す。形質転換は当該分野でよく知られた種々の方法を用いる天然または人工的条件下で生じてよい。形質転換は、外来核酸配列を原核性または真核性宿主細胞に挿入するあらゆる知られた方法によってよい。該方法は、形質転換される宿主細胞の種類に基づいて選ばれ、限定されるものではないが、ウイルス感染、エレクトロポレーション、熱ショック、リポフェクション、および部分衝撃(bombardment)を含んでよい。そのような「形質転換された」細胞には、挿入されたDNAを自己複製プラスミドまたは宿主染色体の部分として複製することができる安定な形質転換細胞を含む。形質転換細胞には、限定された期間に挿入されたDNAまたはRNAを一時的に発現する細胞も含まれる。

10

【0079】

用語「模倣(mimetic)」は、その構造がR A T L 1 d 6 タンパク質またはその部分の構造の知識から生じ、R A T L 1 d 6 タンパク質の作用のいくらかまたはすべてを生じることができるような分子を表す。

20

【0080】

タンパク質(「特定タンパク質の部分」として)に関して用語「部分」は、該タンパク質の断片または部分を表す。断片のサイズは、4または5アミノ酸残基~完全アミノ酸配列の1アミノ酸を欠くものまでの範囲であってよい。すなわち、「配列番号2のアミノ酸配列の少なくとも部分を含む」タンパク質は完全長ヒトR A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはその断片を含む。

【0081】

用語抗体は、完全分子、および抗原決定基や抗原性決定基と結合することができるその断片、例えばFab、F(ab')₂、Fvを表す。R A T L 1 d 6 ポリペプチドと結合する抗体は、完全ポリペプチド、または目的とする、あるいは免疫抗原として用いるために組換えにより製造した小ペプチドを含む断片を用いて製造することができる。動物を免疫するのに用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、RNAの転位から誘導するかまたは化学合成することができ、所望により担体タンパク質と結合させることができる。ペプチドと化学的にカップリングする一般に用いられる担体には、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)およびサイログロブリンが含まれる。次に、カップリングしたペプチドを用いて動物(例えばマウス、ラット、またはウサギ)を免疫する。

30

【0082】

用語「ヒト化抗体」は、ヒト抗体とより厳密に似るように非抗原性結合領域のアミノ酸が置換しているが、依然として最初の結合能力を保持している抗体分子を表す(例えば、C. L. Queenらに対する米国特許5,585,089に記載)。

40

【0083】

用語「抗原(性)決定基」は、特定の抗体と接触する分子の部分(すなわちエピトープ(抗原決定基))を表す。タンパク質またはタンパク質の断片を用いて宿主動物を免疫する場合は、該タンパク質の多くの領域が該タンパク質の特定領域または三次元構造と特異的に結合する抗体を誘導することができ、これら領域または構造を抗原性決定基という。抗原性決定基は抗体との結合において完全抗原(すなわち、免疫応答を誘導するのに用いる免疫原)と競合してよい。

50

【0084】

用語「特異結合(する)」または「特異的に結合する」は、タンパク質またはペプチドと結合分子、例えばアゴニスト、アンタゴニストまたは抗体の相互作用を表す。該相互作用は結合分子により認識されるタンパク質の特定構造(すなわち、抗原性決定基またはエピトープ)の存在に依存する。例えば、抗体がエピトープ「A」に特異的であるときは、標識された「A」および抗体を含む反応物中のエピトープA(すなわち遊離の非標識A)を含むタンパク質の存在は、抗体と結合した標識Aの量を減少させるであろう。

【0085】

用語「ポリヌクレオチドの発現と対応する」は、ノーザン分析による配列番号1と同様なリボ核酸の存在の検出は試料中のRATL1d6ポリペプチドをコードするmRNAの存在を示し、該タンパク質をコードするポリヌクレオチドからの転写物の発現に対応することを表す。

10

【0086】

配列番号1のポリヌクレオチド中の変更には、ハイブリダイゼーションアッセイを用いて検出することができる欠失、挿入、および点突然変異を含むRATL1d6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列におけるあらゆる変更が含まれる。この定義内には、RATL1d6ポリペプチドをコードするゲノムDNA配列に対する変更の検出(例えば配列番号1とハイブリダイズすることができる制限断片長多形性のパターンの変更による)、配列番号1の選んだ断片がゲノムDNA試料にハイブリダイズできないこと(例えばアレル特異的オリゴヌクレオチドプローブを使用)、および不適切または予期しないハイブリダイゼーション、例えばRATL1d6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の正常染色体遺伝子座以外の遺伝子座とのハイブリダイゼーション(例えば、有糸分裂中期スプレッドに対する蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)を使用)の検出が含まれる。

20

【0087】

本発明の詳細な説明

本発明は、Jurkat系T細胞およびヒト末梢血Tリンパ球の刺激が、CD3およびCD28細胞表面抗原に対する抗体により上方制御されることがわかった活性化ヒトT細胞から単離された新規ポリペプチド(本明細書ではRATL1d6という)の発見に基づく。本発明は、異常または調節されない細胞増殖および/または機能に関連する障害、例えば新生物疾患(例えば癌および腫瘍)、および免疫および神経変性障害および病状をスクリーニング、診断、治療または予防するためのRATL1d6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびRATL1d6ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む組成物の使用を含む。

30

【0088】

また、本発明は異常な免疫応答、例えば自己免疫病状、変性病状、悪液質、筋肉変性などに関連する障害をスクリーニング、診断、治療または予防するためのRATL1d6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびRATL1d6ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む組成物の使用を含む。

【0089】

また、本発明は、RATL1d6ポリヌクレオチドおよび本明細書に記載のポリペプチド配列の断片または部分も含む。RATL1d6ポリペプチドの機能的または活性部分が好ましい。RATL1d6ポリペプチドはユビキチン結合酵素と類似性を有する。

40

【0090】

本発明のヒトRATL1d6をコードする核酸はサブトラクショナルクローニングにより最初に同定された(実施例1)。さらなる核酸が、IncycyteデータベースのBLAST検索によりIncycyteクローンNo. 2396483 (THP-1、プロモノサイトライブラリー); 5818240 (前立腺腫瘍ライブラリー); 5396270 (肝臓腫瘍ライブラリー); および4741202 (胸腺ライブラリー)中に確認された。該配列をアラインメントし、得られたコンフィグを用いて完全長クローンを得るためのオリ

50

ゴヌクレオチドを設計した。(実施例1および2参照)。

【0091】

そのある態様において、本発明は図3に示す配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。RAT1d6ポリペプチドは長さ422アミノ酸であり、ユビキチン結合酵素とのアミノ酸配列相同性を有する。すなわち、RATL1d6タンパク質は、活性化トリンパ球から単離されたUBCファミリーの新たに発見されたメンバーとして特徴付けられる。さらに、図4は、RATL1d6ポリペプチド配列とUBCドメインを有するタンパク質のユビキチン結合酵素(UBC)ファミリーを含む種間配列とのアラインメントを提供する。

【0092】

EG:25E8.2がユビキチン結合酵素であり、Rat1d6の相同分子種(ortholog)らしいとの結論は、該タンパク質間の有意レベルの相同性による。RATL1d6の機能をよりよく説明するために、EG:25E8.2を用いた試験をDrosophila(ショウジョウバエ)細胞に基づく免疫モデルを用いて行った(実施例14参照)。

【0093】

哺乳動物は固有および適応免疫経路による複雑な免疫応答を有し、これらの経路は同様のクラスの分子を共用する。固有免疫のほとんどの構成要素はDrosophilaからヒトに新化論的に保存されるが、より高等な真核生物のみが免疫を獲得した(Silverman、N.およびManiatis、T.、2001、Genes Dev.、15: 2321-2342)。

【0094】

昆虫は広範囲の病原体に対する強力で急速な応答を有する。Drosophilaの真菌および細菌感染は、抗微生物ペプチド(AMP)遺伝子の転写活性化をもたらす。各AMP遺伝子の誘導は、3つのRel/NF- κ Bタンパク質、すなわち、Relish、DorsalおよびDifの組み合わせにより発揮されるインプットのバランスにより制御される。AMP AttacinD遺伝子はRelishホモダイマー、またはRelishおよびDorsalのヘテロダイマーの活性化により制御される(Han、Z. S. およびIp、Y. T.、1999、J. Biol. Chem.、274:21355-21361)。Rel/NF- κ B経路の活性化は、Drosophilaの固有免疫応答に必須である。例えば、Relish遺伝子中のDrosophilaの突然変異は、ある種のクラスの抗微生物ペプチドを発現せず、グラム陰性細菌感染に感受性である(Hendengren、M.ら、1999、Mol. Cell.、4(5):827-837)。Drosophila Relタンパク質は、哺乳類Rel β のようにI κ B様インヒビタータンパク質と結合する結果、細胞質中に隔離される。細胞が病原体により活性化される場合、シグナル経路が活性化し、I κ Bの変性、Relタンパク質の核転座、およびRel活性化転写が生じる(Silverman、N.およびManiatis、T.、2001、Genes Dev.、15:2321-2342)。Cactus(カクタス)はDorsalおよびDifを阻害するI κ Bタンパク質である。Relish(レリッシュ)はp105 NF- κ Bの哺乳類相同体であり、NF- κ BのようにRelishはRelドメインとI κ B阻害ドメインの両方を含む。RelishはI κ Bドメインを放出する開裂により活性化される(Stoven、S.ら、2000、EMBO Rep.、1:347-352)。

【0095】

上記試験は、EG:25E8.2タンパク質のDrosophila固有免疫応答の調節機能に関連する。これら試験の中心はDrosophila Schneider 2(S2)培養細胞においてEG:25E8.2 mRNAの2本鎖RNA介在干渉(RNAi)による「ロックアウト」表現型を生じることである。RNAi技術は持続的転写後遺伝子サイレンシングを生じるために開発され、S2細胞中で働くことが報告されてきた(Caplen、N. J.ら、2000、Gene、252:95-105、およびC

10

20

30

40

50

lemens, J. C.ら、2000、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97:6499-6503)。S2細胞を細菌細胞壁成分のリポ多糖(LPS)により誘導し、Attacin(アタシン)を含む抗微生物ペプチドのサブユニットを発現させることができる(Han, Z. S.およびIp, Y. T.、1999、J. Biol. Chem.、274:21355-21361)。実施例14記載の実験では、S2細胞を用いるLPS誘導性ルシフェラーゼレポーター系においてEG:25E8.2 RNAiを試験した。

【0096】

RATL1d6ポリペプチド変異体も本発明に含まれる。好ましいRATL1d6変異体は、本明細書に記載のアミノ酸配列と少なくとも75~80%、より好ましくは少なくとも85~90%、さらにより好ましくは少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有し、RATL1d6ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的、免疫的、または他の機能的特性または活性を保持する。配列番号2と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有する変異体が最も好ましい。

10

【0097】

別の態様において、本発明はRATL1d6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。したがって、RATL1d6ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするあらゆる核酸配列を用いてRATL1d6タンパク質を発現する組換え分子を生成することができる。特定の態様において、本発明は、図1Aおよび1Bに示す配列番号1の核酸配列を含むRATL1d6ポリヌクレオチドを含む。より詳細には、本発明は、ブダペスト条約の規定に従って2001年10月1日にAmerican Type Culture Collection(ATCC)、10801 University Boulevard、Manassas、VA 20110-2209に寄託されたRATL1d6クローン(ATCC受託番号PTA-3745)を提供する。

20

【0098】

当業者が理解するであろうように、遺伝子コードの縮重はRATL1d6ポリペプチドをコードする多数のヌクレオチド配列の生成を生じる。該配列のあるものは、あらゆる知られた天然遺伝子のヌクレオチド配列と最小限の相同性を有する。したがって、本発明は可能なコドン選択に基づく組み合わせを選ぶことにより作製することができるそれぞれすべての可能なヌクレオチド配列の変動を予期する。これらの組み合わせは、天然RATL1d6のヌクレオチド配列に適用される標準的トリプレット遺伝子コードにしたがって作製され、そのようなすべての変動は具体的に開示されていると考えるべきである。

30

【0099】

RATL1d6ポリペプチドおよびその変異体をコードするヌクレオチド配列は、好ましくは適切に選ばれたストリンジェンシー条件下で天然RATL1d6ポリペプチドのヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができるが、実質的に異なるコドンを使用しているRATL1d6ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を生成するのが好都合であろう。コドンは、ペプチド/ポリペプチドの発現が特定のコドンが宿主に利用される頻度にしたがって特定の原核および真核宿主に生じる割合を増加させるように選ぶことができよう。コードされたアミノ酸配列を変化させずにRATL1d6ポリペプチドおよ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化させる他の理由には、より望ましい特性、例えば天然配列から生成される転写物より長い半減期を有するRNA転写物の生成が含まれる。

40

【0100】

また本発明は、もっぱら合成化学により、RATL1d6ポリペプチドおよびその誘導体をコードするDNA配列またはその部分の生成を含む。生成後、合成配列を当業者が実施するよく知られた試薬を用いるあらゆる多くの利用可能な発現ベクターおよび細胞系に挿入することができる。さらに、合成化学を用いてRATL1d6ポリペプチドをコードする配列またはそのあらゆる断片に突然変異を導入してよい。

【0101】

50

また、種々のストリンジェンシー条件下で配列番号1に示すような本発明のRATL1d6のヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチド配列も本発明に含まれる。ハイブリダイゼーション条件は典型的には核酸結合複合体またはプローブの融解温度(T_m)に基づき(G. M. WahlおよびS. L. Berger、1987; *Methods Enzymol.*、152:399-407、およびA. R. Kimmel、1987; *Methods of Enzymol.*、152:507-511参照)、限定したストリンジェンシーで用いることができよう。例えば、本発明には、中程度のストリンジェント条件下で配列番号1のRATL1d6配列およびRATL1d6ポリペプチドをコードするものと縮重する他の配列とハイブリダイズすることができる配列が含まれる(例えば、非限定的例として、2XSSC、0.5%SDS、1.0mMEDTA、pH8.0の前洗浄溶液、および50、5XSSC、一夜のハイブリダイゼーション条件)。

【0102】

RATL1d6タンパク質をコードする核酸配列を部分ヌクレオチド配列を利用し当該分野で知られた種々の方法を用いて伸長させ、プロモーターや制御エレメントのような上流配列を検出することができよう。例えば、用いることができるある方法には普遍的プライマーを利用して既知遺伝子座と隣り合った未知の配列を回収する制限部位PCRがある(G. Sarkar、1993、*PCR Methods Applic.*、2:318-322)。特に、ゲノムDNAは、最初にリンカー配列に対するプライマーおよび既知領域に特異的なプライマーの存在下で増幅される。次に、増幅された配列を同じリンカープライマーおよび最初のものに内在する別の特異的プライマーを用いる2回目のPCRにかける。各回のPCRの生成物を適切なRNAポリメラーゼを用いて転写し、逆転写酵素を用いてシーケンスする。

【0103】

逆PCRを用い、既知領域または配列に基づく分岐プライマーを用いて配列を増幅または伸長してもよい(T. Trigliaら、1988、*Nucleic Acids Res.*、16:8186)。該プライマーは、OLIGO4.06プライマー分析ソフトウェア(National Biosciences Inc.、Plymouth、MN)または別の適切なプログラムを用い、長さ22-30ヌクレオチド、GC含有率50%またはそれ以上、および温度約68~72で標的配列とアニールするように設計することができよう。該方法には、遺伝子の既知領域に適切な断片を生じる数種の制限酵素を用いる。次に、該断片を分子内ライゲーションにより環化し、PCR鑄型として用いる。

【0104】

使用できる別の方法には、ヒトおよび酵母人工染色体(YAC)DNAの既知配列と隣り合ったDNA断片のPCR増幅を含むキャプチャーPCRがある(M. Lagerstromら、1991、*PCR Methods Applic.*、1:111-119)。この方法において、複数の制限酵素消化およびライゲーションを用い、操作した2本鎖配列をPCRを行う前のDNA分子の未知部分内に置くことができよう。J. D. Parkerら(1991; *Nucleic Acids Res.*、19:3055-3060)は、未知配列を回収するのに使用できる別の方法を提供する。さらに、PCR、ネスト化プライマー、およびPROMOTERFINDERライブラリーを用いてゲノムDNAをワーク(walk)することができる(Clontech、Palo Alto、CA)。このプロセスはライブラリーをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エクソン接合部をみいだすのに有用である。

【0105】

完全長cDNAをスクリーニングするときは、より大きなcDNAを含むようにサイズ選択したライブラリーを用いるのが好ましい。また、遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含むであろうことからランダムプライムライブラリーも好ましい。オリゴd(T)ライブラリーが完全長cDNAを生じない状況ではランダムプライムライブラリーを使用することも特に好ましいかもしれない。ゲノムライブラリーは、5'および3'非転写制

御領域中の配列の伸長、または選択的にスプライスされた転写物におけるエクソンの使用を確認するのに有用かもしれない。

【0106】

本発明の態様は、当該分野でよく知られた一般に利用可能なDNAシーケンシング法を用いて実施することができる。該方法には、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、SEQUENASE (US Biochemical Corp. Cleveland, OH)、Taqポリメラーゼ(PE Biosystems)、熱安定性T7ポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、または組換えポリメラーゼおよびブルーフリーディングエクソヌクレアーゼの組み合わせ、例えばELONGASE Amplification System (Life Technologies (Gaithersburg, Md.) から市販)といった酵素を用いてよい。好ましくは、該プロセスはHamilton Micro Lab 2200 (Hamilton, Reno, NV)、Peltier Thermal Cycler (PTC200; MJ Research, Watertown, MA)、およびABI Catalystおよび373および377 DNAシーケンサー(PE Biosystems)といった機械を用いて自動化される。

10

【0107】

市販のキャピラリー電気泳動システムを用いてシーケンシングまたはPCR生成物のサイズを分析し、またはヌクレオチド配列を確認することができよう。特に、キャピラリーシーケンシングには、電気泳動分離用の流動性ポリマー、レーザーで活性化する4つの異なる蛍光色素(各ヌクレオチドに1つ)、および荷電連動装置カメラ(charge coupled device camera)による放射波長の検出を用いることができよう。アウトプット/光強度を適切なソフトウェア(例えば、GENOTYPER and SEQUENCE NAVIGATOR、PE Biosystems)を用いて電気信号に変換し、全プロセス(試料のローディングからコンピューター分析および電子データ表示まで)をコンピューター制御することができよう。キャピラリー電気泳動は、特定試料中に限られた量だけ存在するかもしれないDNAの小片をシーケンシングするのに特に好ましい。

20

【0108】

本発明の別の態様において、RATL1d6ポリペプチドまたはそのペプチド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分子に用い、適切な宿主細胞中におけるRATL1d6ポリペプチド生成物またはその断片または機能的等価物の発現を導くことができよう。遺伝子コードの固有の縮重のため、実質的に同じかまたは機能的に等価なアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を生成し、これら配列を用いてRATL1d6タンパク質をクローンし、発現させてよい。

30

【0109】

当業者が理解するであろうように、それは非天然コドンをもつRATL1d6ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を生成するのに好都合かもしれない。例えば、特定の原核性または真核性宿主において好ましいコドンを選び、タンパク質の発現率を増大させ、所望の特性、例えば天然配列から生じる転写物より長い半減期をもつ組換えRNA転写物を生成することができる。

40

【0110】

本発明のヌクレオチド配列は、限定されるものではないが遺伝子産物のクローニング、プロセスング、および/または発現を修飾する変更を含む種々の理由によりRATL1d6ポリペプチドをコードする配列を変更するために当該分野で一般に知られた方法を用いて操作することができる。ランダム断片化によるDNAシャッフリング、および遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのPCR再組み立てを用いてヌクレオチド配列を操作してよい。例えば、部位指向性(または部位特異的)突然変異誘発を用いて新規制限部位を挿入し、グリコシル化パターンを変更し、コドン選択を変化させ、スプライス変異体を生成し、または突然変異を導入してよい。部位指向性突然変異誘発を行う種々の方法が当該分

50

野で知られ実施されており、例えばM. J. McPherson (ed)、1991、Directed Mutagenesis: A Practical Approach、IRL Press、Oxford; J. L. Owenら、Apr.、1994、Focus、Life Technologies、Inc.、Vol. 16.2: 39-44; およびR. AndagおよびE. Schutz、2001、Bio Techniques、30(3): 486-488)に記載されている。in vitro部位指向性突然変異誘発を行うキットも市販されており、広く使用されている(例えば、Quick-Change(登録商標) Site-Directed Mutagenesis Kit、Stratagene、La Jolla、CA; およびUnique Site Elimination Mutagenesis Kit、Pharmacia Biotechnology、Piscataway、NJ)。

10

【0111】

本発明の別の態様において、RATL1d6ポリペプチドをコードする天然、修飾、または組換え核酸配列を融合タンパク質をコードするようにヘテロローガスな配列と結合してよい。例えば、RATL1d6活性のインヒビターのためのペプチドライブラリーをスクリーニングするには、市販の抗体により認識できるキメラRATL1d6タンパク質をコードすることが有用かもしれない。RATL1d6タンパク質がヘテロローガスな部分から開裂され、精製されるようにRATL1d6タンパク質をコードする配列とヘテロローガスなタンパク質配列の間に位置する開裂部位を含むように融合タンパク質を操作してもよい。

20

【0112】

別の態様において、リガンド結合アッセイはRATL1d6生成物の機能と干渉するインヒビター化合物を同定するのに有用である。そのようなアッセイは、タンパク質の機能が未知であっても有用である。これらアッセイは、被検化合物の特定標的分子、例えばタンパク質またはペプチドへの結合を検出するように設計される。検出には結合の直接測定が含まれてよい。あるいはまた、結合の間接表示には、タンパク質構造の安定化または生物学的機能の破壊が含まれてよい。有用なリガンド結合アッセイの非限定的な例を以下に詳述する。

【0113】

結合タンパク質を検出および単離するのに有用な方法の一つには、Pharmacia Biosensorが開発し、製造者のプロトコール(LKB Pharmacia、Sweden)に記載のBiomolecular Interaction Assay(BIACore)システムがある。BIACoreシステムではGST融合タンパク質をセンサーチップに固定するためにアフィニティー精製抗GST抗体を用いる。センサーは、屈折率の変化を検出する光学的現象である表面プラズモン共鳴を利用する。したがって、目的とするタンパク質、例えば本発明のRATL1d6ポリペプチドまたはその断片はチップ上にコートされ、被検化合物は該チップ上を通過する。屈折率(表面プラズモン共鳴)の変化により結合を検出する。

30

【0114】

別のタイプのリガンド結合アッセイには、米国特許4,568,649に記載のシンチレーション近似アッセイ(SPA)が含まれる。現在開発中のこのアッセイの修飾にはホールドタンパク質とアンホールドタンパク質を区別するためにシャペロニン(chaperonin)を用いる。標的タンパク質をSPAビーズに付着させ、被検化合物を加える。次に、該ビーズを緩やかな変性条件、例えば加熱、SDSへの暴露などに向け、精製標識シャペロニンを加える。被検化合物が標的タンパク質に結合していれば、標識シャペロニンは結合せず、反対に被検化合物が結合していなければ該タンパク質はある程度の変性を受け、シャペロニンは結合するであろう。別のタイプのリガンド結合アッセイにおいて、ミトコンドリア標的シグナルを含むタンパク質はin vitroで単離されたミトコンドリア内に取込まれる(Hurtら、1985、EMBO J.、4: 2061-2068; EilersおよびSchatz、1986、Nature、322: 228-2

40

50

31)。ミトコンドリア取込みアッセイにおいて、特定の標的タンパク質をコードする核酸がミトコンドリア取込みシグナルをコードする特定の下流に挿入されている発現ベクターを構築する。キメラタンパク質を合成し、被検化合物の存在下および非存在下でそれが単離ミトコンドリアに取込まれる能力について試験する。標的タンパク質と結合する被検化合物は、*in vitro*で単離ミトコンドリアへのその取込みを阻害するはずである。

【0115】

本発明に従って用いるのに適した別のタイプのリガンド結合アッセイには、酵母2ハイブリッドシステムがある (FieldsおよびSong、1989、Nature、340 : 245 - 246)。酵母2ハイブリッドシステムは、酵母 *S. cerevisiae* の GAL4 タンパク質の特性を活用する。GAL4 タンパク質は、ガラクトースの利用を含む酵素をコードする遺伝子の発現に必要な転写アクチベーターである。GAL4 タンパク質は、2つの分離可能な機能的に不可欠なドメイン、すなわち、特異的DNA配列と結合するN末端ドメイン (UASG)、および転写を活性化するのに必要な酸性領域を含むC末端ドメインからなる。両ドメインを含む天然GAL4タンパク質は、酵母細胞がガラクトース培地上で増殖するときの強力な転写アクチベーターである。N末端ドメインは配列特異的にDNAと結合するが、転写を活性化することはできない。C末端ドメインは活性化領域を含むが、UASGに局在することができないので転写を活性化することはできない。GAL4の部分を含む2ハイブリッドタンパク質の系である2ハイブリッドシステムにおいて、(1) GAL4 DNA結合ドメインはタンパク質「X」と融合し、(2) GAL4 活性化領域はタンパク質「Y」を融合する。XおよびYがタンパク質-タンパク質複合体を形成し、GAL4ドメインの近似物を再構成することができれば、UASGにより制御された遺伝子の転写が起きる。相互作用するタンパク質XおよびYのひとつをそれぞれ含む2ハイブリッドタンパク質の作製により、UASGの活性化領域をその正常作用部位にもたすことができる。

【0116】

固体基質上に合成された多数の明確なポリマーについて被検化合物の結合親和性を試験することを含む、Fodorら、1991、Science、251 : 767 - 773に記載の結合アッセイも有用であろう。本発明のRATL1d6ポリペプチドまたはその部分と結合する化合物は治療用組成物に用いる物質として潜在的有用性がある。

【0117】

別の態様において、RATL1d6ポリペプチドをコードする配列は、当該分野でよく知られた化学的方法を用いて全部または部分を合成することができよう (例えば、M. H. Caruthersら、1980、Nucl. Acids Res. Symp. Ser.、215 - 223、およびT. Horn、Tら、1980、Nucl. Acids Res. Symp. Ser.、225 - 232参照)。あるいはまた、該タンパク質それ自身をRATL1d6ポリペプチドまたはその断片もしくは部分のアミノ酸配列を合成する化学的方法を用いて生成することができよう。例えば、ペプチド合成は種々の固相技術を用いて実施でき (J. Y. Robergeら、1995、Science、269 : 202 - 204)、自動合成は、例えばABI 431A Peptide Synthesizer (PE Biosystems)を用いて達成することができよう。新規合成ペプチドは、プレパラティブ高速液体クロマトグラフィー (例えばT. Creighton、1983、Proteins, Structures and Molecular Principles、WH Freeman and Co.、New York、N. Y.)、逆相高速液体クロマトグラフィー、または当該分野で知られた他の合成方法により実質的に精製することができる。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシーケンシングにより確認することができよう (例えば、Edman変性法; Creighton、上記)。さらに、RATL1d6ポリペプチドまたはそのあらゆる部分のアミノ酸配列を直接合成時に変更し、そして/または化学的方法を用いて他のタンパク質またはそのあらゆる部分からの配列と結合させることにより変異体ポリペプチドを製造するこ

10

20

30

40

50

とができよう。

【0118】

出発メチオニンを欠くポリペプチド

好ましい態様において、本発明は、得られたRATL1d6のコードポリペプチドに加えて開始出発コドンを含むポリヌクレオチドを含む。詳細には、本発明は配列番号1のヌクレオチド520～1782に対応するポリヌクレオチドと配列番号2のアミノ酸2～422に対応するポリペプチドを含む。本発明には、RATL1d6をコードするポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターおよび該ベクターを含む宿主細胞も含まれる。

【0119】

RATL1d6 UBCドメイン

新規RATL1d6ポリペプチドのUBCドメインは配列番号2の約G248～約K411に位置する。ユビキチンのトランスファーに關与する保存システインは、配列番号2のアミノ酸351に位置する。

【0120】

好ましい態様において、下記RATL1d6 UBCドメインポリペプチドが本発明に含まれる：

【化1】

GSVQATDRLMKELRDIYRSQSFKGGNYAVELVNDSLYDWNVKKLLKVDQD
SALHNDLQILKEKEGADFILLNFSFKDNFPDFPFVRRVSPVLSGGYVLGG
GAICMELLTKQGWSSAYSIESVIMQISATLVKGKARVQFGANKSQYSLTRA
QQSYKSLVQIHEK (配列番号 47)。

このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。本発明は、RATL1d6 UBCドメインポリペプチドを本明細書の別の場所に記載の免疫原性および/または抗原性エピトープとして使用することも含む。

【0121】

さらに好ましい態様において、下記N末端RATL1d6 UBCドメイン欠失ポリペプチドが本発明に含まれる：配列番号2の、

【化2】

G1-K164, S2-K164, V3-K164, Q4-K164, A5-K164, T6-K164, D7-K164, R8-K164, L9-K164, M10-K164, K11-K164, E12-K164, L13-K164, R14-K164, D15-K164, I16-K164, Y17-K164, R18-K164, S19-K164, Q20-K164, S21-K164, F22-K164, K23-K164, G24-K164, G25-K164, N26-K164, Y27-K164, A28-K164, V29-K164, E30-K164, L31-K164, V32-K164, N33-K164, D34-K164, S35-K164, L36-K164, Y37-K164, D38-K164, W39-K164, N40-K164, V41-K164, K42-K164, L43-K164, L44-K164, K45-K164, V46-K164, D47-K164, Q48-K164, D49-K164, S50-K164, A51-K164, L52-K164, H53-K164, N54-K164, D55-K164, L56-K164, Q57-K164, I58-K164,

【0122】

【化3】

10

20

30

40

L59-K164, K60-K164, E61-K164, K62-K164, E63-K164, G64-K164, A65-K164, D66-K164, F67-K164, I68-K164, L69-K164, L70-K164, N71-K164, F72-K164, S73-K164, F74-K164, K75-K164, D76-K164, N77-K164, F78-K164, P79-K164, F80-K164, D81-K164, P82-K164, P83-K164, F84-K164, V85-K164, R86-K164, V87-K164, V88-K164, S89-K164, P90-K164, V91-K164, L92-K164, S93-K164, G94-K164, G95-K164, Y96-K164, V97-K164, L98-K164, G99-K164, G100-K164, G101-K164, A102-K164, I103-K164, C104-K164, M105-K164, E106-K164, L107-K164, L108-K164, T109-K164, K110-K164, Q111-K164, G112-K164, W113-K164, S114-K164, S115-K164, A116-K164, Y117-K164, S118-K164, I119-K164, E120-K164, S121-K164, V122-K164, I123-K164, M124-K164, Q125-K164, I126-K164, S127-K164, A128-K164, T129-K164, L130-K164, V131-K164, K132-K164, G133-K164, K134-K164, A135-K164, R136-K164, V137-K164, Q138-K164, F139-K164, G140-K164, A141-K164, N142-K164, K143-K164, S144-K164, Q145-K164, Y146-K164, S147-K164, L148-K164, T149-K164, R150-K164, A151-K164, Q152-K164, Q153-K164, S154-K164, Y155-K164, K156-K164, S157-K164, および/または L158-K164。

10

20

これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列も提供する。本発明は、1またはそれ以上のこれらN末端R A T L 1 d 6 U B Cドメイン欠失ポリペプチドを本明細書の別の場所に記載の免疫原性および/または抗原性エピトープとして使用することも含む。

【0123】

さらに別の好ましい態様において、下記C末端R A T L 1 d 6 U B Cドメイン欠失ポリペプチドが本発明に含まれる：配列番号2の、

30

【化4】

G1-K164, G1-E163, G1-H162, G1-I161, G1-Q160, G1-V159, G1-L158, G1-S157, G1-K156, G1-Y155, G1-S154, G1-Q153, G1-Q152, G1-A151, G1-R150, G1-T149, G1-L148, G1-S147, G1-Y146, G1-Q145, G1-S144, G1-K143, G1-N142, G1-A141, G1-G140, G1-F139, G1-Q138, G1-V137, G1-R136, G1-A135, G1-K134, G1-G133, G1-K132, G1-V131, G1-L130, G1-T129, G1-A128, G1-S127, G1-I126, G1-Q125, G1-M124, G1-I123, G1-V122, G1-S121, G1-E120, G1-I119, G1-S118, G1-Y117, G1-A116, G1-S115, G1-S114, G1-W113, G1-G112, G1-Q111, G1-

40

【0124】

【化5】

K110, G1-T109, G1-L108, G1-L107, G1-E106, G1-M105, G1-C104, G1-
 I103, G1-A102, G1-G101, G1-G100, G1-G99, G1-L98, G1-V97, G1-Y96,
 G1-G95, G1-G94, G1-S93, G1-L92, G1-V91, G1-P90, G1-S89, G1-V88, G1-
 V87, G1-R86, G1-V85, G1-F84, G1-P83, G1-P82, G1-D81, G1-F80, G1-
 P79, G1-F78, G1-N77, G1-D76, G1-K75, G1-F74, G1-S73, G1-F72, G1-
 N71, G1-L70, G1-L69, G1-I68, G1-F67, G1-D66, G1-A65, G1-G64, G1-E63,
 G1-K62, G1-E61, G1-K60, G1-L59, G1-I58, G1-Q57, G1-L56, G1-D55, G1-
 N54, G1-H53, G1-L52, G1-A51, G1-S50, G1-D49, G1-Q48, G1-D47, G1-
 V46, G1-K45, G1-L44, G1-L43, G1-K42, G1-V41, G1-N40, G1-W39, G1-
 D38, G1-Y37, G1-L36, G1-S35, G1-D34, G1-N33, G1-V32, G1-L31, G1-
 E30, G1-V29, G1-A28, G1-Y27, G1-N26, G1-G25, G1-G24, G1-K23, G1-
 F22, G1-S21, G1-Q20, G1-S19, G1-R18, G1-Y17, G1-I16, G1-D15, G1-
 R14, G1-L13, G1-E12, G1-K11, G1-M10, G1-L9, G1-R8, および/またはG1-D7。

10

20

これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列も提供する。本発明は、1またはそれ以上のこれらC末端R A T L 1 d 6 U B Cドメイン欠失ポリペプチドを本明細書の別の場所に記載の免疫原性および/または抗原性エピトープとして使用することも含む。

【0125】

さらに好ましい態様において、下記R A T L 1 d 6 U B Cドメインアミノ酸置換も本発明に含まれる：配列番号2の、

G 2 4 8 が A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
 またはYアミノ酸残基で置換される。

S 2 4 9 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
 またはYアミノ酸残基で置換される。

30

V 2 5 0 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W
 またはYアミノ酸残基で置換される。

Q 2 5 1 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W
 またはYアミノ酸残基で置換される。

A 2 5 2 が C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
 またはYアミノ酸残基で置換される。

T 2 5 3 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W
 またはYアミノ酸残基で置換される。

D 2 5 4 が A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
 またはYアミノ酸残基で置換される。

40

R 2 5 5 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W
 またはYアミノ酸残基で置換される。

L 2 5 6 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
 またはYアミノ酸残基で置換される。

M 2 5 7 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W
 またはYアミノ酸残基で置換される。

K 2 5 8 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
 またはYアミノ酸残基で置換される。

E 2 5 9 が A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
 またはYアミノ酸残基で置換される。

50

L 2 6 0 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

R 2 6 1 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

D 2 6 2 が A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

I 2 6 3 が A、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Y 2 6 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V
または W アミノ酸残基で置換される。 10

R 2 6 5 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

S 2 6 6 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Q 2 6 7 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

S 2 6 8 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

F 2 6 9 が A、C、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。 20

K 2 7 0 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

G 2 7 1 が A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

G 2 7 2 が A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

N 2 7 3 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Y 2 7 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V
または W アミノ酸残基で置換される。 30

A 2 7 5 が C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

V 2 7 6 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

E 2 7 7 が A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

L 2 7 8 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

V 2 7 9 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W
または Y アミノ酸残基で置換される。 40

N 2 8 0 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

D 2 8 1 が A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

S 2 8 2 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

L 2 8 3 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Y 2 8 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V
または W アミノ酸残基で置換される。 50

D 2 8 5 が A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

W 2 8 6 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V
または Y アミノ酸残基で置換される。

N 2 8 7 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

V 2 8 8 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

K 2 8 9 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。 10

L 2 9 0 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

L 2 9 1 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

K 2 9 2 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

V 2 9 3 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

D 2 9 4 が A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。 20

Q 2 9 5 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

D 2 9 6 が A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

S 2 9 7 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

A 2 9 8 が C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

L 2 9 9 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。 30

H 3 0 0 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

N 3 0 1 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

D 3 0 2 が A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

L 3 0 3 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Q 3 0 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。 40

I 3 0 5 が A、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

L 3 0 6 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

K 3 0 7 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

E 3 0 8 が A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

K 3 0 9 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。 50

E 3 1 0 が A、C、D、F、G、H、I、J、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

G 3 1 1 が A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

A 3 1 2 が C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

D 3 1 3 が A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

F 3 1 4 が A、C、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

10

I 3 1 5 が A、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

L 3 1 6 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

L 3 1 7 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

N 3 1 8 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

F 3 1 9 が A、C、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

20

S 3 2 0 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

F 3 2 1 が A、C、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

K 3 2 2 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

D 3 2 3 が A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

N 3 2 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

30

F 3 2 5 が A、C、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

P 3 2 6 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

F 3 2 7 が A、C、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

D 3 2 8 が A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

P 3 2 9 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

40

P 3 3 0 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

F 3 3 1 が A、C、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

V 3 3 2 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W または Y アミノ酸残基で置換される。

R 3 3 3 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

V 3 3 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W または Y アミノ酸残基で置換される。

50

V 3 3 5 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

S 3 3 6 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

P 3 3 7 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

V 3 3 8 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

L 3 3 9 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

10

S 3 4 0 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

G 3 4 1 が A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

G 3 4 2 が A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Y 3 4 3 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V
または W アミノ酸残基で置換される。

V 3 4 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

20

L 3 4 5 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

G 3 4 6 が A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

G 3 4 7 が A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

G 3 4 8 が A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

A 3 4 9 が C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

30

I 3 5 0 が A、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

C 3 5 1 が A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

M 3 5 2 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

E 3 5 3 が A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

L 3 5 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

40

L 3 5 5 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

T 3 5 6 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

K 3 5 7 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Q 3 5 8 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

G 3 5 9 が A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

50

W 3 6 0 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V
または Y アミノ酸残基で置換される。

S 3 6 1 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

S 3 6 2 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

A 3 6 3 が C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Y 3 6 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V
または W アミノ酸残基で置換される。

10

S 3 6 5 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

I 3 6 6 が A、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

E 3 6 7 が A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

S 3 6 8 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

V 3 6 9 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

20

I 3 7 0 が A、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

M 3 7 1 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Q 3 7 2 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

I 3 7 3 が A、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

S 3 7 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

30

A 3 7 5 が C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

T 3 7 6 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

L 3 7 7 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

V 3 7 8 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

K 3 7 9 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

40

G 3 8 0 が A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

K 3 8 1 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

A 3 8 2 が C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

R 3 8 3 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

V 3 8 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

50

Q 3 8 5 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

F 3 8 6 が A、C、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

G 3 8 7 が A、C、D、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

A 3 8 8 が C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

N 3 8 9 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。 10

K 3 9 0 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

S 3 9 1 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Q 3 9 2 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Y 3 9 3 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V
または W アミノ酸残基で置換される。

S 3 9 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。 20

L 3 9 5 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

T 3 9 6 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

R 3 9 7 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

A 3 9 8 が C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y で置換される。

Q 3 9 9 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。 30

Q 4 0 0 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

S 4 0 1 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Y 4 0 2 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V
または W アミノ酸残基で置換される。

K 4 0 3 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

S 4 0 4 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。 40

L 4 0 5 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

V 4 0 6 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

Q 4 0 7 が A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

I 4 0 8 が A、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。

H 4 0 9 が A、C、D、E、F、G、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W
または Y アミノ酸残基で置換される。 50

E 4 1 0 が A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。

そして / または K 4 1 1 が A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W または Y アミノ酸残基で置換される。ならびにそのあらゆる組み合わせ。本発明は、1 またはそれ以上のこれら R A T L 1 d 6 U B C ドメインアミノ酸置換ポリペプチドを本明細書の別の箇所に記載の免疫原性および / または抗原性エピトープとして用いることも含む。

【 0 1 2 6 】

別の好ましい態様において、下記 R A T L 1 d 6 U B C ドメイン保存的アミノ酸置換が本発明に含まれる：配列番号 2 の、

G 2 4 8 が A、M、S または T で置換される。S 2 4 9 が A、G、M または T で置換される。V 2 5 0 が A、I または L で置換される。Q 2 5 1 が N で置換される。A 2 5 2 が G、I、L、M、S、T または V で置換される。T 2 5 3 が A、G、M または S で置換される。D 2 5 4 が E で置換される。R 2 5 5 が K または H で置換される。L 2 5 6 が A、I または V で置換される。M 2 5 7 が A、G、S または T で置換される。K 2 5 8 が R または H で置換される。E 2 5 9 が D で置換される。L 2 6 0 が A、I または V で置換される。R 2 6 1 が K または H で置換される。D 2 6 2 が E で置換される。I 2 6 3 が A、V または L で置換される。Y 2 6 4 が F または W である。R 2 6 5 が K または H で置換される。S 2 6 6 が A、G、M または T で置換される。Q 2 6 7 が N で置換される。S 2 6 8 が A、G、M または T で置換される。F 2 6 9 が W または Y で置換される。K 2 7 0 が R または H で置換される。G 2 7 1 が A、M、S または T で置換される。G 2 7 2 が A、M、S または T で置換される。N 2 7 3 が Q で置換される。Y 2 7 4 が F または W である。A 2 7 5 が G、I、L、M、S、T または V で置換される。V 2 7 6 が A、I または L で置換される。E 2 7 7 が D で置換される。L 2 7 8 が A、I または V で置換される。V 2 7 9 が A、I または L で置換される。N 2 8 0 が Q で置換される。D 2 8 1 が E で置換される。S 2 8 2 が A、G、M または T で置換される。L 2 8 3 が A、I または V で置換される。Y 2 8 4 が F または W である。D 2 8 5 が E で置換される。W 2 8 6 が F または Y である。N 2 8 7 が Q で置換される。V 2 8 8 が A、I または L で置換される。K 2 8 9 が R または H で置換される。L 2 9 0 が A、I または V で置換される。L 2 9 1 が A、I または V で置換される。K 2 9 2 が R または H で置換される。V 2 9 3 が A、I または L で置換される。D 2 9 4 が E で置換される。Q 2 9 5 が N で置換される。D 2 9 6 が E で置換される。S 2 9 7 が A、G、M または T で置換される。A 2 9 8 が G、I、L、M、S、T または V で置換される。L 2 9 9 が A、I または V で置換される。H 3 0 0 が K または R で置換される。N 3 0 1 が Q で置換される。D 3 0 2 が E で置換される。L 3 0 3 が A、I または V で置換される。Q 3 0 4 が N で置換される。I 3 0 5 が A、V または L で置換される。L 3 0 6 が A、I または V で置換される。K 3 0 7 が R または H で置換される。E 3 0 8 が D で置換される。K 3 0 9 が R または H で置換される。E 3 1 0 が D で置換される。G 3 1 1 が A、M、S または T で置換される。A 3 1 2 が G、I、L、M、S、T または V で置換される。D 3 1 3 が E で置換される。F 3 1 4 が W または Y で置換される。I 3 1 5 が A、V または L で置換される。L 3 1 6 が A、I または V で置換される。L 3 1 7 が A、I または V で置換される。N 3 1 8 が Q で置換される。F 3 1 9 が W または Y で置換される。S 3 2 0 が A、G、M または T で置換される。F 3 2 1 が W または Y で置換される。K 3 2 2 が R または H で置換される。D 3 2 3 が E で置換される。N 3 2 4 が Q で置換される。F 3 2 5 が W または Y で置換される。P 3 2 6 が P である。F 3 2 7 が W または Y で置換される。D 3 2 8 が E で置換される。P 3 2 9 が P である。P 3 3 0 が P である。F 3 3 1 が W または Y で置換される。V 3 3 2 が A、I または L で置換される。R 3 3 3 が K または H で置換される。V 3 3 4 が A、I または L で置換される。V 3 3 5 が A、I または L で置換される。S 3 3 6 が A、G、M または T で置換される。P 3 3 7 が P である。V 3 3 8 が A、I または L で置換される。L 3 3 9 が A、I または V で置換される。S 3 4 0 が A、G、M または T で置換される。G 3 4 1 が A、

10

20

30

40

50

M、SまたはTで置換される。G 3 4 2がA、M、SまたはTで置換される。Y 3 4 3がFまたはWである。V 3 4 4がA、IまたはLで置換される。L 3 4 5がA、IまたはVで置換される。G 3 4 6がA、M、SまたはTで置換される。G 3 4 7がA、M、SまたはTで置換される。G 3 4 8がA、M、SまたはTで置換される。A 3 4 9がG、I、L、M、S、TまたはVで置換される。I 3 5 0がA、VまたはLで置換される。C 3 5 1がCである。M 3 5 2がA、G、SまたはTで置換される。E 3 5 3がDで置換される。L 3 5 4がA、IまたはVで置換される。L 3 5 5がA、IまたはVで置換される。T 3 5 6がA、G、MまたはSで置換される。K 3 5 7がRまたはHで置換される。Q 3 5 8がNで置換される。G 3 5 9がA、M、SまたはTで置換される。W 3 6 0がFまたはYである。S 3 6 1がA、G、MまたはTで置換される。S 3 6 2がA、G、MまたはTで置換される。A 3 6 3がG、I、L、M、S、TまたはVで置換される。Y 3 6 4がFまたはWである。S 3 6 5がA、G、MまたはTで置換される。I 3 6 6がA、VまたはLで置換される。E 3 6 7がDで置換される。S 3 6 8がA、G、MまたはTで置換される。V 3 6 9がA、IまたはLで置換される。I 3 7 0がA、VまたはLで置換される。M 3 7 1がA、G、SまたはTで置換される。Q 3 7 2がNで置換される。I 3 7 3がA、VまたはLで置換される。S 3 7 4がA、G、MまたはTで置換される。A 3 7 5がG、I、L、M、S、TまたはVで置換される。T 3 7 6がA、G、MまたはSで置換される。L 3 7 7がA、IまたはVで置換される。V 3 7 8がA、IまたはLで置換される。K 3 7 9がRまたはHで置換される。G 3 8 0がA、M、SまたはTで置換される。K 3 8 1がRまたはHで置換される。A 3 8 2がG、I、L、M、S、TまたはVで置換される。R 3 8 3がKまたはHで置換される。V 3 8 4がA、IまたはLで置換される。Q 3 8 5がNで置換される。F 3 8 6がWまたはYで置換される。G 3 8 7がA、M、SまたはTで置換される。A 3 8 8がG、I、L、M、S、TまたはVで置換される。N 3 8 9がQで置換される。K 3 9 0がRまたはHで置換される。S 3 9 1がA、G、MまたはTで置換される。Q 3 9 2がNで置換される。Y 3 9 3がFまたはWである。S 3 9 4がA、G、MまたはTで置換される。L 3 9 5がA、IまたはVで置換される。T 3 9 6がA、G、MまたはSで置換される。R 3 9 7がKまたはHで置換される。A 3 9 8がG、I、L、M、S、TまたはVで置換される。Q 3 9 9がNで置換される。Q 4 0 0がNで置換される。S 4 0 1がA、G、MまたはTで置換される。Y 4 0 2がFまたはWである。K 4 0 3がRまたはHで置換される。S 4 0 4がA、G、MまたはTで置換される。L 4 0 5がA、IまたはVで置換される。V 4 0 6がA、IまたはLで置換される。Q 4 0 7がNで置換される。I 4 0 8がA、VまたはLで置換される。H 4 0 9がKまたはRで置換される。E 4 1 0がDで置換される。そして/またはK 4 1 1がRまたはHで置換される。ならびにそのあらゆる組み合わせ。R A T L 1 d 6 U B Cドメイン内の他の適切な置換が本発明に含まれ、本明細書の他の場所に記載されている。本発明は、1またはそれ以上のこれらR A T L 1 d 6 U B Cドメイン保存的アミノ酸置換ポリペプチドを本明細書の他の箇所に記載の免疫原性および/または抗原性エピトープとして用いることも含む。

【0127】

生物学的に活性なR A T L 1 d 6ポリペプチドまたはペプチドを発現するには、R A T L 1 d 6ポリペプチドまたは機能的等価物をコードするヌクレオチド配列を適切な発現ベクター、すなわち挿入コーディング配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含むベクターに挿入してよい。

【0128】

当業者によく知られている方法を用いてR A T L 1 d 6ポリペプチドをコードする配列および適切な転写および翻訳制御エレメントを含む発現ベクターを構築してよい。これら方法には*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*遺伝子組換えが含まれる。そのような技術はJ. Sambrookら、1989、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*、Cold Spring Harbor Press、Plainview、N. Y.、およびF. M. Ausu

belら、1989、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York、N. Y.に記載されている。

【0129】

種々の発現ベクター/宿主系をRATL1d6ポリペプチドをコードする配列を含み、発現させるために利用してよい。そのような発現ベクター/宿主系には、限定されるものではないが、微生物、例えば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した細菌、酵母発現ベクターで形質転換した酵母、ウイルス発現ベクター（例えばバクテリオファージ）を感染させた昆虫細胞系、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）および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）で形質転換された植物細胞系、または動物細胞系が含まれる。用いる宿主細胞は本発明を限定しない。

【0130】

「制御エレメント」または「調節配列」は、転写および翻訳を行う宿主細胞タンパク質と相互作用する該ベクターの非翻訳領域、例えばエンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域である。そのようなエレメントはその強度や特異性が異なってよい。用いるベクター系および宿主に応じて、構成性および誘導性プロモーターを含むあらゆる多くの適切な転写および翻訳エレメントを用いてよい。例えば、細菌系を用いてクローニングするときは、誘導性プロモーター、例えば、BLUESCRIPTファージミッド（Stratagene、La Jolla、CA）またはPSPORT1プラスミド（Life Technologies）などのハイブリッドlacZプロモーターを用いてよい。バクテリオファージポリヘドリンプロモーターを昆虫細胞に用いてよい。植物細胞のゲノム（例えば熱ショック、RUBISCO、および保存タンパク質遺伝子）または植物ウイルス（例えば、ウイルスプロモーターまたはリーダー配列）由来のプロモーターまたはエンハンサーをベクターにクローンしてよい。哺乳動物細胞系において、哺乳類遺伝子または哺乳類ウイルス由来のプロモーターが好ましい。RATL1d6をコードする配列の複数のコピーを含む細胞系を生成する必要がある場合は、SV40またはEBVに基づくベクターを適切な選択性マーカーと共に用いてよい。

【0131】

細菌系において、発現RATL1d6産物の用途に応じて多くの発現ベクターを選ぶことができよう。例えば、抗体を誘導するために大量の発現タンパク質が必要な場合は、容易に精製される融合タンパク質の高レベルの発現を指示するベクターを用いてよい。そのようなベクターには、限定されるものではないが、RATL1d6ポリペプチドをコードする配列を - ガラクトシダーゼのアミノ末端Metおよび続く7残基に対する多機能性E. coliクローニングおよび発現ベクター、例えば配列をインフレームでベクターに連結してハイブリッドタンパク質を生成するBLUESCRIPT（Stratagene）、pLNベクター（G. Van HeekeおよびS. M. Schuster、1989、J. Biol. Chem.、264：5503-5509参照）などが含まれる。pGEXベクター（Promega、Madison、WI）を用い、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させてもよい。一般的に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズに吸着させ、次いで遊離グルタチオン存在下で溶出させることにより溶解細胞から容易に精製することができる。そのような系で製造するタンパク質は、目的とするクローンされたポリペプチドをGST部分から意のままに放出させることができるようにヘパリン、トロンピン、またはXA因子プロテアーゼ開裂部位を含むように設計してよい。

【0132】

酵母Saccharomyces cerevisiaeにおいて、アルファ因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHのような構成性または誘導性プロモーターを含む多くのベクターを用いてよい（例えば、F. M. Ausubelら、上記、およびGran

10

20

30

40

50

tら、1987、Methods Enzymol.、153:516-544参照)。

【0133】

植物発現ベクターが望ましくそれを使用する場合は、RATL1d6ポリペプチドをコードする配列の発現をあらゆる多くのプロモーターにより行ってよい。例えば、ウイルスプロモーター、例えばCaMVの35Sおよび19Sプロモーターを単独で、またはTMV由来のオメガリーダー配列と組み合わせて用いてよい(N. Takamatsu、1987、EMBO J.、6:307-311)。あるいはまた、植物プロモーター、例えばRUBISCOの小サブユニットまたは熱ショックプロモーターを用いてよい(G. Coruzziら、1984、EMBO J.、3:1671-1680; R. Brogliera、1984、Science、224:838-843; およびJ. Wintersonら、1991、Results Probl. Cell Differ. 17:85-105)。これら構築物を直接DNA形質転換または病原体介在トランスフェクションにより植物細胞に導入することができる。そのような技術は多くの一般に利用可能な総説に記載されている(例えば、S. HobbsまたはL. E. Murry、In: McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill、New York、N. Y.; 191-196頁参照)。

10

【0134】

昆虫系を用いてRATL1d6ポリペプチドを発現させてよい。例えば、あるそのような系において、Autographa californica核多角体病ウイルス(ACNPV)をベクターに用いてSpodoptera frugiperda細胞またはTrichoplusia larvae中で外来遺伝子を発現させる。RATL1d6ポリペプチドをコードする配列をウイルスの非必須領域、例えばポリヘドリン遺伝子中にクローンし、ポリヘドリンプロモーターの制御下に置いてよい。RATL1d6ポリペプチドの挿入の成功は、ポリヘドリン遺伝子を不活性化し、コートタンパク質を欠く組換えウイルスを生成するであろう。次に、組換えウイルスを用いて例えば、RATL1d6ポリペプチド産物を発現させることができるS. frugiperda細胞またはTrichoplusia larvaeを感染させてよい(E. K. Engelhardら、1994、Proc. Nat. Acad. Sci.、91:3224-3227)。

20

【0135】

哺乳類宿主細胞において、多くのウイルスに基づく発現系を用いてよい。アデノウイルスを発現ベクターに用いる場合は、RATL1d6ポリペプチドをコードする配列を後期プロモーターおよびトリプレットリーダー配列を含むアデノウイルス転写/翻訳複合体に連結してよい。ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域中の挿入を用いて、感染宿主細胞中にRATL1d6ポリペプチドを発現させることができる生存ウイルスを得てよい(J. LoganおよびT. Shenk、1984、Proc. Natl. Acad. Sci.、81:3655-3659)。さらに、転写エンハンサー、例えばRous肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーを用いて哺乳類宿主細胞における発現を増大させることができよう。

30

【0136】

特異的開始シグナルを用いて、RATL1d6ポリペプチドをコードする配列のより効率的な翻訳を達成することもできよう。そのようなシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接配列を含む。RATL1d6ポリペプチドをコードする配列、その開始コドン、および上流配列を適切な発現ベクター中に挿入する場合は更なる転写または翻訳制御シグナルを必要としないかもしれない。しかしながら、コーディング配列またはその断片のみが挿入されている場合は、ATG開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルを与えるべきである。さらに、全挿入物の翻訳を保証するため開始コドンが正しい読み取り枠にあるべきである。外来翻訳エレメントおよび開始コドンは天然および合成の種々の起源のものであってよい。発現効率は、用いる特定の細胞系に適したエンハンサー、例えば文献に記載のものを含めることにより増強することができよう(D. Scharfら、1994、Res

40

50

ults Probl. Cell Differ., 20:125-162)。

【0137】

さらに、所望の方法で挿入配列の発現を調節し、または発現タンパク質をプロセッシングする能力で宿主細胞株を選んでよい。ポリペプチドのそのような修飾には、限定されるものではないがアセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質付加、およびアシル化が含まれる。該タンパク質の「プレプロ」型を開裂する翻訳後プロセッシングを用いて、正しい挿入、ホールディングおよび/または機能を促がすこともできよう。そのような翻訳後活性に関する特異的細胞機構および特徴的メカニズムを有する種々の宿主細胞（例えば、CHO、HeLa、MDCK、HEK293、およびW138）がAmerican Type Culture Collection (ATCC)、American Type Culture Collection (ATCC)、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209から利用可能であり、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを保証するように選ぶことができよう。

【0138】

組換えタンパク質を長期間高収率で産生するには安定な発現が好ましい。例えば、RATL1d6タンパク質を安定に発現する細胞株を、同じまたは別のベクター上にウイルス起源の複製および/または内因性発現エレメントおよび選択性マーカーを含む発現ベクターを用いて形質転換することができよう。該ベクターを導入後、細胞を豊富化細胞培養液で1~2日間増殖させ、次いで選択培地に切りかえる。選択性マーカーの目的は選択に対する抵抗性を付与することであり、その存在により導入配列をうまく発現する細胞の増殖および回収を可能にする。安定な形質転換細胞の耐性クローンは該細胞種に適した組織培養技術を用いて増殖させることができよう。

【0139】

あらゆる多くの選択系を用いて形質転換細胞株を回収することができよう。これらには、限定されるものではないが、それぞれtk^rまたはaprt^r細胞中で使用できる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV TK)、(M. Wiglerら、1977、Cell、11:223-32)およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(I. Lowyら、1980、Cell、22:817-23)遺伝子が含まれる。また、抗代謝物、抗生物質、またはヘルビシド(herbicide)耐性を選択の基準に用いることができる:例えば、メトトレキセート耐性を付与するdhfr(M. Wiglerら、1980、Proc. Natl. Acad. Sci., 77:3567-70)、アミノグリコシドネオマイシンおよびG-418耐性を付与するnpt(F. Colbere-Garapinら、1981、J. Mol. Biol., 150:1-14)、およびそれぞれクロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ耐性を付与するalsまたはpat(Murry、上記)。さらなる選択性(選択可能な)遺伝子が記載されている:例えば、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用できるようにするtrpB、または細胞がヒスチジンのかわりにヒスチノールを利用できるようにするhisD(S. C. HartmanおよびR. C. Mulligan、1988、Proc. Natl. Acad. Sci., 85:8047-51)。

最近、形質転換体を同定するだけでなく特定のベクター系による一時的または安定なタンパク質発現量を定量するのに広く用いられるアントシアニン、 β -グルクロニダーゼとその基質GUS、およびルシフェラーゼとその基質ルシフェリンのようなマーカーを含む、可視的マーカーの使用が普及してきた(C. A. Rhodesら、1995、Methods Mol. Biol., 55:121-131)。

【0140】

マーカー遺伝子発現の存在/欠如は、目的遺伝子の存在も示唆するが、所望の目的遺伝子の存在および発現を確認する必要がある。例えば、RATL1d6ポリペプチドをコードする核酸配列をマーカー遺伝子配列内に挿入すると、RATL1d6ポリペプチドをコードする配列を含む組換え細胞をマーカー遺伝子機能の欠如により同定することができる

。あるいはまた、マーカー遺伝子を1つのプロモーターの制御下でR A T L 1 d 7 6 ポリペプチドをコードする配列と縦一列(タンデム)に置くことができる。誘導または選択に応じたマーカー遺伝子の発現は、通常タンデム遺伝子の共発現を示す。

【0141】

あるいはまた、R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードする核酸配列を含み、R A T L 1 d 6 ポリペプチド産物を発現する宿主細胞は、当業者に知られた種々の方法により同定することができよう。これら方法には、限定されるものではないが、核酸またはタンパク質を検出および/または定量するための膜、溶液、またはチップに基づく技術を含むDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーション、およびタンパク質バイオアッセイまたはイムノアッセイ技術が含まれる。

10

【0142】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の存在は、R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの部分または断片またはプローブを用いる増幅、もしくはDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションにより検出することができる。核酸増幅に基づくアッセイには、R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードする配列に基づくオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーを用いてR A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするDNAまたはRNAを含む形質転換体を検出することが含まれる。

【0143】

種々の標識およびコンジュゲーション技術が知られ、当業者に用いられており、種々の核酸およびアミノ酸アッセイに用いることができよう。R A T L 1 d 6 ポリペプチド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ハイブリダイゼーションまたはPCRプローブの製造方法には、標識ヌクレオチドを用いるオリゴ-標識、ニックトランスレーション、末端標識またはPCR増幅が含まれる。あるいはまた、R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはそのあらゆる部分または断片をコードする配列をmRNAプローブを作製するためのベクター中にクローンすることができる。そのようなベクターは当該分野で知られており、市販されており、これを用いて適切なRNAポリメラーゼ、例えばT7、T3またはSP(6)および標識ヌクレオチドを加えて*in vitro*でRNAプローブを合成することができよう。これらの方法は種々の市販キットを用いて行うことができよう(例えば、Amersham Pharmacia Biotech、Promega and U. S. Biochemical Corp.)。用いてよい適切なレポーター分子または標識には、放射性核種、酵素、蛍光物質、化学ルミネッセント物質または色素産生物質、および基質、補助因子、インヒビター、磁性粒子などが含まれる。

20

30

【0144】

R A T L 1 d 6 タンパク質またはその断片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を、細胞培養から該タンパク質を発現および回収するのに適した条件下で培養してよい。組換え細胞が産生する該タンパク質は、用いる配列および/またはベクターに応じて分泌され、または細胞内に含まれてよい。当業者が理解するであろうように、R A T L 1 d 6 タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核性または真核性細胞膜を通してR A T L 1 d 6 タンパク質を分泌させるシグナル配列を含むように設計することができよう。他の構築物を用いてR A T L 1 d 6 タンパク質をコードする核酸配列を可溶性タンパク質の精製を促がすポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列と連結してよい。そのような精製を促がすドメインには、限定されるものではないが、金属キレートペプチド、例えば固定化金属を用いる精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリンを用いる精製を可能にするタンパク質Aドメイン、およびFLAG伸長/アフィニティ精製系に用いるドメイン(ImmuneX Corp.、Seattle、WA)が含まれる。開裂可能なリンカー配列、例えばXA因子またはエンテロキナーゼに特異的なもの(*In vitro*gen、San Diego、CA)を精製ドメインとR A T L 1 d 6 タンパク質の間に含めることにより、精製を促がすことができよう。あるそのような発現ベクターは、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ開裂部位に先立つ6ヒスチジン残基をコードする核酸およびR A T L

40

50

1 d 6 を含む融合タンパク質を発現させるために提供される。ヒスチジン残基は、J. Porathら、1992、Prot. Exp. Purif.、3:263-281に記載のIMAC(固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー)を用いる精製を促すが、エンテロキナーゼ開裂部位は融合タンパク質からの精製手段をもたらず。融合タンパク質生成に適したベクターに関する考察についてはD. J. Krollら、1993; DNA Cell Biol.、12:441-453参照。

【0145】

組換え生成に加え、RATL1d6ポリペプチドの断片を固相技術を用いる直接ペプチド合成により生成することができよう(J. Merrifield、1963、J. Am. Chem. Soc.、85:2149-2154)。タンパク質合成は手動技術または自動操作により行ってよい。自動合成は、例えばABI 431A Peptide Synthesizer (PE Biosystems)を用いて達成することができよう。種々のRATL1d6ポリペプチド断片を別々に化学合成し、次いで化学的方法を用いて結合し、完全長分子を生成することができる。

10

【0146】

ヒト人工染色体(HAC)を用いてプラスミドベクター中に含まれ、発現させることができるものより大きなDNA断片を供給することができよう。HACは、10K~10MのDNA配列を含み、安定な有糸分裂染色体の分離と維持に必要なすべてのエレメントを含んでいてよい直線ミクロ染色体である(J. J. Harringtonら、1997、Nature Genet.、15:345-355参照)。6~10MのHACは、治療目的の常套的送達法(例えば、リポソーム、リポカチオンアミノポリマーまたは小胞)により構築され、送達される。

20

【0147】

該タンパク質に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いてRATL1d6ポリペプチドの発現を検出および測定するための種々のプロトコールが知られており、当該分野で実施されている。例には、酵素免疫測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、および蛍光活性化細胞選別(FACS)が含まれる。RATL1d6ポリペプチド上の2つの非干渉エピトープと反応するモノクローナル抗体を利用する2部位、モノクローナルベースのイムノアッセイが好ましいが、競合結合アッセイを用いてもよい。これらおよび他のアッセイは、R. Hamptonら、1990; Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN、およびD. E. Maddoxら、1983; J. Exp. Med.、158:1211-1216の刊行物に記載されているように当該分野で知られている。

30

【0148】

貫膜ドメイン領域

RATL1d6ポリペプチドは、1つが配列番号2の約アミノ酸69~約アミノ酸88に位置し、他方が約アミノ酸334~約アミノ酸356に位置する2つの貫膜ドメインを含むことが確定された。これに関連して、用語「約」は、上記貫膜ドメインポリペプチドのN末端および/またはC末端を1、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸越えることを意味すると解釈することができる。TMPREDプログラムを貫膜の予測に用いた(K HofmannおよびW Stoffel、1993、Biol. Chem.、347:166)。

40

【0149】

好ましい態様において、下記貫膜ドメインポリペプチドが本発明に含まれる:

【化6】

PHLPPRGSVPGDPVRIHCNITESYPVPPIWSVESDDPNLAAVLERLVDIKK
GNTLLLQHLKRIISDLCKLYNLPQHDPVEMLDQQLPAEQCTQEDVSSSEDED
EEMPEDTEDLDHYEMKEEEPAEGKKSEDDGIGKENLAILEKIKKNQRQDYL
NGAVSGSVQATDRLMKELRDIYRSQSFKGGNYAVELVNDSLYDWNVKLLK
VDQDSALHNDLQILKEKEGADFILLNFSFKDNFPDPPFVVR (配列番号 17)。

このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。本発明には、R A T L 1 d
6 貫膜ドメインポリペプチドを免疫原性および/または抗原性エピトープ、または本明細
書の別の箇所に記載しているようなエピトープの供給源として用いることも含まれる。

10

【0150】

好ましい態様において、下記N末端R A T L 1 d 6 インター貫膜ドメイン欠失ポリペプチ
ドが本発明に含まれる：配列番号2の、

【化7】

P1-R245, H2-R245, L3-R245, P4-R245, P5-R245, R6-
 R245, G7-R245, S8-R245, V9-R245, P10-R245, G11-R245, D12-R245,
 P13-R245, V14-R245, R15-R245, I16-R245, H17-R245, C18-R245, N19-
 R245, I20-R245, T21-R245, E22-R245, S23-R245, Y24-R245, P25-R245,
 A26-R245, V27-R245, P28-R245, P29-R245, I30-R245, W31-R245, S32-
 R245, V33-R245, E34-R245, S35-R245, D36-R245, D37-R245, P38-R245,
 N39-R245, L40-R245, A41-R245, A42-R245, V43-R245, L44-R245, E45-
 R245, R46-R245, L47-R245, V48-R245, D49-R245, I50-R245, K51-R245,
 K52-R245, G53-R245, N54-R245, T55-R245, L56-R245, L57-R245, L58-
 R245, Q59-R245, H60-R245, L61-R245, K62-R245, R63-R245, I64-R245,
 I65-R245, S66-R245, D67-R245, L68-R245, C69-R245, K70-R245, L71-
 R245, Y72-R245, N73-R245, L74-R245, P75-R245, Q76-R245, H77-R245,
 P78-R245, D79-R245, V80-R245, E81-R245, M82-R245, L83-R245, D84-
 R245, Q85-R245, P86-R245, L87-R245, P88-R245, A89-R245, E90-R245,
 Q91-R245, C92-R245, T93-R245, Q94-R245, E95-R245, D96-R245, V97-
 R245, S98-R245, S99-R245, E100-R245, D101-R245, E102-R245, D103-
 R245, E104-R245, E105-R245, M106-R245, P107-R245, E108-R245,
 D109-R245, T110-R245, E111-R245, D112-R245, L113-R245, D114-R245,
 H115-R245, Y116-R245, E117-R245, M118-R245, K119-R245, E120-R245,
 E121-R245, E122-R245, P123-R245, A124-R245, E125-R245, G126-R245,
 K127-R245, K128-R245, S129-R245, E130-R245, D131-R245, D132-R245,
 G133-R245, I134-R245, G135-R245, K136-R245, E137-R245, N138-R245,
 L139-R245, A140-R245, I141-R245, L142-R245, E143-R245, K144-R245,
 I145-R245, K146-R245, K147-R245, N148-R245, Q149-R245, R150-R245,
 Q151-R245, D152-R245, Y153-R245, L154-R245, N155-R245, G156-R245,
 A157-R245, V158-R245, S159-R245, G160-R245, S161-R245, V162-R245,
 Q163-R245, A164-R245, T165-R245, D166-R245, R167-R245, L168-R245,
 M169-R245, K170-R245, E171-R245, L172-R245, R173-R245, D174-R245,
 I175-R245, Y176-R245, R177-R245, S178-R245, Q179-R245, S180-R245,

10

20

30

40

【 0 1 5 1 】

【 化 8 】

F181-R245, K182-R245, G183-R245, G184-R245, N185-R245, Y186-R245, A187-R245, V188-R245, E189-R245, L190-R245, V191-R245, N192-R245, D193-R245, S194-R245, L195-R245, Y196-R245, D197-R245, W198-R245, N199-R245, V200-R245, K201-R245, L202-R245, L203-R245, K204-R245, V205-R245, D206-R245, Q207-R245, D208-R245, S209-R245, A210-R245, L211-R245, H212-R245, N213-R245, D214-R245, L215-R245, Q216-R245, I217-R245, L218-R245, K219-R245, E220-R245, K221-R245, E222-R245, G223-R245, A224-R245, D225-R245, F226-R245, I227-R245, L228-R245, L229-R245, N230-R245, F231-R245, S232-R245, F233-R245, K234-R245, D235-R245, N236-R245, F237-R245, P238-R245, および / または F239-R245。

10

【 0 1 5 2 】

これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列も提供する。本発明には、これら N 末端 R A T L 1 d 6 インター貫膜ドメイン欠失ポリペプチドを本明細書の他の箇所に記載の免疫原性および / または抗原性エピトープとして用いることも含まれる。

【 0 1 5 3 】

他の好ましい態様において、下記 C 末端 R A T L 1 d 6 インター貫膜ドメイン欠失ポリペプチドが本発明に含まれる：配列番号 2 の、

20

【 化 9 】

P1-R245, P1-V244, P1-F243, P1-P242, P1-P241, P1-D240, P1-F239, P1-P238, P1-F237, P1-N236, P1-D235, P1-K234, P1-F233, P1-S232, P1-F231, P1-N230, P1-L229, P1-L228, P1-I227, P1-F226, P1-D225, P1-A224, P1-G223, P1-E222, P1-K221, P1-E220, P1-K219, P1-L218, P1-I217, P1-Q216, P1-L215, P1-D214, P1-N213, P1-H212, P1-L211, P1-A210, P1-S209, P1-D208, P1-Q207, P1-D206, P1-V205, P1-K204, P1-L203, P1-L202, P1-K201, P1-V200, P1-N199, P1-W198, P1-D197, P1-Y196, P1-L195, P1-S194, P1-D193, P1-N192, P1-V191, P1-L190, P1-E189, P1-V188, P1-A187, P1-Y186, P1-N185, P1-G184, P1-G183, P1-K182, P1-F181, P1-S180, P1-Q179, P1-S178, P1-R177, P1-Y176, P1-I175, P1-D174, P1-R173, P1-L172, P1-E171, P1-K170, P1-M169, P1-L168, P1-R167, P1-D166, P1-T165, P1-A164, P1-Q163, P1-V162, P1-S161, P1-G160, P1-S159, P1-V158, P1-A157, P1-G156, P1-N155, P1-L154, P1-Y153, P1-D152, P1-Q151, P1-R150, P1-Q149, P1-N148, P1-K147, P1-K146, P1-I145, P1-K144, P1-E143, P1-L142, P1-I141, P1-A140,

30

40

【 0 1 5 4 】

【 化 1 0 】

P1-L139, P1-N138, P1-E137, P1-K136, P1-G135, P1-I134, P1-G133, P1-D132, P1-D131, P1-E130, P1-S129, P1-K128, P1-K127, P1-G126, P1-E125, P1-A124, P1-P123, P1-E122, P1-E121, P1-E120, P1-K119, P1-M118, P1-E117, P1-Y116, P1-H115, P1-D114, P1-L113, P1-D112, P1-E111, P1-T110, P1-D109, P1-E108, P1-P107, P1-M106, P1-E105, P1-E104, P1-D103, P1-E102, P1-D101, P1-E100, P1-S99, P1-S98, P1-V97, P1-D96, P1-E95, P1-Q94, P1-T93, P1-C92, P1-Q91, P1-E90, P1-A89, P1-P88, P1-L87, P1-P86, P1-Q85, P1-D84, P1-L83, P1-M82, P1-E81, P1-V80, P1-D79, P1-P78, P1-H77, P1-Q76, P1-P75, P1-L74, P1-N73, P1-Y72, P1-L71, P1-K70, P1-C69, P1-L68, P1-D67, P1-S66, P1-I65, P1-I64, P1-R63, P1-K62, P1-L61, P1-H60, P1-Q59, P1-L58, P1-L57, P1-L56, P1-T55, P1-N54, P1-G53, P1-K52, P1-K51, P1-I50, P1-D49, P1-V48, P1-L47, P1-R46, P1-E45, P1-L44, P1-V43, P1-A42, P1-A41, P1-L40, P1-N39, P1-P38, P1-D37, P1-D36, P1-S35, P1-E34, P1-V33, P1-S32, P1-W31, P1-I30, P1-P29, P1-P28, P1-V27, P1-A26, P1-P25, P1-Y24, P1-S23, P1-E22, P1-T21, P1-I20, P1-N19, P1-C18, P1-H17, P1-I16, P1-R15, P1-V14, P1-P13, P1-D12, P1-G11, P1-P10, P1-V9, P1-S8, および/または P1-G7。

10

20

【0155】

これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列も提供する。本発明には、これら C 末端 R A T L 1 d 6 インター貫膜ドメイン欠失ポリペプチドを本明細書の他の箇所に記載の免疫原性および/または抗原性エピトープとして用いることも含まれる。

【0156】

治療薬

R A T L 1 d 6 ポリペプチドは、既知のユビキチン結合酵素との相同性を有するので、U B C タンパク質ファミリーの新しいメンバーとして提供される。R A T L 1 d 6 は、活性化 T リンパ球中に発現し、それから単離されたので、R A T L 1 d 6 生成物は、例えば細胞周期調節および/または細胞シグナリングにおける免疫障害、例えばリンパ増殖性疾患に役割を果たすかもしれない。他のユビキチン結合酵素ファミリーメンバーと同様にして、R A T L 1 d 6 タンパク質はさらに、さらに以下に記載の細胞周期および細胞シグナリング活性にも関連し得る新生物、発育、および神経障害に関連するかもしれない。特にリンパ増殖性疾患および炎症に関して、R A T L 1 d 6 タンパク質のインヒビターはリンパ球様細胞が細胞周期に入るのを抑制し、または細胞内シグナリング事象をブロックすることにより免疫抑制剤として役割を果たすかもしれない。さらに、R A T L 1 d 6 インヒビターは抗炎症剤として役立つかもしれない。

30

40

【0157】

腫瘍サプレッサータンパク質、例えば p 5 3 の E 2 酵素による分解は、新生物障害の発生に関与するかもしれない。したがって、本発明のある態様において、R A T L 1 d 6 ポリペプチドのアンタゴニストまたはインヒビターを個体に投与し、新生物障害を予防または治療することができよう。そのような障害には、限定されるものではないが、アデノカルチノーマ、白血病、リンパ肉腫、メラノーマ、肉腫、および奇形癌、特に副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、子宮頸部、膀胱、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、ペニス、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、およ

50

び子宮の癌が含まれる。上記起源の癌または腫瘍において、ユビキチン化のプロッキングは、半減期、すなわち p 5 3 の機能を持続させるかもしれない。関連する局面において、R A T L 1 d 6 と特異的に結合する抗体を、アンタゴニストとして直接に、または R A T L 1 d 6 ポリペプチドを発現する細胞または組織に医薬物質を運ぶ標的化または送達メカニズムとして間接的に用いてよい。

【0158】

関連する態様において、R A T L 1 d 6 機能のインヒビターは、ヒト乳癌で高頻度で突然変異することがわかっている腫瘍感受性遺伝子 T S G 1 0 1 と同様に、R A T L 1 d 6 タンパク質生成物のような U B C に負の優性形質 (d o m i n a n t) として機能することにより免疫抑制薬として、または特にリンパ増殖性疾患の治療に抗癌薬または剤として有用かもしれない (C . P . P o n t i n g r a , 1 9 9 7 , J . M o l . M e d . , 7 5 : 4 6 7 - 4 6 9 ; L . L i r a , 1 9 9 7 , C e l l , 8 8 : 1 4 3 - 1 5 4) 。 T S G 1 0 1 は、ユビキチン結合酵素と相同性を有するが通常 E 2 タンパク質に存在し、酵素機能に必要な保存されたシステインを欠く生成物をコードする腫瘍抑制遺伝子とみなされている (C . P . P o n t i n g r a , 上 記) 。 T S G 1 0 1 は、短命なタンパク質のユビキチン化において優性の負の調節因子として機能することも報告されている (C . P . P o n t i n g r a , 上 記 , お よ び E . V . K o o n i n お よ び R . A . A b a g y a n , 1 9 9 7 , N a t u r e G e n e t i c s , 1 6 : 3 3 0 - 3 3 1) 。したがって、本発明の R A T L 1 d 6 のようなある種の U B C のアンタゴニストも T S G 1 0 1 生成物のそれと同様に作用し、T 細胞および B 細胞リンパ増殖性障害を含む癌の治療に、および / または有害な免疫系の応答を抑制する物質として有用かもしれない。

10

20

【0159】

R A T L 1 d 6 が固有免疫の鍵となる重要な経路である N F - B 経路に負の役割を果たすことは、この遺伝子産物のアンタゴニストが固有免疫を活性化するかもしれないことを示唆する。固有免疫は細菌、真菌、ウイルスなどを含む微生物病原体に対する防御の最前線である。固有免疫を担う免疫系の細胞は主としてマクロファージ / 単球、および範囲が限られるが好中球である。理論に束縛されることを望まないが、R A T L 1 d 6 のアンタゴニストは固有の免疫応答を増強し、ヒトに病原体が侵入するのを防御し得ると考えられる。反対に、R A T L 1 d 6 のアゴニストは、N F - B 経路を阻害し、炎症反応を弱めると期待される。したがって、R A T L 1 d 6 のアゴニストは、リウマチ性関節炎、喘息、多発性硬化症、骨関節症などを含む炎症性疾患の治療に有用かもしれない。

30

【0160】

R A T L 1 d 6 は T 細胞ライブラリー中に同定されたので、このことは該遺伝子産物も適応免疫応答の調節に役割を果たすかもしれないことを示唆する。適応免疫応答は主として T 細胞によって取りつがれ、外来抗原および自己免疫疾患の場合は天然抗原のプロセッシングおよび表示を必要とする。T 細胞性反応はワクチン接種後の免疫の発現、および腫瘍細胞の排除に重要である。すなわち、R A T L 1 d 6 のアンタゴニストはワクチン接種後のヒトの免疫を増強するかもしれないと予測されよう。R A T L 1 d 6 遺伝子または遺伝子産物も腫瘍に対する免疫応答を増強するかもしれない。反対に、この遺伝子のアゴニストは T 細胞性自己免疫疾患、例えばリウマチ性関節炎、多発性硬化症、乾癬などの治療に有用かもしれない。

40

【0161】

R A T L 1 d 6 タンパク質またはその機能的部分は、免疫抑制が必要な患者、好ましくはヒトの免疫応答を抑制する方法に用いることができる。例えば、アンタゴニストまたはアゴニストは、R A T L 1 d 6 タンパク質またはその部分の活性を調節する有効量を患者に投与することにより免疫抑制効果を生じさせることができる。R A T L 1 d 6 活性のアゴニストまたはアクチベーターの場合、細胞レセプター、好ましくは T 細胞レセプター、またはその成分もしくは相互作用成分のユビキチン化、次いで該レセプター活性の下方調節により免疫抑制を生じさせることができよう。

【0162】

50

UCSの酵素による神経タンパク質(A P)のプロセシングの異常は神経障害の原因となるかもしれない。UCSは神経組織にみいだされるので、UCS依存性タンパク質分解に関与するタンパク質ファミリーのメンバーであるらしいR A T L 1 d 6ポリペプチドは、例えばR A T L 1 d 6ポリペプチドのアンタゴニストにより影響を受けるかもしれない。したがって、R A T L 1 d 6ポリペプチドアンタゴニストを対象に投与して神経障害を予防または治療することができよう。そのような障害には、限定されるものではないが、アルツハイマー病、健忘症、筋萎縮性側索硬化症、双極性障害、緊張型分裂病、脳新生物、痴呆、鬱病、ダウン症候群、遅発性ジスキネジア、ジストニー、てんかん、ハンチントン舞蹈病、多発性硬化症、パーキンソン病、偏執性精神病、精神分裂病、およびトゥレット病が含まれよう。

10

【0163】

本発明の好ましい態様において、R A T L 1 d 6ポリペプチドのアンタゴニストまたは阻害物質を個体に投与し、免疫障害または免疫関連障害を予防または治療することができよう。そのような障害には、限定されるものではないが、エイズ、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、気管支炎、胆嚢炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、気腫、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、痛風、グレブス病、好酸球増多症、過敏性腸症候群、紅斑性狼瘡、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心嚢の炎症、変形性関節症、骨粗鬆症、膵炎、多発性筋炎、関節リウマチ、強皮症、シェーグレン症候群、および自己免疫性甲状腺炎；血液透析、体外循環、癌の合併症；ウイルス、細菌、真菌、寄生虫(*parasitic*)、原性動物、および寄生虫(*helminthic*)感染、および外傷が含まれる。R A T L 1 d 6インヒビターまたはアンタゴニストを用いて例えば充実性臓器または骨髄移植における移植片拒絶を抑制し、または骨髄移植後の移植片対宿主疾患を抑制することができよう。

20

【0164】

本発明の別の態様において、R A T L 1 d 6ポリペプチドのアンタゴニストをそれを必要とする個体に投与して発育障害を予防または治療することができよう。そのような障害には、限定されるものではないが、尿細管性アシドーシス、クッシング諸侯群、骨発育不全性小人症、デュシェーヌおよびベッカー筋ジストロフィー、性器発育異常症、骨髄異形成症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、遺伝性ニューロパシー、例えばシャルコー・マリー・トゥース病、および神経線維腫症、甲状腺機能低下症、水頭症、発作性障害、例えばSyndehamコレラおよび脳性小児麻痺、脊椎披裂、および先天性緑内障、白内障、または感音難聴が含まれる。

30

【0165】

本発明の別の態様において、R A T L 1 d 6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの相補物を含む発現ベクターを個体に投与し、限定されるものではないが上記タイプの癌および腫瘍を含む新生物障害を治療または予防することができよう。

【0166】

本発明の別の態様において、R A T L 1 d 6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの相補物を含む発現ベクターを個体に投与し、限定されるものではないが上記タイプの障害を含む神経障害を治療または予防することができよう。

40

【0167】

本発明のさらに別の態様において、R A T L 1 d 6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの相補物を含む発現ベクターを個体に投与し、限定されるものではないが上記タイプの免疫障害を含む免疫障害を治療または予防することができよう。

【0168】

本発明のさらなる態様において、R A T L 1 d 6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの相補物を含む発現ベクターを個体に投与し、限定されるものではないが上記タイプの障害を含む発育障害を治療または予防することができよう。

【0169】

50

別の態様において、本発明のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補的配列またはベクターを他の適切な治療薬と組み合わせて投与することができる。併用療法に用いるのに適した物質の選択は、常套的医薬的原則にしたがって当業者が行うことができよう。治療薬の組み合わせは、上記種々の障害の治療または予防に相乗的に作用するかもしれない。このアプローチを用い、より低用量の各薬剤で、すなわち副作用の潜在性を減少させて治療効果を達成することができよう。

【0170】

本発明の R A T L 1 d 6 ポリペプチドのアンタゴニストまたはインヒビターは、当該分野で一般に知られた方法を用いて製造することができよう。特に、精製 R A T L 1 d 6 タンパク質またはその断片を用いて抗体を製造し、または例えば当該分野で知られ、実施されている高処理能力のスクリーニング技術により医薬物質のライブラリーをスクリーニングし、R A T L 1 d 6 と特異的に結合するものを同定することができる。

10

【0171】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはその免疫原性ペプチド断片に特異的な抗体は、当該分野で長く知られ、常套的に実施されている方法を用いて製造することができる。そのような抗体には、限定されるものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、F a b 断片、および F a b 発現ライブラリーにより製造される断片が含まれてよい。中和抗体（すなわち、二量体形成を阻害するもの）は治療的使用に特に好ましい。ポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗 R A T L 1 d 6 抗体産生には、完全長 R A T L 1 d 6 ポリペプチドを免疫原として用いることができるか、または完全長ポリペプチドの部分を用いることができる。好ましくは、免疫原として用いる R A T L 1 d 6 ポリペプチドの部分には、該タンパク質の U B C（例えば残基 2 4 6 - 4 2 2）または非 U B C（例えば残基 1 - 2 4 5）ドメインのようなドメインが含まれる。

20

【0172】

抗体を製造するには、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ラット、マウス、ヒトその他を含む種々の宿主を、R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたは免疫原性特性を有するそのあらゆる断片またはオリゴペプチドを注射することにより免疫することができる。宿主種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を増大させることができよう。適切なアジュバントの非限定的例には、フロインド（完全または不完全）、R I B I、鉍物ゲル、例えば水酸化アルミニウムまたはシリカ、および表面活性物質、例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、K L H、およびジニトロフェノールが含まれる。ヒトで通常用いられるアジュバントには B C G（カルメット・ゲラン菌）および *Corynebacterium parvum* が含まれる。

30

【0173】

好ましくは、R A T L 1 d 6 ポリペプチドに対する抗体を誘導するのに用いるペプチド s、断片またはオリゴペプチド（すなわち免疫原）は、少なくとも 5 個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも 7 - 10 個のアミノ酸を有するアミノ酸配列を有する。免疫原が天然タンパク質のアミノ酸配列の部分と同じであることも好ましく、小天然分子の完全アミノ酸配列を含んでいてもよい。ペプチド、断片またはオリゴペプチドは、単一エピトープまたは抗原性決定基、または複数のエピトープを含んでいてよい。R A T L 1 d 6 アミノ酸の短ストレッチを別のタンパク質、例えば K L H のそれと融合または共有結合させてよく、抗体は該キメラ分子に対して産生される。

40

【0174】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはその免疫原性断片に対するモノクローナル抗体は、培養中の連続細胞株により抗体分子を産生するためのあらゆる技術を用いて製造することができよう。これらには、限定されるものではないが、ハイブリドーマ技術、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術、および E B V - ハイブリドーマ技術が含まれる（G . K o h l e r ら、1975、Nature、256：495 - 497；D . K o z b o r ら、1985、J . I m m u n o l . M e t h o d s、81：31 - 42；R . J . C o t e ら、1983、Proc . Natl . Acad . Sci . USA、80：2026 -

50

2030; および S. P. Coleら、1984、Mol. Cell Biol.、62:109-120)。モノクローナル抗体の製造は当該分野でよく知られ、日常的に用いられている。

【0175】

さらに、「キメラ抗体」を製造するために開発された技術である適切な抗原特異性と生物活性を有する分子を含ませるためのヒト抗体遺伝子に対するマウス抗体遺伝子のスプライシングも用いることができる(S. L. Morrisonら、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81:6851-6855; M. S. Neubergerら、1984、Nature、312:604-608; および S. Takedaら、1985、Nature、314:452-454)。あるいはまた、1本鎖抗体の製造するために記載された技術を、当該分野で知られた方法を用いて適応させ、RATL1d6ポリペプチド特異的1本鎖抗体を製造してよい。関連特異性を有するがイデオタイプ組成が異なる抗体を、ランダムコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーのチェーンシャッフリングにより生成してよい(D. R. Burton、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:11120-3)。リンパ球ポピュレーションを用いる *in vivo* 生成を誘導し、または組換え免疫グロブリンライブラリーまたは文献に開示の特異性の高い結合試薬のパネルをスクリーニングすることにより抗体を製造してもよい(R. Orlandiら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86:3833-3837、および G. Winterら、1991、Nature、349:293-299)。

10

20

【0176】

RATL1d6ポリペプチドに対する特異的結合部位を含む抗体断片を生成してもよい。例えば、そのような断片には、限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化により生成することができるF(ab')₂断片、およびF(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することにより生成することができるFab断片が含まれる。あるいはまた、Fab発現ライブラリーを構築し、所望の特異性を有するモノクローナルFab断片を速やかに容易に同定することができよう(W. D. Huseら、1989、Science、254:1275-1281)。

【0177】

種々のイムノアッセイを、所望の特異性を有する抗体を同定するスクリーニングに用いることができる。確立された特異性を有するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いる競合結合または免疫放射アッセイ用の多くのプロトコールが当該分野でよく知られている。そのようなイムノアッセイは、典型的にはRATL1d6ポリペプチドとその特異抗体の間の複合体形成を測定することを含む。2つの非干渉RATL1d6ポリペプチドエピトープと反応するモノクローナル抗体を利用する2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが好ましいが、競合結合アッセイを用いてもよい(Maddox、上記)。

30

【0178】

本発明のある態様において、RATL1d6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはそのあらゆる断片または相補物を治療目的に用いることができよう。ある局面において、RATL1d6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対するアンチセンスを、少なくともある場合にmRNAの変性によりmRNAの翻訳をブロックするのが望ましい状況で用いてよい。特に、細胞をRATL1d6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な配列で形質転換してよい。すなわち、相補的分子を用いてRATL1d6ポリヌクレオチドおよびポリペプチド活性を調節し、または遺伝子機能の制御を達成することができよう。そのような技術は現在当該分野でよく知られており、センスまたはアンチセンスオリゴマーまたはオリゴヌクレオチド、またはより大きな断片をRATL1d6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのコーディングまたは制御領域に沿った種々の位置から設計することができる。

40

【0179】

レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスまたはワクシニアウイルス由来、または種々

50

の細菌プラスミド由来の発現ベクターを用いて、標的器官、組織または細胞ポピュレーションにヌクレオチド配列を送達することができよう。当業者によく知られた方法を用いて R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードする核酸配列と相補的な核酸配列を発現する組換えベクターを構築することができる。これら技術は J . S a m b r o o k ら、上記、および F . M . A u s u b e l ら、上記に記載されている。

【0180】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードする遺伝子は、細胞または組織を、R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその断片を高レベルに発現する発現ベクターで形質転換することにより生成することができる。そのような構築物を用いて非翻訳 (u n t r a n s l a t a b l e) センスまたはアンチセンス配列を細胞に導入してよい。該 DNA 中への統合がなくても、そのようなベクターは内在性ヌクレアーゼにより不能になるまで RNA 分子を転写し続けることができよう。一時的発現は、非複製ベクターを用いて 1 月またはそれ以上、また、適切な複製エレメントが該ベクター系の部分に設計されている場合はそれ以上持続することができよう。

10

【0181】

遺伝子発現の修飾は、R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードする遺伝子の制御、5' または調節領域 (例えば、シグナル配列、プロモーター、エンハンサー、およびイントロン) に対するアンチセンス分子または相補的核酸配列 (DNA、RNA または PNA) を設計することにより得ることができる。例えば出発部位から - 10 ~ + 10 位の転写開始部位由来のオリゴヌクレオチドが好ましい。同様に、「三重ラセン」塩基対化方法論を用いて阻害を達成することができる。三重ラセンペアリングはポリメラーゼ、転写因子または制御分子を結合するために二本鎖が十分開く能力を阻害するので有用である。三重 DNA を用いる最近の治療的進歩が記載されている (例えば、J . E . G e e ら、1994、B . E . H u b e r および B . I . C a r r、M o l e c u l a r a n d I m m u n o l o g i c A p p r o a c h e s、F u t u r a P u b l i s h i n g C o .、M t . K i s c o、NY、中、参照)。転写物がリボソームに結合するのを抑制し、または転写物の分解を生じることにより mRNA の翻訳をブロックするように該アンチセンス分子または相補的配列を設計してもよい。

20

【0182】

リボザイム、すなわち酵素的 RNA 分子を用いて、RNA の特異的開裂を触媒してもよい。リボザイムの作用メカニズムには、リボザイム分子の相補的標的 RNA との配列特異的ハイブリダイゼーション、次いで内ヌクレオチド結合分解性の開裂が含まれる。適切な例には、R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードする配列の内ヌクレオチド結合分解性の開裂を特異的および効率的に触媒する操作したハンマーヘッドモチーフリボザイム分子が含まれる。

30

【0183】

あらゆる潜在的 RNA 標的中の特異的リボザイム開裂部位を、以下の配列：GUA、GUU および GUC を含むリボザイム開裂部位について標的分子を検査することにより最初に同定する。同定したら、該開裂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 RNA 配列を、オリゴヌクレオチドを操作不能にし得る第 2 の構造的特徴について評価してよい。候補標的の適性を、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いる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への接近可能性を試験することにより評価してもよい。

40

【0184】

本発明の相補的リボ核酸分子およびリボザイムは、核酸分子を合成するための当該分野で知られたあらゆる方法により製造することができよう。そのような方法には、オリゴヌクレオチドを化学的に合成する技術、例えば、固相ホスホラミダイト化学合成が含まれる。あるいはまた、RNA 分子は R A T L 1 d 6 をコードする DNA 配列の *i n v i t r o* および *i n v i v o* 転写により生成することができよう。そのような DNA 配列は、適切な RNA ポリメラーゼプロモーター、例えば T7 または SP を含む種々のベクターに組

50

みこむことができよう。あるいはまた、相補的RNAを構成性または誘導性に合成するcDNA構築物を細胞株、細胞、または組織中に導入することができる。

【0185】

RNA分子を修飾して細胞内安定性および半減期を増大させることができよう。可能な修飾には、限定されるものではないが、該分子の5'および/または3'末端にフランキング配列を付加し、または該分子のバックボーン内にホスホジエステラーゼ結合でなくホスホチオエートまたは2'-O-メチル結合を用いることが含まれる。この概念はRNAの製造に固有であり、内因性エンドヌクレアーゼにより容易に認識されない非伝統的塩基、例えばイノシン、クエオシン、およびウィブトシン、ならびにアデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンのアセチル-、メチル-、チオ-、および同様の修飾形を含めることによりこれら分子のすべてに広げることができる。

10

【0186】

細胞または組織中にベクターを導入する多くの方法が利用でき、*in vivo*、*in vitro*および*ex vivo*で使用するのに同等に適している。*ex vivo*療法では、ベクターを患者から得た幹細胞に導入し、クローン的に増殖させ、同じ患者に自己移植する。当該分野でよく知られた方法を用い、トランスフェクションおよびリポソーム注射により送達を達成することができる。

【0187】

あらゆる上記治療方法を、例えば、哺乳動物、例えばイヌ、ネコ、乳牛、ウマ、ウサギ、サルを含むそのような療法を必要とするあらゆる個体、最も好ましくはヒトに適用することができる。

20

【0188】

本発明のさらなる態様には、あらゆる上記治療的使用および治療効果を得るために医薬組成物を医薬的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて投与することが含まれる。そのような医薬組成物は、RATL1d6核酸、ポリペプチド、またはペプチド、RATL1d6ポリペプチドに対する抗体、RATL1d6ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの模倣物、アゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターを含んでよい。該組成物は、単独で、または限定されるものではないが生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、および水を含むあらゆる無菌の生体適合性の医薬的担体を用いて投与することができる少なくとも1つの他の物質、例えば安定化化合物と組み合わせて投与することができる。

30

【0189】

本発明に用いる医薬組成物は、限定されるものではないが経口、静脈内、筋肉内、動脈内、脊髄内、鞘内(くも膜下)、脳室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻内、経腸、局所、舌下、腔内、または直腸法を含むあらゆる多くの経路により投与することができる。

【0190】

活性成分(すなわち、RATL1d6核酸またはポリペプチド、またはその機能的断片)に加え、医薬組成物は、活性化化合物を医薬的に用いることができる製剤に加工するのを促進する補助物質を含む適切な医薬的に許容される担体または賦形剤を含んでよい。製剤化と投与に関する技術に関するさらなる詳細はRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版(Mack Publishing Co.、Easton、Pa.)に記載されている。

40

【0191】

経口投与用の医薬組成物は、当該分野でよく知られた医薬的に許容される担体を用いて経口投与に適した用量に製剤化することができる。そのような担体は、医薬組成物を患者が摂取するための、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、サスペンション剤などとして製剤化するのを可能にする。

【0192】

経口用途の医薬製剤は、活性化化合物と固体賦形剤を混合し、得られた混合物を所望により

50

粉碎し、所望により適切な補助物質を添加した後、顆粒の混合物を加工して錠剤または糖衣錠のコアを得ることにより得ることができる。適切な賦形剤には、炭水化物やタンパク質充填剤、例えば、乳糖、ショ糖、マンニトール、またソルビトールを含む糖；トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモ、または他の植物由来のデンプン；セルロース、例えばメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはナトリウムカルボキシメチルセルロース；アラビアおよびトラガカントを含むゴム；およびタンパク質、例えばゼラチンおよびコラーゲンがある。所望により、崩壊剤または可溶化剤、例えば架橋ポリピロリドン、寒天、アルギニン酸、またはその医薬的に許容される塩、例えばアルギニン酸ナトリウムを加えてよい。

【0193】

糖衣錠のコアは、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボボル (carbopol) ゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物を含んでいてもよい、濃縮糖溶液のような生理学的に適したコーティングと一緒に用いることができよう。製品の種類を確認し、または活性化化合物の量、すなわち用量を特徴付けるために、染料または色素を錠剤または糖衣錠コーティングに加えてよい。

【0194】

経口的に用いることができる医薬製剤には、ゼラチン製プッシュフィットカプセル、およびゼラチン製軟うろこ状 (scaled) カプセル、およびコーティング、例えばグリセロールまたはソルビトールが含まれる。プッシュフィットカプセルは、充填剤または結合剤、例えば乳糖またはデンプン、潤滑剤、例えばタルクまたはステアリン酸マグネシウム、および所望により安定化剤と混合した活性成分を含むことができる。軟カプセルにおいて、活性化化合物は、安定化剤を含むか含まない、適切な液体、例えば脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁してよい。

【0195】

非経口投与に適した医薬製剤は、液体溶液、好ましくは生理学的に適合性の緩衝液、例えばハンス溶液、リングル溶液または生理学的緩衝生理食塩水を用いて製剤化してよい。水性注射用サスペンションは、サスペンションの粘性を増加させる物質、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストランを含んでいてよい。さらに、活性化化合物のサスペンションは適切な油状注射用サスペンションとして製造してよい。適切な脂溶性溶媒またはビークルには脂肪油、例えばごま油、合成脂肪酸エステル、例えばエチルオレート、またはトリグリセリドまたはリポソームが含まれる。所望により、サスペンションは、適切な安定化剤または高度に濃縮された溶液の製造を可能にする化合物の可溶性を増大させる物質を含んでいてよい。

【0196】

局所または鼻内投与用には、浸透すべき特定のバリアーに適した浸透剤または浸透物質を製剤に用いる。そのような浸透剤は一般に当該分野で知られている。

【0197】

本発明の医薬組成物は、当該分野で知られた方法、例えば常套的混合、溶解、顆粒化、糖衣錠化、糊状化 (levigating)、乳化、カプセル化、取込み (entrapment)、または凍結乾燥法により製造することができる。

【0198】

医薬組成物は塩として提供してよく、限定されるものではないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、琥珀酸などを含む多くの酸を用いて形成することができる。塩は対応する遊離塩基形よりも水性溶媒または他のプロトン性溶媒に対して可溶性であるという傾向がある。他の場合において、好ましい製剤は、以下の、1 - 50 mM ヒスチジン、0.1% - 2% ショ糖、および 2 - 7% マンニトール (pH 範囲、4.5 ~ 5.5) のすべてまたはあらゆるものを含んでいてよい凍結乾燥粉末 (使用前に緩衝液と混合) であってよい。医薬組成物を製造した後、それを適切な容器に入れ、示した病状を治療するためのラベルを貼ることができる。RATL1d6 製品を投与するにはそのようなラベルには

10

20

30

40

50

、投与量、投与頻度、および投与方法が含まれよう。

【0199】

本発明に用いるのに適した医薬組成物には、活性成分が意図する目的を達成するための有効量で含まれる組成物が含まれる。有効用量または有効量の決定は十分当業者の能力の範囲内である。あらゆる化合物について、治療的有效量は、例えば新生物細胞を用いる細胞培養アッセイ、または動物モデル、通常マウス、ウサギ、イヌまたはブタを用いて最初に推定することができる。動物モデルを用いて適切な濃度範囲と投与経路を決定することもできよう。次に、そのような情報を用いてヒトにおける有用な用量と投与経路を決定するために外挿することができる。

【0200】

治療的有效用量は、有効成分、例えば、症状または病状を改善し、軽減し、または排除する R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはその断片、R A T L 1 d 6 ポリペプチドに対する抗体、R A T L 1 d 6 ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターの該量を表す。治療効果および毒性は、細胞培養または実験動物を用いる標準的な医薬的方法、例えば E D₅₀ (ポピュレーションの 50% に対して治療的に有効な用量) および L D₅₀ (ポピュレーションの 50% に対して致死的な用量) により決定することができる。毒性に対する治療効果の用量比が治療指数であり、比 L D₅₀ / E D₅₀ で表すことができる。治療指数の大きな医薬組成物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータを用いてヒトで使用する用量範囲を決定する。医薬組成物に含まれる好ましい用量は、毒性がほとんどまたはまったくない E D₅₀ を含む血中 (循環) 濃度の範囲内である。用量は、用いる剤形、患者の感受性および投与経路に応じてこの範囲内で変化する。

【0201】

正確な用量は、治療を要する個体に関連する因子を考慮して担当医師が決定するであろう。用量および投与は活性成分を十分なレベルとするか、または所望の効果を維持するように調整される。考慮する因子には、個々の疾患の状態の重症度、患者の一般的健康状態、患者の年齢、体重、および性別、食事、投与の時間と頻度、薬剤の組み合わせ、反応感受性、および治療に対するトランス / 反応が含まれる。一般的指針として、長時間作用性 (持続性) 医薬組成物を、医薬製剤の半減期およびクリアランス速度に応じて 3 ~ 4 日毎、1 週間毎、または 2 週間毎に一度投与することができる。

【0202】

正常投与量は、投与経路に応じて 0.1 ~ 100,000 マイクログラム (μg)、総用量約 1 グラム (g) までで変化してよい。特定用量および送達法に関する指針は、文献に示されており、当業者が一般に利用可能である。当業者はヌクレオチド用にタンパク質またはそのインヒビター用とは異なる製剤を用いるであろう。同様に、ポリヌクレオチドやポリペプチドの送達は、特定の細胞、病状、位置などに特異的であろう。

【0203】

本発明の別の態様において、R A T L 1 d 6 ポリペプチドと特異的に結合する抗体は、R A T L 1 d 6 ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現 (または過剰発現) を特徴とする病状または疾患の診断、または R A T L 1 d 6 ポリペプチドもしくはそのアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターで治療している患者をモニターするアッセイに用いることができよう。診断目的に有用な抗体は、治療的方法に用いるための上記方法と同様に製造することができる。R A T L 1 d 6 ポリペプチドの診断的アッセイには、ヒトの体液または細胞もしくは組織抽出物中の該タンパク質を検出するために抗体および標識を用いる方法が含まれる。該抗体は修飾するかまたは修飾せずに用いてよく、レポーター分子と共有結合または非共有結合により標識してよい。当該分野で知られている種々のレポーター分子 (そのいくつかは先に記載) を用いてよい。

【0204】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドを測定するための E L I S A、R I A および F A C S を含むいくつかのアッセイプロトコールが当該分野で知られており、R A T L 1 d 6 ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドの変化したもしくは異常な発現レベルを診断するための基準を提供する。R A T L 1 d 6 ポリペプチド発現の正常値または標準値は、正常哺乳動物対象、好ましくはヒトから得た体液または細胞抽出物を複合体形成に適した条件下でR A T L 1 d 6 ポリペプチドに対する抗体と混合することにより確立される。標準的複合体形成量は、種々の方法により定量してよいが、光度測定法が好ましい。生検組織由来の対象試料、コントロール試料、および疾患試料に発現したR A T L 1 d 6 ポリペプチドの量を標準値と比較する。標準値と対象値の偏差が疾患を診断するためのパラメーターとなる。

【0205】

本発明の別の態様によれば、R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを診断の目的で用いてよい。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およびDNA分子、およびPNAが含まれる。該ポリヌクレオチドを用いて、R A T L 1 d 6 ポリヌクレオチドの発現（または発現不足もしくは過剰発現）が疾患と関連しているかもしれない生検組織中のR A T L 1 d 6 をコードする核酸の発現を検出および定量することができよう。例えば、R A T L 1 d 6 ポリヌクレオチドおよびその断片を用いて、例えば標識R A T L 1 d 6 ポリペプチドをプローブに用い、当該分野で知られ実施されている技術を用いて予後診断、診断、またはモニターの目的で、正常および疾患両組織において*in situ*ハイブリダイゼーションを実施することができよう。R A T L 1 d 6 ポリヌクレオチドは、放射性標識、または当該分野で知られた他の手段、例えば酵素、蛍光、化学ルミネッセンス、またはビオチン-アビジン系により標識することができよう。診断的アッセイを用いてR A T L 1 d 6 の欠如、存在、および過剰発現を区別し、治療的処置または介入時のR A T L 1 d 6 ポリペプチドレベルの調節をモニターすることができよう。

10

20

【0206】

関連する局面において、R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたは密接に関連した分子をコードするゲノム配列を含むポリヌクレオチド配列を検出することができるPCRプローブとのハイブリダイゼーションを用いてR A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードする核酸配列を同定することができよう。高度に特異的な領域、例えば5'制御領域、または特異性の低い領域、例えば特に3'コーディング領域の約8~10連続ヌクレオチドから作製されたか否かに関わらず該プローブの特異性、およびハイブリダイゼーションまたは増幅のストリンジェンシー（最大、高、中程度、または低）は、該プローブがR A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードする天然配列、そのアレル、または関連配列のみを同定するかどうかを決定するであろう。

30

【0207】

プローブは、関連配列を検出するのに用いてよく、R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードする少なくとも50%のヌクレオチドを含むことが好ましい。本発明のハイブリダイゼーションプローブはDNAまたはRNAであってよく、配列番号1のヌクレオチド配列、または天然R A T L 1 d 6 タンパク質のイントロン、プロモーター、およびエンハンサーエレメントを含むゲノム配列由来であってよい。

【0208】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするDNAのための特異的ハイブリダイゼーションプローブの作製方法には、R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはR A T L 1 d 6 誘導体をコードする核酸配列をmRNAプローブ作製のベクター中にクローニングすることが含まれる。そのようなベクターは、当該分野で知られており、市販されており、これを用い、適切なRNAポリメラーゼと適切な標識ヌクレオチドを加えることにより*in vitro*でRNAプローブを合成することができよう。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のディテクター/レポーター基、例えば放射性核種、例えば³²Pまたは³⁵S、または例えばアルカリホスファターゼをアビジン/ビオチンカップリング系などを介して該プローブとカップリングさせる酵素標識により標識することができよう。

40

【0209】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはその断片をコードするポリヌクレオチド配列を用いて

50

R A T L 1 d 6 の発現と関連する障害を診断することができよう。そのような障害または病状の例は、上記「治療薬」に記載している。R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、サザンまたはノーザン分析、ドットプロット、または他の膜ベース技術、P C R 技術、または例えば R A T L 1 d 6 のレベルまたは過剰発現の状態を検出し、または R A T L 1 d 6 発現の変化を検出するための患者の生検から得た組織または液体を利用するディップスティック、ピン、E L I S A またはチップアッセイに用いることができよう。そのような定性または定量法は当該分野でよく知られている。

【0210】

特定の局面において、R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、種々の新生物または癌、特に上記のものの活性化または誘導を検出するアッセイに有用かもしれない。R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を標準的方法により標識し、ハイブリダイゼーション複合体を形成するのに適した条件下で患者由来の液体または組織試料に加えてよい。適切なインキュベーション時間後、試料を洗浄し、信号を定量し、標準値と比較する。生検または抽出試料中の信号の量が同等のコントロール試料のそれと有意に異なる場合は、該ヌクレオチド配列は試料中に存在するヌクレオチド配列とハイブリダイズしており、試料中の R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のレベル変化の存在は関連疾患の存在を示す。そのようなアッセイを用いて、動物試験、臨床試験、または個々の患者の治療のモニターにおいて特定の治療的処置法の効果を評価することもできよう。

10

【0211】

R A T L 1 d 6 の発現と関連した疾患の診断基準を得るために、正常または標準的発現プロフィールを確立する。これは動物またはヒトの正常対象から得た体液または細胞抽出物を、ハイブリダイゼーションまたは増幅に適した条件下で R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードする配列またはその断片と混合することにより達成することができよう。標準的ハイブリダイゼーションは、正常対象から得た値を、既知量の実質的に精製されたポリヌクレオチドを用いた実験から得た値と比較することにより定量することができよう。正常試料から得た標準値を疾患の症状がある患者由来の試料から得た値と比較してよい。標準値と対象（患者）の値の間の偏差を用いて疾患の存在を証明する。

20

【0212】

疾患が証明され、治療プロトコールが開始されたら、ハイブリダイゼーションアッセイを定期的に反復し、患者における発現レベルが正常な個体で観察されるものに近づき始めるかを評価することができよう。連続アッセイから得た結果を用いて数日間～数ヶ月間の範囲の期間にわたり治療効果を示すことができよう。

30

【0213】

癌に関して、個体からの生検組織中の異常な転写量の存在は疾患の発現傾向を示し、または実際の臨床症状の発現前に疾患を検出する手段を提供することができよう。この種のより明確な診断により、医療専門家はより早期に予防的処置や積極的治療を用いることができ、癌の発現またはさらなる進行を予防することができよう。

【0214】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードする核酸配列から設計したオリゴヌクレオチドのさらなる診断的使用には P C R の使用が含まれてよい。そのようなオリゴマーは化学的に合成し、酵素的に生成し、または組換え供給源から生成することができよう。オリゴマーは、好ましくは2つのヌクレオチド配列、センス方向（5' 3'）のものとアンチセンス（3' 5'）のものを含み、これを特異的遺伝子または条件を確認するための最適条件下で用いる。同じ2つのオリゴマー、ネスト化オリゴマーセット、またはオリゴマーの縮重プールは、密接に関連した D N A または R N A 配列を検出および/または定量するためにより低ストリンジェント条件下で使用することができよう。

40

【0215】

R A T L 1 d 6 の発現を定量するのに適した方法には、放射性標識またはビオチン化ヌクレオチド、調節核酸の共増幅、および実験結果を外挿するための標準曲線が含まれる（P

50

. C. Melbyら、1993、J. Immunol. Methods、159:235-244、およびC. Duplaaら、1993、Anal. Biochem.、229-236)。複数試料の定量スピードは、目的とするオリゴマーが種々の希釈で存在し、分光光度法または比色法による反応により急速な定量をもたらすELISA形式でアッセイを行うことにより加速することができよう。

【0216】

本発明の別の態様において、本明細書に記載のRATL1d6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ーにおける標的として用いることができよう。マイクロアレーを用いて、同時に多数の遺伝子の発現レベルをモニターし（転写物の画像を生成）、遺伝的変異体、突然変異体、および多形性を同定することができる。この情報を用いて遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的基盤を理解し、疾患を診断し、そして治療剤を開発し、その活性をモニターすることができよう。特定の局面において、マイクロアレーをWO 95/11995 (Cheeら); D. J. Lockhartら、1996、Nature Biotechnology、14:1675-1680; およびM. Schenaら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93:10614-10619)に記載の方法に従って作製し、使用する。マイクロアレーはさらに米国特許6,015,702 (P. Lalら)に記載されている。

10

【0217】

本発明の別の態様において、RATL1d6ポリペプチドをコードする核酸配列を用い、天然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もできよう。該配列を特定の染色体、染色体の特異領域、または人工的染色体構築物(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BACs)、細菌PI構築物、または1本鎖染色体cDNAライブラリー(C. M. Price、1993、Blood Rev.、7:127-134、およびB. J. Trask、1991、Trends Genet.、7:149-154に概説されている)にマッピングすることができよう。

20

【0218】

蛍光In Situハイブリダイゼーション(FISH)(I. Vermaら、1988、Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques Pergamon Press、New York、NYに記載)を、他の物理的染色体マッピング技術および遺伝子マップデータと関連させることができよう。遺伝子マップデータの例は、多くの科学雑誌やOnline Mendelian Inheritance in Man(OMIM)にみることができる。物理的染色体マップ上のRATL1d6ポリペプチドをコードする遺伝子の位置と特定疾患または特定疾患に対する素因との相関は、該遺伝疾患と関連するDNAの領域の範囲を定めるのに役立つかもしれない。本発明のヌクレオチド配列、特に配列番号1のヌクレオチド配列またはその断片を用いて正常個体、キャリアー個体、または罹患個体間の遺伝子配列の差を検出することができよう。

30

【0219】

染色体調製物のin situハイブリダイゼーションおよび物理的マッピング技術、例えば確立された染色体マーカーを用いる連鎖分析を遺伝子マップを延長するのに用いることができよう。しばしばマウスのような別の哺乳動物種の染色体上の遺伝子の配置は、特定のヒト染色体の番号や腕が知られていなくても関連マーカーを示すことができよう。物理的マッピングにより新規配列を染色体腕またはその部分に割り当てることができる。これは位置的クローニングや他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探している研究者に貴重な情報を提供する。疾患や症状が遺伝子的関連により特定ゲノム領域におおよそ限定されたら(例えば、11q22-23に対するAT(R. A. Gattiら、1988、Nature、336:577-580))、該領域に対するあらゆる配列マッピングはさらに研究するための関連または制御遺伝子を示すことができよう。本発明のヌクレ

40

50

オチド配列を用い、正常個体、キャリアー個体または罹患個体間の転座、転移などによる染色体位置の相違を検出することもできよう。

【0220】

本発明の別の態様において、R A T L 1 d 6 ポリペプチド、その触媒的または免疫原性断片またはそのオリゴヌクレオチドをあらゆる種々の薬剤スクリーニング技術における化合物ライブラリーのスクリーニングに用いることができる。そのようなスクリーニングに用いる断片は溶液中で遊離し、固体支持体に貼りつき、細胞表面に保持され、または細胞内に局在してよい。R A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはその部分と被検物質の間の結合複合体形成は、当該分野で通常行われている技術を用いて測定することができよう。

【0221】

使用できる他の薬剤スクリーニング技術は、W O 84/03564に記載のごとく目的タンパク質に対する適切な結合親和性を有する化合物の高処理能力スクリーニングをもたらすことができよう。この方法において、R A T L 1 d 6 タンパク質に適用されるように、多数の種々の小被検化合物を固体基質、例えばプラスチックピンまたはいくつかの他の表面上で合成する。被検化合物をR A T L 1 d 6 ポリペプチドまたはその断片と反応させ、洗浄する。次に、結合したR A T L 1 d 6 ポリペプチドを当該分野でよく知られた方法により検出する。精製R A T L 1 d 6 ポリペプチドをプレート上に直接コーティングし、前記スクリーニング技術に用いることもできる。あるいはまた、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、固体支持体上にそれを固定化することができる。

10

【0222】

さらに本発明は、R A T L 1 d 6 のアゴニストまたはアンタゴニストのための化学物質ライブラリーの高処理能力スクリーニングを含む。そのようなアッセイは、例えば本明細書の実施例6に記載のごとくU B C 酵素活性の測定に基づくか、またはU B C 活性の測定に基づく同様に適合したアッセイである。

20

【0223】

特定タンパク質、すなわちR A T L 1 d 6 タンパク質と結合することができる小分子の検出または同定を含む他のスクリーニングおよび小分子（例えば薬物）検出アッセイは本発明に含まれる。高処理能力スクリーニング方法論に適したアッセイが特に好ましい。そのような結合に基づくスクリーニングまたは検出アッセイにおいて、機能的アッセイは通常必要ない。好ましくは実質的に純粋な標的タンパク質、および該タンパク質標的に対する結合をスクリーニングまたはアッセイすべき化合物のライブラリーやパネル（例えばリガンド、薬剤、小分子）だけが必要である。好ましくは標的タンパク質と結合するほとんどの小分子は、いくつかの方法で、該タンパク質上の機能的領域または部位に対する優先的なより高親和性の結合により活性を調節するであろう。

30

【0224】

そのようなアッセイの例には、米国特許6,020,141および6,036,920 (Pantolianoら)に記載の蛍光に基づく熱シフトアッセイ(3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc., 3DP, Extton, PA)がある(J. Zimmerman, 2000, Gen. Eng. News, 20(8)も参照)。該アッセイは、タンパク質薬剤またはリガンド複合体の熱アンホールディング曲線を分析することによる結合親和性測定値に基づき、発現し、好ましくは精製されたR A T L 1 d 6 ポリペプチドと結合する小分子（例えば薬剤、リガンド）の検出を可能にする。この技術により確定した薬剤または結合分子を、所望により、該分子が標的タンパク質の機能や活性に影響し、または調節するかを決定するために本明細書に記載したような方法によりさらにアッセイすることができる。

40

【0225】

本発明のさらなる態様において、R A T L 1 d 6 ポリペプチドと結合することができる中和抗体がR A T L 1 d 6 ポリペプチドとの結合のための被検化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。このようにして、該抗体を用いてR A T L 1 d 6 ポリペプチドと1またはそれ以上の抗原決定基を共有するあらゆるペプチ

50

ドの存在を検出することができる。

【0226】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、限定されるものではないがトリプレット遺伝子コードと特異的塩基対の相互作用のような特性を含む現在知られているヌクレオチド配列の特性に基づく新規技術であるさらに開発すべきあらゆる分子生物学的技術に用いてよいと理解されよう。

【0227】

モチーフおよび説明

モチーフアルゴリズム (Genetics Computer Group, Inc.) に基づくいくつかのリン酸化部位を含む本発明の R A T L 1 d 6 ポリペプチドを決定した。そのような部位のリン酸化は、R A T L 1 d 6 ポリペプチドの生物活性を調節するかもしれない。例えば、特定部位のリン酸化は、他の分子 (例えばタンパク質、リガンド、基質、DNA など) と関連または結合する該タンパク質の能力の調節に参与するかもしれない。本願において、リン酸化は、他のポリペプチド、特に R A T L 1 d 6 の同起源のリガンドと結合する R A T L 1 d 6 ポリペプチドの能力、またはある種の細胞シグナル経路を調節するその能力を調節する。

【0228】

詳細には、モチーフアルゴリズム (Genetics Computer Group, Inc.) を用いて R A T L 1 d 6 ポリペプチドが4つのタンパク質キナーゼ C (P K C) リン酸化部位を含むことを予測した。in vivo において P K C はセリンまたはトレオニン残基のリン酸化に対する選択性を示す。該 P K C リン酸化部位は、以下のコンセンサスパターンを有する： [S T] - x - [R K]。ここで、S または T はリン酸化部位を表し、「x」は介在アミノ酸残基を表す。P K C リン酸化部位に関するさらなる情報は、Woodget, J. R. ら、1986、Eur. J. Biochem., 161: 177-184、および Kishimoto A. ら、1985、J. Biol. Chem., 260: 12492-12499 に記載されている (この内容は本明細書の一部を構成する)。

【0229】

好ましくは以下の P K C リン酸化部位のポリペプチドは本発明に含まれる：

G S V Q A T D R L M K E L (配列番号18)、I Y R S Q S F K G G N Y A (配列番号19)、

I L L N F S F K D N F P F (配列番号20)、および/または T R A Q Q S Y K S L V Q I (配列番号21)。これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。本発明には、1またはそれ以上の R A T L 1 d 6 P K C リン酸化部位ポリペプチドを本明細書の他の箇所に記載の免疫原性および/または抗原性エピトープとして用いることも含まれる。

【0230】

モチーフアルゴリズム (Genetics Computer Group, Inc.) を用い、R A T L 1 d 6 ポリペプチドが6つのカゼインキナーゼ I I リン酸化部位を含むことを予測した。カゼインキナーゼ I I (C K - 2) は、その活性が環状ヌクレオチドとカルシウムに非依存のタンパク質セリン/トレオニンキナーゼである。C K - 2 は多くの種々のタンパク質をリン酸化する能力を有する。この酵素の基質特異性は以下のようにまとめることができる：(1) 同様の条件下では S e r が T h r より好ましい。(2) 酸性残基 (A s p または G l u) は、リン酸アクセプター部位の C 末端から3残基存在しなければならない。(3) + 1、+ 2、+ 4 および + 5 位のさらなる酸性残基は、リン酸化速度を増大させる。ほとんどの生理学的基質は、これらの位置に少なくとも1つの酸性残基を有する。(4) 酸性決定基の供給者としては A s p が G l u より好ましい。(5) アクセプター部位の N 末端の塩基性残基はリン酸化速度を低下させ、一方、酸性残基はそれを増大させる。

【0231】

10

20

30

40

50

典型的カゼインキナーゼIIリン酸化部位のコンセンサスパターンは以下の通りである：
[ST]-x(2)-[DE]。ここで、「x」はあらゆるアミノ酸を表し、SまたはTはリン酸化部位である。アミノアシル-トランスファーRNA合成酵素クラスIIDメインについてのさらに具体的な情報は以下の刊行物に記載されている：

Pinna, L. A., 1990, *Biochim. Biophys. Acta*, 1054: 267-284 (この内容は本明細書の一部を構成する)。

【0232】

好ましくは以下のカゼインキナーゼIIリン酸化部位ポリペプチドが本発明に含まれる：
PAEQCTQEDVSS ED (配列番号22)、TQEDVSS EDEDEEM (配列番号23)、

10

QEDVSS EDEDEEMP (配列番号24)、AEGKKSEDDGIGKE (配列番号25)、

ELVND SLYDWNVKL (配列番号26) および/または ILLNFSFKDNFPFD (配列番号27)。これらペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。本発明には、カゼインキナーゼIIリン酸化部位ポリペプチドを本明細書の他の箇所に記載の免疫原性および/または抗原性エピトープとして使用することも含まれる。

【0233】

RATL1d6ポリペプチドは、モチーフアルゴリズム (Genetics Computer Group, Inc.) に従って4つのグリコシル化部位を含むことが示された。本明細書により具体的に記載したように、タンパク質のグリコシル化は、タンパク質のホールディングの増大、タンパク質凝集の阻害、オルガネラに対する細胞内トラフィッキングの調節、タンパク質分解に対する耐性増加、タンパク質の抗原性の調節、および細胞間付着の仲介を含む種々の機能をもたらすと考えられる。

20

【0234】

アスパラギングリコシル化部位は以下のコンセンサスパターンを有する：

N-{P}-[ST]-{P} (ここで、Nはグリコシル化部位を表す。)。潜在的N-グリコシル化部位はコンセンサス配列Asn-Xaa-Ser/Thrに特異的であることがよく知られている。しかしながら、該タンパク質のホールディングはNグリコシル化の調節に重要な役割を果たすという事実により、コンセンサストリペプチドの存在は、アスパラギン残基がグリコシル化されると結論付けるには十分ではない。AsnとSer/Thrの間にプロリンが存在するとN-グリコシル化が阻害されることが示され、これはグリコシル化部位の最近の統計分析により確認され、またこの分析はSer/ThrのC末端にプロリンを有する部位の約50%がグリコシル化されないことも示している。アスパラギングリコシル化に関するさらなる情報は以下の刊行物に記載されている (この内容は本明細書の一部を構成する)：

30

Marshall R. D., *Annu. Rev. Biochem.*, 41: 673-702 (1972); Pless D. D. および Lennarz W. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74: 134-138 (1977); Bause E., *Biochem. J.*, 209: 331-336 (1983); Gavel Y. および von Heijne G., *Protein Eng.*, 3: 433-442 (1990); および Miletich J. P. および Broze G. J. Jr., *J. Biol. Chem.*, 265: 11397-11404 (1990)。

40

【0235】

好ましい態様において、以下のアスパラギングリコシル化部位ポリペプチドが本発明に含まれる：

VRHCNITESYP AV (配列番号28)、AVELVND SLYDWNV (配列番号29)、

DFILLNFSFKDNFP (配列番号30)、および/または VQFGANKSQ YSLTR (配列番号31)。

50

これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。本発明には、1またはそれ以上のこれら R A T L 1 d 6 アスパラギングリコシル化部位ポリペプチドを本明細書の他の箇所に記載の免疫原性および/または抗原性エピトープとして用いることも含まれる。

【0236】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドは、モチーフアルゴリズム (G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , I n c .) を用いて14個のN-ミリスチル化部位を含むと予測された。かなりの数の真核性タンパク質がアミド連鎖を介してそのN末端残基にミリスチレート (C₁₄ 飽和脂肪酸) を共有結合的に付加することによりアシル化される。この修飾を担う酵素、ミリスチル C o A : タンパク質 N - ミリスチルトランスフェラーゼ (N M T) の配列特異性は、既知のNミリスチル化タンパク質の配列および合成ペプチドを用いる研究から導かれた。該特異性は以下のものであると思われる：

i) N末端残基はグリシンでなければならない。ii) 2位には非荷電残基が許される。iii) 荷電残基、プロリンおよび大疎水性残基は許されない。iv) 3および4位では、すべてではないがほとんどの残基が許される。v) 5位では、小非荷電残基が許される (A l a , S e r , T h r , C y s , A s n および G l y) 。セリンが好ましい。vi) 6位ではプロリンは許されない。

【0237】

N - ミリスチル化のコンセンサスパターンは以下の通りである：

G - { E D R K H P F Y W } - x (2) - [S T A G C N] - { P } (ここで、「x」はあらゆるアミノ酸を表し、GはN-ミリスチル化部位である) 。Nミリスチル化部位に対するさらに具体的な情報は以下に記載されている：T o w l e r D . A . ら、A n n u . R e v . B i o c h e m . , 5 7 : 6 9 - 9 9 (1 9 8 8) ; および G r a n d R . J . A . , B i o c h e m . J . , 2 5 8 : 6 2 5 - 6 3 8 (1 9 8 9) (この内容は本明細書の一部を構成する) 。

【0238】

好ましくは以下のN-ミリスチル化部位ポリペプチドが本発明に含まれる：

Q Q P G P G Q Q L G G Q G A A P (配列番号32) 、 P G Q Q L G G Q G A A P G A G G (配列番号33) 、
 Q L G G Q G A A P G A G G G P G (配列番号34) 、 A A P G A G G G P G G G P G (配列番号35) 、
 A P G A G G G P G G G P G P G P (配列番号36) 、 E F L L A G A G G A G A G A A P (配列番号37) 、
 L L A G A G G A G A G A A P G P (配列番号38) 、 L A G A G G A G A G A A P G P H (配列番号39) 、
 H L P P R G S V P G D P V R I H (配列番号40) 、 Q D Y L N G A V S G S V Q A T D (配列番号41) 、
 N G A V S G S V Q A T D R L M K (配列番号42) 、 S Q S F K G G N Y A V E L V N D (配列番号43) 、
 G Y V L G G G A I C M E L L T K (配列番号44) 、 および/または A R V Q F G A N K S Q Y S L T R (配列番号45) 。これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。さらに本発明にはこれら R A T L 1 d 6 N - ミリスチル化部位ポリペプチドを本明細書の他の箇所に記載の免疫原性および/または抗原性エピトープとして用いることも含まれる。

【0239】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドは、モチーフアルゴリズム (G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , I n c .) に従って1つのアミド化部位を含むことが示された。C末端がアミド化されるホルモンおよび他の活性ペプチドの前駆体には、いつも直接、アミド基を提供するグリシン残基、および最もしばしば一般に活性ペプチド前駆体開裂部位として機能する少なくとも2つのコンセンサス塩基性残基 (A r g または L y s) が続く。

すべてのアミノ酸をアミド化することができるが、中性疎水性残基、例えばValまたはPheがよい基質であり、荷電残基、例えばAspまたはArgははるかに反応性が低い。アミド化部位のコンセンサスパターンは以下の通りである： $x - G - [R K] - [R K]$ （ここで、「x」はアミド化部位を表す）。アミド化に関するさらなる情報は以下の刊行物に記載されている（この内容は本明細書の一部を構成する）：Kreil、G.、Meth. Enzymol.、106：218-223（1984）、およびBradbury、A. F.およびSmyth D. G.、Biosci. Rep.、7：907-916（1987）。

【0240】

好ましい態様において、以下のアミド化部位ポリペプチドが本発明に含まれる：EEEEPAEGKKSEDDG（配列番号46）。このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。本発明には、このRATL1d6アミド化部位ポリペプチドを本明細書の他の箇所に記載のごとく免疫原性および/または抗原性エピトープとして用いることも含まれる。

【0241】

分子的進化を通じた本発明の生物活性/機能的特性の増強方法

知られた最も生物学的に活性なタンパク質の多くは生物におけるその特定機能について有効性が高いが、トランスジェニック、治療的、医薬的および/または産業的適用において望ましくない特性を有する事が多い。これら特徴のうち、生理学的半減期が短いことが最も重要な問題であり、タンパク質レベルやmRNAレベルでみられる。タンパク質またはペプチドの半減期を延長する能力は、その使用、例えば遺伝子療法、トランスジェニック動物生産、タンパク質のバイオプロセス生産と精製、および該タンパク質の化学モジュレーターとしての使用などにおいて特に重要であろう。したがって、一般の産業的および医薬的適用において応用性があるのに加え、動物起源の疾患を治療するための治療薬としてのその適用を増す特性を有する単離されたタンパク質の新規変異体を確認する必要がある。

【0242】

すなわち、本発明のある局面は、指向性(directed)分子進化を通して本発明のポリペプチドの特異的な特徴を増強する能力に関する。そのような増強は、非制限的例において、疾患または病気の状態の予防的処置または疾患遺伝子を標的化するためのエフェクターとしてのその後の使用を含む、新たに説明したポリヌクレオチドおよび/またはタンパク質製品のキット中の必須成分としての有用性、本発明のタンパク質および/またはポリヌクレオチドの物理的特性、例えばその溶解性、構造またはコドン最適化、あらゆる関連酵素活性を含む本発明タンパク質の特異的生物活性、本発明タンパク質の酵素動力学（適用できれば）、本発明タンパク質のKi、Kcat、Km、Vmax、Kd、タンパク質-タンパク質活性、タンパク質-DNA結合活性、アンタゴニスト/阻害活性（直接または間接的相互作用を含む）、本発明タンパク質のアゴニスト活性（直接または間接的相互作用を含む）、本発明タンパク質の抗原性（例えば、該タンパク質の抗原的可能性を増大または減少させることが望ましい場合）、本発明タンパク質の免疫原性、本発明タンパク質のそれ自身または他のタンパク質と二量体、三量体または多量体を形成する能力、本発明タンパク質の抗原性効果をもたらすことができよう。

【0243】

さらに、タンパク質の特異的特性を増強する能力は、酵素の特徴付けられた活性を、その最初に特徴付けられた活性とはまったく関連のない活性に変化させるのにも応用することができる。本発明タンパク質の他の望ましい増強は、それぞれ個々のタンパク質に特異的であり、当業者により認識され、本発明により予期されるであろう。

【0244】

例えば、操作されたユビキチン結合酵素、例えばRATL1d6タンパク質はその基質の結合に関して構成性に活性であってよい。あるいはまた、操作されたユビキチン結合酵素は基質結合の非存在下で構成性に活性であってよい。さらに別の例において、操作したユ

ピキチン結合酵素は、通常ユビキチン結合酵素の活性化に必要な制御因子および/または条件（例えば、基質結合、リン酸化、構造変化など）のすべてを必要とせずに活性化されることができよう。そのようなユビキチン結合酵素は、本明細書に記載の他の使用のうちユビキチン結合酵素モジュレーターを同定するためのスクリーニングに有用であろう。あるいはまた、操作したユビキチン結合酵素は基質特異性が変化し、そして/またはユビキチン結合酵素活性が増大してよい。さらに別の選択肢として、操作したユビキチン結合酵素はユビキチン結合酵素活性が低下してよい。

【0245】

指向性進化はいくつかの工程からなる。第1工程は目的とする遺伝子またはタンパク質のための変異体ライブラリーを確立することを含む。次に、最も重要な工程は、確認すべき活性を有する変異体を選ぶことである。スクリーニングはすべての変異体を排除するほとストリンジェントではないが、有用でない変異体を排除するほどには十分選択的でなければならないので、スクリーニングの設計がきわめて重要である。最後の工程は、先のスクリーニングから得た最良の変異体を用いて上記工程を繰り返すことである。次に、各連続的周期を、必要に応じて例えばスクリーニングのストリンジェンシーを増すことにより調製することができる。

10

【0246】

多年にわたり、高分子に突然変異を導入するために開発された多くの方法がある。これらの方法には、ランダム突然変異誘発、「エラープローン」PCR、化学突然変異誘発、部位指向性突然変異誘発、および当該分野でよく知られた他の方法が含まれる（現在の突然変異誘発法の総合的リストについては、T. Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring、NY（1982）参照）。典型的には、そのような方法は、例えばタンパク質のコア機能領域またはタンパク質の特異的ドメインの機能（マルチドメインタンパク質ならば）を確認するための手段として用いられてきた。しかしながら、より最近、そのような方法は特異的または増大した特性を有する高分子変異体の同定に応用されてきた。

20

【0247】

ランダム突然変異誘発は、現在のところ最も広く認識された方法である。典型的には、これは「エラープローン」PCR（Moore、J.ら、Nature Biotechnology 14:458、（1996）に記載）の使用または目的とする特異領域に対応する無作為化合成オリゴヌクレオチド（Derbyshire、K. M.ら、Gene、46:145-152、（1986）の使用、およびHill、D. E.ら、Methods Enzymol.、55:559-568、（1987）に記載）の応用により行われてきた。両アプローチでは、得られる突然変異誘発のレベルに限界がある。しかしながら、いずれのアプローチでも研究者は突然変異誘発の速度を効果的に制御することができる。酵素の活性に有用な突然変異誘発はきわめて稀なので、このことは特に重要である。事実、突然変異誘発レベルが高すぎるものを用いると有用な突然変異の所望の利点に対抗または阻害するかもしれない。

30

【0248】

前記方法は共に高分子変異体の無作為化プールを作製するのに有効であるが、「DNAシャッフリング」またはセクシュアル（sexual）PCR」（Stemmer、W. P. C.、PNAS、91:10747、（1994））と名づけた第三の方法が最近明らかになった。DNAシャッフリングは、「指向性分子進化」、「エクソンシャッフリング」、「指向性酵素進化」、「in vitro進化」および「人工進化」とも呼ばれてきた。そのような用語は当該分野で知られており、本発明に含まれる。好ましい新規方法は、得られる結果の肯定的な特徴を広げると同時に否定的な特徴を排除することにより以前の方法の限界を克服するようである。

40

【0249】

DNAシャッフリングは、「エラープローン」PCRの方法と同様にin vitro組

50

換え原理を組み合わせることによりこの課題を達成する。実質的に、ある遺伝子（すなわち、本発明の R A T L 1 d 6 遺伝子）の小 D N A 断片のランダム消化プールを D N A ーゼ I 消化により作製する。次に、得られる断片を「エラープローン」P C R アッセンブリー反応に導入する。P C R 反応時において、任意のサイズの D N A 断片はその同系鎖だけでなく、全ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションによっては通常得られない目的のポリヌクレオチドの異なる領域に対応する他の D N A 断片とハイブリダイズする。さらに、P C R アッセンブリー反応は、「エラープローン」P C R 反応条件を利用するので、ランダム突然変異が該断片すべてに関する P C R 反応の D N A 合成工程時に導入され、さらに該反応のアニーリング工程時に潜在的ハイブリダイゼーション部位が多様化する。

【0250】

種々の反応条件を用いて D N A シャッフリング反応を行うことができる。しかしながら、D N A シャッフリングの特異的反応条件を以下に手引きとして記載する（P N A S、9 1 : 1 0 7 4 7、(1 9 9 4) も参照のこと）。簡単には、D N A シャッフリング反応にかける D N A 基質を調製する。調製は該 D N A を夾雑細胞物質、化学物質、緩衝剤、オリゴヌクレオチドプライマー、デオキシヌクレオチド、R N A などから単に精製する形でよく、例えば Q i a g e n、I n c . や P r o m e g a、C o r p . が提供するような市販の D N A 精製キットを利用してよい。

10

【0251】

D N A 基質を精製したら、それを D N A ーゼ I 消化にかける。D N A 基質約 2 - 4 μ g を、室温で 10 ~ 20 分間、1 0 0 μ l の 5 0 m M T r i s - H C L (p H 7 . 4) / 1 m M M g C l ₂ 中の 0 . 0 0 1 5 単位 / μ l の D N A ーゼ I (S i g m a) で消化する。次に、得られる断片 1 0 - 5 0 b p をアガロースゲル電気泳動（例えば 2 % 低融点アガロースゲル）にかけ、次いで D E 8 1 イオン交換紙（W h a t m a n）に移すことにより精製し、該断片は、当該分野で知られた他の方法に加えて、適切な分子量をカットオフする M i c r o c o n 濃縮装置（A m i c o n）またはオリゴヌクレオチド精製カラム（Q i a g e n）を用いることにより精製することもできる。D E 8 1 イオン交換紙を用いる場合は、1 0 - 5 0 b p 断片を 1 M N a C l を用いて該紙から溶出し、次いでエタノール沈殿する。

20

【0252】

次に、得られる精製断片を 2 m M の各 d N T P、2 . 2 m M M g C l ₂、5 0 m M K C l、1 0 m M T r i s - H C L (p H 9 . 0)、および 0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0（登録商標）を含む P C R 混合物に再懸濁することにより P C R アッセンブリー反応にかける（最終断片濃度は 1 0 - 3 0 n g / μ l）。この辞典ではプライマーを加えない。

30

【0253】

T a q D N A ポリメラーゼ（P r o m e g a）を反応混合物 1 0 0 μ l あたり 2 . 5 単位加える。用いる P C R プログラムは、9 4 6 0 秒間、9 4 3 0 秒間、5 0 - 5 5 3 0 秒間、および 7 2 3 0 秒間で 3 0 - 4 5 サイクルし、次いで 7 2 5 分間 M J R e s e a r c h（C a m b r i d g e、M A）P T C - 1 5 0 サーモサイクラー（t h e r m o c y c l e r）を用いる。アッセンブリー反応が完結した後、得られる無プライマー生成物の 1 : 4 0 希釈物を各プライマー 0 . 8 μ m を含む P C R 混合物（アッセンブリー反応に用いたのと同じ緩衝液混合物を使用）中に導入し、この混合物を P C R、1 5 サイクル（9 4 3 0 秒間、5 0 3 0 秒間、および 7 2 3 0 秒間使用）にかける。示したプライマーは、シャッフリング反応に利用したポリヌクレオチドの核酸配列に対応するプライマーである。そのようなプライマーは、当該分野で知られ、本明細書のたの箇所に記載の方法を用いる修飾核酸塩基対を含むことができ、さらなる配列を含むことができる（すなわち、制限部位の付加、特異的塩基対の突然変異などのため）。

40

【0254】

得られる、シャッフリング、アッセンブル、および増幅した生成物を当該分野でよく知られた方法（例えば Q i a g e n P C R 精製キット）を用いて精製し、次いで適切な制限酵素

50

を用いてクローンすることができる。

【0255】

多くのDNAシャッフリングの変化が現在までに公表されているが、そのような変化は当業者に理解され、実施されており、本発明に含まれる。DNAシャッフリング法は、Zhaora、Nucleic Acid Res.、25(6):1307-1308に記載の方法を用い、所望の突然変異誘発レベルに調整することもできる。

【0256】

上記のごとく、ランダム化プールを作製したら、それを特異的スクリーニングにかけて所望の特性を有する変異体を同定することができる。変異体が同定されたら、該変異体に対応するDNAをもう一回DNAシャッフリングを開始するための基質として用いることができる。このシャッフリング、目的とする最適化変異体の選択、次いで再シャッフリングのサイクルを最終的な変異体が得られるまで繰り返すことができる。DNAシャッフリング技術を用いて作製した変異体を同定するのに適用されるモデルスクリーニングの例は以下の刊行物に記載されている：

J. C. Mooreら、J. Mol. Biol.、272:336-347、(1997)、F. R. Crossら、Mol. Cell. Biol.、18:2923-2931、(1998)、およびA. Cramerら、Nat. Biotech.、15:436-438、(1997)。

【0257】

DNAシャッフリングはいくつかの利点を有する。第1は、有利な突然変異を利用することである。スクリーニングと組み合わせると、DNAシャッフリングは最良の突然変異の組み合わせの発見を可能にし、また、該最良の組み合わせがポピュレーション中のすべての突然変異を含むとはみなさない。第2に、組換えは点突然変異誘発と同時に生じる。DNAポリメラーゼに小断片DNAプールから完全長遺伝子を合成させる効果がバックグラウンド突然変異誘発率である。ストリンジェント選択方法と組み合わせると、酵素活性は野生型の酵素に比べて16000倍まで増加する。本質的に、バックグラウンド突然変異誘発は、組換えが活性の増大をもたらす遺伝子的変動性をもたらした。

【0258】

組換えの第3の特徴は、有害な突然変異を除去するのに使用できることである。上記のように、ランダム化工程時に、すべての有益な突然変異について少なくとも1またはそれ以上の中立的または阻害的突然変異があるかもしれない。そのような突然変異は、アセンブリー反応に、以前の選択から選んだ突然変異体のランダムサイズ断片に加え、過剰の野生型のランダムサイズ断片を含めることにより除去することができる。次の選択時に、ポリヌクレオチド/ポリペプチド/酵素のほとんどの活性変異体のいくつかは阻害的突然変異を失うはずである。

【0259】

最後に、組換えはパラレルプロセッシングを可能にする。タンパク質をより望ましいものにする複数の特性(例えば可溶性、活性など)があると思われるので、このことは著しい利点である。2つ以上の望ましい特性を一度にスクリーニングするのはますます困難であるから、他の分子進化法は阻害的な傾向がある。しかしながら、組換えを用いて種々の特性のための最良の代表的変異体のランダム化断片を組み合わせ、次いで一度に複数の特性を選択することができる。

【0260】

DNAシャッフリングは、特にポリヌクレオチドおよびポリペプチドを治療的用途で提供する場合、特定宿主における免疫原性を低下させるために本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを適用することもできる。例えば、本発明の特定変異体をDNAシャッフリング技術を用いて作製および単離することができる。そのような変異体は、その新規な固有の構造により宿主において免疫原性が高いかもしれないが、すべて所望の特性を有するかもしれない。具体的には、所望の特性は、もはや「自己」分子として認識されず、「異種」分子として認識され、新規変異体に対する宿主の免疫応答を活性化する非天然構

10

20

30

40

50

造を有するポリペプチドをもたらすことができよう。そのような制限は、例えば1またはそれ以上のDNAシャッフリングサイクルにおいて新規変異体遺伝子の遺伝子配列を有する天然タンパク質の生体異物相同分子種の遺伝子配列のコピーを含むことにより克服することができる。したがって、相同分子種と新規変異体DNAの分子比は変化することがある。理想的には、得られた同定されたハイブリッド変異体は、生体異物タンパク質が宿主免疫系から逃れられるようにするコーディング配列、およびさらに所望の特性をもたらす最初の新規変異体のコーディング配列の少なくともあるものを含むであろう。

【0261】

同様に、本発明は、1またはそれ以上のDNAシャッフリングサイクルが、遺伝子鋳型DNAに加えて、既知の対立遺伝子配列、最適化コドン配列、既知変異体配列、既知ポリヌクレオチド多形性配列、既知相同分子種配列、既知相同体配列、さらなるホモローガスな配列、さらなる非ホモローガスな配列、別の種由来の配列をコードするオリゴヌクレオチド、および上記のあらゆる構成物および組み合わせを含む、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの進化のためのDNAシャッフリング技術の応用を含む。

10

【0262】

上記方法に加えて、ある場合に適用可能な、または望ましい多くの関連方法がある。これらのうちで代表的なものはPCT出願WO 98/31700およびWO 98/32845に記載の方法である(この内容は反応混合物の一部を構成する)。さらに、関連方法を本発明のポリヌクレオチド配列に適用し、PCT出願WO 98/13485、WO 98/13487、WO 98/27230、WO 98/31837、およびCramer i

20

【0263】

提案した適用を含む本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに対する「DNAシャッフリング」技術のさらなる適用方法は、米国特許5,605,793; PCT出願WO 95/22625; PCT出願WO 97/20078; PCT出願WO 97/35966; およびPCT出願WO 98/42832に記載されている。前記の内容は本明細書の一部を構成する。

30

【0264】

実施例

下記実施例は本発明の例示のために示すものであり、本発明を限定するものではない。

【0265】

実施例 1

方法

A. T細胞の調製

【0266】

ヒツジ赤血球細胞(SRBC)を用いる標準的ロゼティングプロトコールによりT細胞を製造した。簡単には、それぞれ2頭のドナーから得たヘパリン化血液225 mlから末梢血単核細胞(PBMC)をFicollを用いた遠心により調製した。T細胞(E+分画)をSRBCを用いたロゼティングにより単離した。FAST-TRACK mRNA単離キット(Invitrogen)を用い、製造業者の指示書に従って半分の非刺激T細胞(約 2.25×10^8 細胞)からメッセンジャーRNA(mRNA)を調製した。残りのT細胞を共刺激抗CD28 mAb 2E12 5 μ g/mlを含むRPMI/10% FBSで 1.25×10^6 /mlに希釈し、抗CD3 mAb G19-4でコーティングした10cm組織培養プレート(Corning)に加えた(20ml/プレート)。プレートをPBSで希釈した5 μ g/ml mAb 5mlで37、7時間インキュベーションし、次いでPBSで3回洗浄することによりコーティングした。プレートを正常な細胞培養条件下で18時間培養した。勢いよくピペティングし、かきとること

40

50

により懸濁および付着T細胞を得、遠心してペレットとして活性化細胞を回収し、上記のごとくmRNA単離用に加工した。

【0267】

B. サブトラクションライブラリーの構築

cDNAサブトラクションライブラリーをCLONTECH PCR-Select (登録商標) cDNAサブトラクションキット (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて作製した。製造業者のプロトコールに従って500ngの抗CD3/抗CD28活性化末梢血T細胞ポリA+RNA (テスター) および500ngの非活性化静止末梢血T細胞ポリA+RNA (ドライバー) を調製した。5つの2次PCR反応物を混合し、1.2%アガロースゲルに流した。約0.3kb-1.5kbの範囲の断片をQIAGENゲル抽出キット (QIAGEN Inc., Valencia, CA) を用いて精製し、TAクローニングベクター、pCR2.1 (Invitrogen) に挿入した。TOP10F'コンピテントE. Coli (Invitrogen) を形質転換し、50μg/mlアンピシリンを含むLauria-Bertani (LB) プレート上に接種した。約600クローンを単離し、同濃度のアンピシリンを含むLBブロスに増殖させた。プラスミドをQIAGENミニプレックスピン (QIAGEN) を用いて単離し、ABIサイクルシーケンサー (ABI Prism, PE Applied Biosystems) を用いてシーケンスした。

10

【0268】

C. オーバーラッピングESTクローンのデータベースマイニング

600クローン以上の挿入物をBLAST2 (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて分析した。既知遺伝子のEST (Expressed Sequence Tag (発現配列タグ)) を有するクローンをNCBIにより維持した非冗長ヌクレオチドデータベースを用いて除去した。多くのクローンが新規とわかった。すなわち、そのようなクローンはNCBIにより公表されていないか、またはデータベース中にみられなかった。geneseqヌクレオチド特許データベース (BLAST2を通して利用可能) を用いてさらに検索した。特許配列のESTを含むクローンを既知配列のサイズ、既知配列情報の質、および/または公に利用可能な配列と関連した有用性の欠如に応じて排除した。

20

【0269】

配列の新規性を分析した後、D2クラスタードESTデータベース (BLAST2でも利用可能) を用いて実質的なクローニングを実施した。このD2クラスタードデータベースはBristol-Myers Squibb Bioinformatics部門が設計した。それはcontigに組み立てられた公開ESTおよび特許 (Incyte Pharmaceutical, Inc.) ESTの両方を含む。contigは、より大きな配列断片に組み立てられてたより小さなESTクローンのコレクションである。サブトラクションクローン配列を用いてこのクラスタードデータベースを照会する。クラスター配列は、配列分析プログラムSequencher (Gene Codes) を用いてサブトラクションクローン配列を用いて組み立てられた。次に、より大きなcontig配列を非冗長ヌクレオチド (NRN)、genesiqヌクレオチド特許 (GNP)、非冗長タンパク質 (NRP)、およびgenesiqペプチド特許 (GPP) データベースに対して逆検索した。

30

40

【0270】

D. Drosophila相同分子種の同定

ヒトRATL1d6遺伝子のDrosophila相同分子種を検索するため、RATL1d6タンパク質配列をBLASTソフトウェア (Altschul, S. F.ら、1997、Nucleic acids Res., 25:3389-3402) を用いて公開されたDrosophilaタンパク質およびGenBankのゲノム配列データベースに対して検索した。Drosophila遺伝子EG:25E8 (Genbank受託番号AAF45767) は、ヒトRATL1d6遺伝子と最も高い相同性を有し、該遺

50

伝子の大部分に及ぶアミノ酸レベルで相同性が48%であることがわかった。Drosophila 遺伝子EG:25E8を用い、公開されたヒトタンパク質およびGenBankのゲノム配列データベースに対して検索した。ヒト遺伝子のすべてのうちRATL1d6は、Drosophila EG:25E8遺伝子とほぼ同様であることがわかった。データベース検索の結果は、EG:25E8がヒトUBC酵素RATL1d6遺伝子のDrosophila相同分子種であることを示した。

【0271】

実施例2

RATL1d6ポリヌクレオチドのクローニング

【0272】

RATL1d6ポリヌクレオチドを単離および得るための完全長クローニング実験をGene Trapper技術(Life Technologies, MD)を用い、製造業者の指示書にしたがって実施した。簡単には、PCRプライマーPY508、(5'-TGCA GTGTCTGGCTCGGTGC-3')、(配列番号9)、およびPY509、(5'-CTGATCTGCATGATCACTGAC-3')、(配列番号10)を用い、骨髄、心臓、肺、脳、腎臓、末梢血白血球、肝臓、脾臓、精巣、および胎児脳cDNAライブラリーを含むヒトcDNAライブラリーのパネル(Life Technologies)をスクリーニングした。強陽性PCR生成物がヒト脳および骨髄cDNAライブラリー(Life Technologies)を用いて確認された。

【0273】

二本鎖cDNAプラスミドライブラリーをGene I IおよびExonuclease I I Iを用いて一本鎖DNA(ssDNA)に変換した。ビオチン化オリゴヌクレオチド(PY495:5'-TCCACTGCAACATCACGGAGTTCATACCCCTG-3')、(配列番号11)または(PY496:5'-ATGCAGTTCGAACCTCGTGAATGACAGTCTGT-3')、(配列番号12)、およびssDNA間にハイブリッドを形成し、次いで常磁性ビーズ上に捕捉した。(D. A. Tagleら、1993、Nature、361:751-753)。洗浄後、ssDNAを放出させ、DNAポリメラーゼによりdsDNAに変換した。DH10B細胞を形質転換してプレートに接種後、陽性クローンをPCR分析により同定した。この技術により、新規RATL1d6遺伝子について陽性クローンを同定した。QIAprepスピンミニプレッ
 プキット(Qiagen)を用いてプラスミドを調製し、得られたDNAを当該分野で知られた常套的プロトコルを用いてシーケンシングした。

【0274】

シーケンシングしたポリヌクレオチドの5'末端の配列分析により、骨髄cDNAライブラリーからの3クローンがRATL1d6ポリペプチドの完全長コーディング領域を含むことが示された。さらにプライマーを合成し、これを用い、常套的シーケンシングプロトコルを用いて完全挿入物をシーケンスした。これらcDNA挿入物用のベクターはクローニング部位SaI I(5'末端)およびNot I(3'末端)を有するpCMVSPORT2であった。

【0275】

実施例3

ハイブリダイゼーションプローブの標識およびその使用

配列番号1から誘導したハイブリダイゼーションプローブを用いてcDNA、ゲノムDNA、またはmRNAをスクリーニングする。約20塩基対を含むオリゴヌクレオチドの標識をこの実施例に記載しているが、実質的に同じ方法をより大きなcDNA断片で使用する。オリゴヌクレオチドをステイト・オブ・ザ・アート・ソフトウエア、例えばOLIGO4.06(National Biosciences)を用いて設計し、50pmolの各オリゴマーおよび250μCiの[³²P]アデノシン三リン酸(Amersham)およびT4ポリヌクレオチドキナーゼ(DuPont NEN, Boston, Mass.)を混合することにより標識する。標識オリゴヌクレオチドをSEPHAD

10

20

30

40

50

X G - 2 5 スーパーファイン樹脂カラム (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) を用いて実質的に精製する。センスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド各々 10^7 カウント/分を含む部分を以下のエンドヌクレアーゼ (例えば、A s e I、B g 1 I I、E c o R I、P s t I、X b a 1、または P v u I I、D u P o n t N E N) の一つを用いて消化したヒトゲノム DNA の典型的膜ベースのハイブリダイゼーション分析に使用する。

【 0 2 7 6 】

各消化物由来の DNA を 0 . 7 % アガロースゲルを用いて分画し、ナイロン膜 (N y t r a n P l u s、S c h l e i c h e r & S c h u e l l、D u r h a m、N . H .) に移す。ハイブリダイゼーションを 4 0 で 1 6 時間行う。非特異シグナルを除去するため、プロットを室温、0 . 1 x 生理食塩水クエン酸ナトリウムおよび 0 . 5 % ドデシル硫酸ナトリウムまでの増大するストリンジェント条件下で連続的に洗浄する。X O M A T A R フィルム (K o d a k、R o c h e s t e r、N Y) を P h o s p h o i m a g e r カセット (M o l e c u l a r D y n a m i c s、S u n n y v a l e、C A) 中のプロットに数時間暴露した後、ハイブリダイゼーションパターンを視覚的に比較する。

10

【 0 2 7 7 】

実施例 4

相補的ポリヌクレオチド

【 0 2 7 8 】

R A T L 1 d 6 タンパク質をコードする配列と相補的な核酸配列もしくはアンチセンス分子、またはそのあらゆる部分を用いて、天然 R A T L 1 d 6 の発現を低下させ、または阻害する。約 1 5 ~ 3 5 塩基対を含むアンチセンスまたは相補的オリゴヌクレオチドの使用を説明するが、本質的に同じ方法をより小さいまたはより大きい核酸配列断片で使用する。図 1 A、1 B および 2 A、2 B に示すように R A T L 1 d 6 タンパク質のコーディング配列に基づくオリゴヌクレオチドを用い、天然 R A T L 1 d 6 の発現を阻害する。相補的オリゴヌクレオチドを最もユニークな 5 ' 配列 (図 1 A、1 B および 2 A、2 B) から設計し、これを用いてプロモーターとコーディング配列の結合を阻害することにより転写を阻害するか、またはリボソームが R A T L 1 d 6 タンパク質をコードする転写物と結合するのを抑制することにより翻訳を阻害する。配列番号 1 のシグナルおよび 5 ' 配列の適切な部分を用い、有効なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、m R N A のあらゆる部分を標的にするあらゆる約 1 5 - 3 5 ヌクレオチドを含み、好ましくは、アンチセンスオリゴは図 1 A、1 B および 2 A、2 B に示すポリペプチドのシグナルまたはコーディング配列に翻訳される領域にわたる。適切なオリゴヌクレオチドは O L I G O 4 . 0 6 ソフトウェアおよび R A T L 1 d 6 タンパク質コーディング配列を用いて設計する。

20

30

【 0 2 7 9 】

実施例 5

R A T L 1 d 6 の発現

【 0 2 8 0 】

R A T L 1 d 6 ポリペプチドの発現は、コーディング c D N A を適切なベクターにサブクローニングし、該ベクターを宿主細胞に形質転換することにより達成される。この実施例ではクローニングベクター p G E X を用い、D H 5 宿主細胞中で R A T L 1 d 6 を発現させる。

40

E . c o l i を宿主細胞に用いるこの実施例により、クローニングベクターは、クローニング部位の上流の - ガラクトシダーゼのためのプロモーター、次いでグルタチオン S - トランスフェラーゼ (G S T) をコードする配列を含む。これら残基の直後には転写に有用なバクテリオファージプロモーターおよび多くのユニークな制限部位を含むリンカーがある。

【 0 2 8 1 】

標準的方法を用いる I P T G による単離された形質転換細菌株の誘導は、- ガラクトシダーゼの最初の 8 残基、約 5 - 1 5 残基のリンカー、G S T を含む融合タンパク質、次い

50

で完全長 R A T L 1 d 6 タンパク質を生じる。シグナル残基は、細菌増殖培地への R A T L 1 d 6 タンパク質の分泌を指示し、これを直接アッセイに用いて該タンパク質の活性を測定することができる。

【0282】

実施例 6

R A T L 1 d 6 活性の証明

R A T L 1 d 6 遺伝子産物の活性は、多ユビキチン鎖形成を触媒する遊離ユビキチンおよび E 2 ユビキチン担体タンパク質から多ユビキチンコンジュゲートおよびユビキチン - R A T L 1 d 6 チオールエステルリンケージを形成することにより *in vitro* で証明される (S. Van Nocker および R. D. Vierstra, 1991, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 88: 10297 - 10301)。10
簡単には、ユビキチンおよび E 2 (20 kDa)、コントロール、および R A T L 1 d 6 タンパク質間のチオールエステル付加形成を A. L. Haasら、1982, J. Biol. Chem., 257: 2543 - 2548 に記載のごとくアッセイする。^{1 2}
⁵ I 標識ユビキチンまたは [Arg^{4 8}] ユビキチン (1 μM) を反応混合物中、50 m M T r i s - H C l、p H 8.0 中の R A T L 1 d 6 タンパク質 (50 - 500 n M)、E 1 (ユビキチン活性化酵素)、(10 n M)、および E 2 (20 k D a)、(50 - 500 n M)、およびおよび M g A T P (2 m M) と 30 で 2 分間インキュベーションする。コンジュゲートの形成をアッセイするために、同じ反応混合物を 37 で 20
種々の時間インキュベーションし続ける。R A T L 1 d 6 の活性による多ユビキチンコンジュゲートとチオールエステルの連結はポリアクリルアミドゲル電気泳動により遊離ユビキチンから分離され、オートラジオグラフにより可視化される。

【0283】

実施例 7

ノーザン分析

ノーザン分析を用いて遺伝子の転写物の存在を検出し、これには標識ヌクレオチド配列の、特定の細胞または組織種由来の R N A が結合している膜とのハイブリダイゼーションが含まれる (J. Sambrookら、上記、参照)。B L A S T (S. F. Altschul, 1993, J. Mol. Evol., 36: 290 - 300、および S. F. Altschulら、1990, J. Mol. Evol., 215: 403 - 410) を用いる類似のコンピューター技術を用い、ヌクレオチドデータベース、例えば G e n B a n k または L I F E S E Q データベース (I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s) 中の同一または関連分子を検索する。この分析法は、多膜ベースのハイブリダイゼーションを実施するよりはるかに急速で労力も少ない。さらに、コンピューター分析の感度を修飾し、あらゆる特定のマッチが正しい (同一) またはホモローガスであると分類されるかどうかを決定することができる。30

【0284】

検索の基準は、以下のように定義される生成物スコアである：

(% 配列同一性 × 最大 B L A S T スコア) / 100。生成物スコアは、2 配列間の類似性の程度と配列マッチの長さを考慮する。例えば、生成物スコア 40 ではマッチは誤差 1 - 2 % 以内の正確さであり、70 ではマッチは正確であろう。ホモローガスな分子は、生成物スコアが 15 ~ 40 のものを選ぶことにより通常確認されるが、より低スコアが関連分子を確認するかもしれない。ノーザン分析の結果は、R A T L 1 d 6 をコードする転写物が生じるライブラリーのリストとして報告される。存在度および存在度 % も報告する。存在度は特定の転写物が c D N A ライブラリー中に存在する回数を反映し、存在度 % は存在度を c D N A ライブラリー中の試験配列の総数で割ったものである。40

【0285】

実施例 8

マイクロアレー

マイクロアレー用のオリゴヌクレオチドを作製するため、配列番号 1 を該ヌクレオチド配 50

列の3'末端で出発するコンピュータアルゴリズムを用いて試験する。該アルゴリズムは、該遺伝子にユニークな、ハイブリダイゼーションに適した範囲内のGC含量を有し、ハイブリダイゼーションと干渉する予測される2次構造を欠く限定した長さのオリゴマーを同定する。該アルゴリズムは、長さ20ヌクレオチド、すなわち20量体の特異的オリゴヌクレオチドを同定する。各配列の中心の1ヌクレオチドが変化したマッチしたオリゴヌクレオチドのセットが生成される。この方法はマイクロアレー中の各遺伝子について反復され、2セットの20量体を蛍光または放射活性ヌクレオチドの存在下で合成し、基質表面上に配置する。基質がシリコンチップであるときは光指向性の化学的方法を沈着に用いる(WO 95/11995、M. Cheeら)。

【0286】

あるいはまた、化学カップリング法およびインクジェット装置を用いて基質表面にオリゴマーを合成する(WO 95/25116、J. D. Baldeschweilerら)。別の方法として、ドット(またはスロット)プロットと類似の「グリッド化」アレーを用い、例えば真空システム、または熱、UV、機械的、または化学的結合技術を用いて基質表面にcDNA断片またはオリゴヌクレオチドを配置および結合させる。典型的アレーは、手で、または利用可能な物質および装置を用いて作製してよく、8ドット、24ドット、96ドット、384ドット、1536ドット、または6144ドットのグリッドを含んでよい。ハイブリダイゼーション後、該マイクロアレーを洗浄してあらゆるハイブリダイズしていないプローブを除去し、検出装置を用いて放射活性または蛍光のレベルとパターンを検出する。検出装置はX線フィルムのように簡単なものでも、光スキャンニング装置のように複雑なものであってもよい。スキャンした蛍光画像を検討して相補性の程度およびマイクロアレー中の各オリゴヌクレオチド配列の相対存在度/発現レベルを決定する。

【0287】

実施例9

RATL1d6ポリペプチドに特異的な抗体の製造

担体、例えばBSAまたはKLHと結合したRATL1d6ペプチドまたは完全長RATL1d6タンパク質を免疫原に用いて宿主、例えばウサギまたはマウスに抗体を生じさせる。別の方法として、RATL1d6融合タンパク質、すなわちGSTまたは6xHISと融合したRATL16を適切な発現系、例えば細菌、昆虫、または哺乳動物細胞で発現させ、得られた融合生成物を標準的方法に従って単離し、これを免疫原に用いて当業者に知られた日常的製造方法およびプロトコールを利用してポリクローナルまたはモノクローナル抗体を生成する。

【0288】

別の方法として、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、(J. Sambrook、上記)、または他の精製技術を用いて実質的に精製されるRATL1d6ポリペプチドを用い、標準プロトコールを用いてウサギを免疫し、抗体を産生する。配列番号2からのアミノ酸配列をLASERGENEソフトウェア(DNA STAR Inc.)を用いて分析し、高免疫原性領域を決定し、1またはそれ以上の対応するオリゴペプチドを合成し、これを用いて当業者に知られ、用いられる方法により抗体を生じさせる。適切なエピトープ、例えばC末端付近または親水性領域中のものの選択はF. M. Ausubelら、上記、その他に記載されている。

【0289】

典型的には、該オリゴヌクレオチドは長さ15残基で、fmoc化学を用い、ABI Peptide Synthesizer 431A (PE Biosystems)を用いて合成され、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; F. M. Ausubelら、上記)を用いる反応によりKLH (Sigma、St. Louis、MO)とカップリングする。ウサギをFreundアジュバント中のオリゴペプチド-KLH複合体で免疫する。得られる抗血清の抗ペプチド活性を、例えば該ペプチドをプラスチックに結合させ、1%ウシ血清アルブミン(BSA)でブロック

10

20

30

40

50

ングし、ウサギ抗血清と反応させ、洗浄し、放射性ヨウ素化、または酵素標識（例えばホースラディッシュパーオキシダーゼ）ヤギまたはマウス抗ウサギIgG免疫グロブリンと反応させることにより試験する。

【0290】

実施例10

特異抗体を用いる天然RATL1d6ポリペプチドの精製

天然または組換えRATL1d6ポリペプチドをRATL1d6ポリペプチド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ーにより実質的に精製する。イムノアフィニティカラムを抗RATL1d6ポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂、例えばCNBr活性化SEPHAROSE（Amersham Pharmacia Biotech）と共有結合的にカップリングさせることにより構築する。カップリング後、樹脂を、製造業者の指示書に従ってブロックし、洗浄する。

10

【0291】

RATL1d6ポリペプチドを含む媒質をイムノアフィニティカラムに通し、該カラムをRATL1d6ポリペプチドが選択的に吸収される条件下（例えば、界面活性剤存在下の高イオン強度緩衝液）で洗浄する。該カラムを抗体/RATL1d6ポリペプチド結合を妨げる条件下（例えばpH 2-3の緩衝剤または高濃度のカオトロップ、例えば尿素またはチオシアネートイオン）で溶出し、RATL1d6ポリペプチドを回収する。

【0292】

実施例11

RATL1d6ポリペプチドと相互作用する分子の同定

RATL1d6ポリペプチドまたは生物学的に活性なその断片を¹²⁵I Bolton-Hunter 試薬（Boltonら、1973、Biochem. J., 133: 529）で標識する。マルチウェルプレートのウェルに予め配置した候補分子を標識RATL1d6ポリペプチドとインキュベーションし、洗浄し、標識RATL1d6ポリペプチド-候補分子複合体を有するあらゆるウェルをアッセイする。種々の濃度のRATL1d6ポリペプチドを用いて得られるデータを用いてRATL1d6ポリペプチドと候補分子の結合、親和性、数に関する値を計算する。

20

【0293】

RATL1d6ポリペプチドと相互作用するタンパク質、ペプチドまたは他の分子を同定するのに適した別の方法には、リガンド結合アッセイ、例えば上記酵母-2ハイブリッド系が含まれる。

30

【0294】

実施例12

本発明のRATL1d6ポリペプチドに対応するNおよびC末端欠失突然変異体の作製

本明細書の他の箇所に記載のごとく、本発明には、本発明のRATL1d6ポリペプチドに対応するNおよびC末端欠失突然変異体、およびそのNおよびC末端欠失のあらゆる組み合わせの作製が含まれる。そのような突然変異体を作製するには、多くの方法が当業者に利用可能である。そのような方法には、PCR増幅と遺伝子クローニング方法論の組み合わせが含まれる。本明細書が提供または記載する、および/または標準法として当該分野で知られた技術の使用を通して分子生物学の当業者は本発明の各欠失突然変異体を容易に作製することができるであろうが、その代表的方法を以下に記載する。

40

【0295】

簡単には、完全長RATL1d6ポリペプチド配列またはスプライス変異体配列をコードする単離されたcDNAクローンを用い、配列番号1の望ましい5'および3'位からの約15-25ヌクレオチドの適切なプライマーを設計し、目的とするNおよび/またはC末端欠失突然変異体をPCR増幅し、次いでクローンすることができよう。そのようなプライマーは、例えば、5'および3'プライマーに対する開始および終止コドンをそれぞれ含むことができる。そのようなプライマーは、増幅後の欠失突然変異体のクローニングを促進する制限部位を含むこともできる。さらに、該プライマーはさらなる配列、例えば

50

、 f l a g - t a g 配列、 k o z a c 配列または本明細書に記載および/または引用した他の配列を含むことができる。

【 0 2 9 6 】

例えば、 D 6 7 ~ G 4 2 2 N 末端欠失突然変異体の場合、表 1 に示す以下のプライマーを用いてこの欠失突然変異体に対応する c D N A 断片を増幅することができる。

【 0 2 9 7 】

表 1

5'プライマー	5'-gcagca <u>g</u> cgccgc gacgagctgagctgcgagttctctgc-3' (配列番号 13)、 ここで、下線を付した配列は NotI 制限酵素部位を表す。
3'プライマー	5'-gcagca <u>g</u> tcgac gccctctctcttttgggggtgtgtac-3' (配列番号 14)、 ここで、下線を付した配列は Sall 制限酵素部位を表す。

10

【 0 2 9 8 】

さらに、 M 1 ~ Q 3 5 9 C 末端欠失突然変異体の場合、例えば、表 2 に示す以下のプライマーを用いてこの欠失突然変異体に対応する c D N A 断片を増幅することができる。

【 0 2 9 9 】

表 2

5'プライマー	5'-gcagca <u>g</u> cgccgc atgcagcagccgcagccgcaggggc-3' (配列番号 15)、 ここで、下線を付した配列は NotI 制限酵素部位を表す。
3'プライマー	5'-gcagca <u>g</u> tcgac gccctgtttggtgagaagttccatg-3' (配列番号 16)、 ここで、下線を付した配列は Sall 制限酵素部位を表す。

30

【 0 3 0 0 】

代表的 P C R 増幅条件を以下に示すが、当業者は他の条件が効率的増幅に使用され、そして/または必要であるかもしれないことを認識するであろう。100 μ l P C R 反応混合物を 10 n g の鑄型 D N A (R A T L 1 d 6 の c D N A クローン)、200 μ M 4 d N T P、1 μ M プライマー、0.25 U T a q D N A ポリメラーゼ (P E)、および標準的 T a q D N A ポリメラーゼ緩衝液を用いて調製することができる。典型的な P C R のサイクリング (繰り返し) 条件は以下の通りである :

40

20-25 サイクル	45 秒間、93 度 2 分間、50 度 2 分間、72 度
1 サイクル	10 分間、72 度

【0301】

10

PCRの最終伸長工程後、5 Uクレノー断片を加え、30度で15分間インキュベーションすることができる。

【0302】

Not IおよびSal I制限酵素で断片を消化したら、同様に消化した（例えばpSport1その他）適切な発現および/またはクローニングベクター中に断片をクローンすることができる。当業者は、他のプラスミドを同様に置きかえることができ、ある環境では望ましいかもしれないことを認識するであろう。次に、消化した断片およびベクターをDNARIガーゼを用いて連結し、次いでこれを用い、本明細書に記載の、および/または当該分野で知られた方法を用いてコンピテントなE. coli細胞を形質転換する。

【0303】

20

あらゆるさらなるN末端欠失突然変異体を増幅するための5'プライマー配列は以下の式を参照することにより決定することができる：

$$(S + (X * 3)) \sim ((S + (X * 3)) + 25)$$

[式中、「S」はRATL1d6遺伝子（配列番号1）の開始出発コドンのヌクレオチド位に等しく、「X」は目的とするN末端欠失突然変異体の最もN末端のアミノ酸に等しい。]。最初の用語は5'プライマーの出発5'ヌクレオチド位を規定し、2番目の用語は、配列番号1のセンス鎖に対応する5'プライマーの末端3'ヌクレオチド位を規定する。該プライマーの対応するヌクレオチド位が決定されたら、最終ヌクレオチド配列を、例えば該配列の5'末端に適用できる制限部位配列を加えることにより作製することができる。本明細書に記載のごとく、ある環境では該5'プライマーに他の配列を加えることが望ましいことがある（例えばkozac配列など）。

30

【0304】

あらゆるさらなるN末端欠失突然変異体を増幅するための3'プライマー配列を以下の式を参照して決定することができる：

$$(S + (X * 3)) \sim ((S + (X * 3)) - 25)$$

[式中、「S」はRATL1d6遺伝子（配列番号1）の開始出発コドンのヌクレオチド位に等しく、「X」は目的とするN末端欠失突然変異体の最もC末端のアミノ酸に等しい。]。最初の用語は3'プライマーの出発5'ヌクレオチド位を規定し、2番目の用語は、配列番号1のアンチセンス鎖に対応する3'プライマーの末端3'ヌクレオチド位を規定する。該プライマーの対応するヌクレオチド位が決定されたら、最終ヌクレオチド配列を、例えば該配列の5'末端に適用できる制限部位配列を加えることにより作製することができる。本明細書に記載のごとく、ある環境では該3'プライマーに他の配列を加えることが望ましいことがある（例えば終止コドン配列など）。当業者は、上記ヌクレオチド位に対する修飾がPCR増幅を最適化するのに必要なことがあることを認識するであろう。

40

【0305】

上記の同じ一般式を本発明のあらゆるC末端欠失突然変異体を増幅するための5'および3'プライマー配列を同定するのに用いることができる。さらに、上記の同じ一般式を本発明のN末端およびC末端欠失突然変異体のあらゆる組み合わせを増幅するための5'および3'プライマー配列を同定するのに用いてよい。当業者は、上記ヌクレオチド位の修

50

飾がPCR増幅の最適化に必要なことがあることを認識するであろう。

【0306】

好ましくは、配列番号2の以下のN末端RATL1d6欠失ポリペプチドが本発明に含まれる：配列番号2の、

【化11】

M1-G422, Q2-G422, Q3-G422, P4-G422, Q5-G422, P6-G422, Q7-G422,
G8-G422, Q9-G422, Q10-G422, Q11-G422, P12-G422, G13-G422, P14-
G422, G15-G422, Q16-G422, Q17-G422, L18-G422, G19-G422, G20-G422,
Q21-G422, G22-G422, A23-G422, A24-G422, P25-G422, G26-G422, A27-
G422, G28-G422, G29-G422, G30-G422, P31-G422, G32-G422, G33-
G422, G34-G422, P35-G422, G36-G422, P37-G422, G38-G422, P39-G422,
C40-G422, L41-G422, R42-G422, R43-G422, E44-G422, L45-G422, K46-
G422, L47-G422, L48-G422, E49-G422, S50-G422, I51-G422, F52-G422,
H53-G422, R54-G422, G55-G422, H56-G422, E57-G422, R58-G422, F59-
G422, R60-G422, I61-G422, A62-G422, S63-G422, A64-G422, C65-G422,
L66-G422, D67-G422, E68-G422, L69-G422, S70-G422, C71-G422, E72-
G422, F73-G422, L74-G422, L75-G422, A76-G422, G77-G422, A78-G422,
G79-G422, G80-G422, A81-G422, G82-G422, A83-G422, G84-G422, A85-
G422, A86-G422, P87-G422, G88-G422, P89-G422, H90-G422, L91-G422,
P92-G422, P93-G422, R94-G422, G95-G422, S96-G422, V97-G422, P98-
G422, G99-G422, D100-G422, P101-G422, V102-G422, R103-G422, I104-
G422, H105-G422, C106-G422, N107-G422, I108-G422, T109-G422, E110-
G422, S111-G422, Y112-G422, P113-G422, A114-G422, V115-G422,

10

20

30

【0307】

【化12】

P116-G422, P117-G422, I118-G422, W119-G422, S120-G422, V121-G422,
 E122-G422, S123-G422, D124-G422, D125-G422, P126-G422, N127-
 G422, L128-G422, A129-G422, A130-G422, V131-G422, L132-G422, E133-
 G422, R134-G422, L135-G422, V136-G422, D137-G422, I138-G422, K139-
 G422, K140-G422, G141-G422, N142-G422, T143-G422, L144-G422,
 L145-G422, L146-G422, Q147-G422, H148-G422, L149-G422, K150-G422,
 R151-G422, I152-G422, I153-G422, S154-G422, D155-G422, L156-G422, 10
 C157-G422, K158-G422, L159-G422, Y160-G422, N161-G422, L162-G422,
 P163-G422, Q164-G422, H165-G422, P166-G422, D167-G422, V168-
 G422, E169-G422, M170-G422, L171-G422, D172-G422, Q173-G422,
 P174-G422, L175-G422, P176-G422, A177-G422, E178-G422, Q179-G422,
 C180-G422, T181-G422, Q182-G422, E183-G422, D184-G422, V185-
 G422, S186-G422, S187-G422, E188-G422, D189-G422, E190-G422,
 D191-G422, E192-G422, E193-G422, M194-G422, P195-G422, E196- 20
 G422, D197-G422, T198-G422, E199-G422, D200-G422, L201-G422,
 D202-G422, H203-G422, Y204-G422, E205-G422, M206-G422, K207-
 G422, E208-G422, E209-G422, E210-G422, P211-G422, A212-G422,
 E213-G422, G214-G422, K215-G422, K216-G422, S217-G422, E218-G422,
 D219-G422, D220-G422, G221-G422, I222-G422, G223-G422, K224-G422,
 E225-G422, N226-G422, L227-G422, A228-G422, I229-G422, L230-G422,
 E231-G422, K232-G422, I233-G422, K234-G422, K235-G422, N236-G422, 30
 Q237-G422, R238-G422, Q239-G422, D240-G422, Y241-G422, L242-
 G422, N243-G422, G244-G422, A245-G422, V246-G422, S247-G422,
 G248-G422, S249-G422, V250-G422, Q251-G422, A252-G422, T253-
 G422, D254-G422, R255-G422, L256-G422, M257-G422, K258-G422,
 E259-G422, L260-G422, R261-G422, D262-G422, I263-G422, Y264-G422,
 R265-G422, S266-G422, Q267-G422, S268-G422, F269-G422, K270-G422,
 G271-G422, G272-G422, N273-G422, Y274-G422, A275-G422, V276- 40
 G422, E277-G422, L278-G422, V279-G422, N280-G422, D281-G422,
 S282-G422, L283-G422, Y284-G422, D285-G422, W286-G422, N287-
 G422, V288-G422, K289-G422, L290-G422, L291-G422, K292-G422, V293-

【 0 3 0 8 】

【 化 1 3 】

G422, D294-G422, Q295-G422, D296-G422, S297-G422, A298-G422,
 L299-G422, H300-G422, N301-G422, D302-G422, L303-G422, Q304-G422,
 I305-G422, L306-G422, K307-G422, E308-G422, K309-G422, E310-G422,
 G311-G422, A312-G422, D313-G422, F314-G422, I315-G422, L316-G422,
 L317-G422, N318-G422, F319-G422, S320-G422, F321-G422, K322-G422,
 D323-G422, N324-G422, F325-G422, P326-G422, F327-G422, D328-G422,
 P329-G422, P330-G422, F331-G422, V332-G422, R333-G422, V334-G422,
 V335-G422, S336-G422, P337-G422, V338-G422, L339-G422, S340-G422,
 G341-G422, G342-G422, Y343-G422, V344-G422, L345-G422, G346-
 G422, G347-G422, G348-G422, A349-G422, I350-G422, C351-G422,
 M352-G422, E353-G422, L354-G422, L355-G422, T356-G422, K357-G422,
 Q358-G422, G359-G422, W360-G422, S361-G422, S362-G422, A363-
 G422, Y364-G422, S365-G422, I366-G422, E367-G422, S368-G422, V369-
 G422, I370-G422, M371-G422, Q372-G422, I373-G422, S374-G422, A375-
 G422, T376-G422, L377-G422, V378-G422, K379-G422, G380-G422,
 K381-G422, A382-G422, R383-G422, V384-G422, Q385-G422, F386-G422,
 G387-G422, A388-G422, N389-G422, K390-G422, S391-G422, Q392-
 G422, Y393-G422, S394-G422, L395-G422, T396-G422, R397-G422,
 A398-G422, Q399-G422, Q400-G422, S401-G422, Y402-G422, K403-
 G422, S404-G422, L405-G422, V406-G422, Q407-G422, I408-G422, H409-
 G422, E410-G422, K411-G422, N412-G422, G413-G422, W414-G422,
 Y415-G422, および/または T416-G422。

10

20

30

【 0 3 0 9 】

これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列も提供する。1またはそれ以上のこれらN末端R A T L 1 d 6欠失ポリペプチドを本明細書の他の箇所に記載の免疫原性および/または抗原性エピトープとして用いることができる。

【 0 3 1 0 】

また、好ましくは、配列番号2の以下のC末端R A T L 1 d 6欠失ポリペプチドが本発明に含まれる：配列番号2の、

【 化 1 4 】

40

M1-G422, M1-D421, M1-E420, M1-K419, M1-P418, M1-P417, M1-T416,
 M1-Y415, M1-W414, M1-G413, M1-N412, M1-K411, M1-E410, M1-H409,
 M1-I408, M1-Q407, M1-V406, M1-L405, M1-S404, M1-K403, M1-Y402, M1-
 S401, M1-Q400, M1-Q399, M1-A398, M1-R397, M1-T396, M1-L395, M1-

【 0 3 1 1 】

【 化 1 5 】

S394, M1-Y393, M1-Q392, M1-S391, M1-K390, M1-N389, M1-A388, M1-
 G387, M1-F386, M1-Q385, M1-V384, M1-R383, M1-A382, M1-K381, M1-
 G380, M1-K379, M1-V378, M1-L377, M1-T376, M1-A375, M1-S374, M1-
 I373, M1-Q372, M1-M371, M1-I370, M1-V369, M1-S368, M1-E367, M1-
 I366, M1-S365, M1-Y364, M1-A363, M1-S362, M1-S361, M1-W360, M1-
 G359, M1-Q358, M1-K357, M1-T356, M1-L355, M1-L354, M1-E353, M1-
 M352, M1-C351, M1-I350, M1-A349, M1-G348, M1-G347, M1-G346, M1-
 L345, M1-V344, M1-Y343, M1-G342, M1-G341, M1-S340, M1-L339, M1-
 V338, M1-P337, M1-S336, M1-V335, M1-V334, M1-R333, M1-V332, M1-
 F331, M1-P330, M1-P329, M1-D328, M1-F327, M1-P326, M1-F325, M1-
 N324, M1-D323, M1-K322, M1-F321, M1-S320, M1-F319, M1-N318, M1-
 L317, M1-L316, M1-I315, M1-F314, M1-D313, M1-A312, M1-G311, M1-
 E310, M1-K309, M1-E308, M1-K307, M1-L306, M1-I305, M1-Q304, M1-
 L303, M1-D302, M1-N301, M1-H300, M1-L299, M1-A298, M1-S297, M1-
 D296, M1-Q295, M1-D294, M1-V293, M1-K292, M1-L291, M1-L290, M1-
 K289, M1-V288, M1-N287, M1-W286, M1-D285, M1-Y284, M1-L283, M1-
 S282, M1-D281, M1-N280, M1-V279, M1-L278, M1-E277, M1-V276, M1-
 A275, M1-Y274, M1-N273, M1-G272, M1-G271, M1-K270, M1-F269, M1-
 S268, M1-Q267, M1-S266, M1-R265, M1-Y264, M1-I263, M1-D262, M1-
 R261, M1-L260, M1-E259, M1-K258, M1-M257, M1-L256, M1-R255, M1-
 D254, M1-T253, M1-A252, M1-Q251, M1-V250, M1-S249, M1-G248, M1-
 S247, M1-V246, M1-A245, M1-G244, M1-N243, M1-L242, M1-Y241, M1-
 D240, M1-Q239, M1-R238, M1-Q237, M1-N236, M1-K235, M1-K234, M1-
 I233, M1-K232, M1-E231, M1-L230, M1-I229, M1-A228, M1-L227, M1-
 N226, M1-E225, M1-K224, M1-G223, M1-I222, M1-G221, M1-D220, M1-
 D219, M1-E218, M1-S217, M1-K216, M1-K215, M1-G214, M1-E213, M1-
 A212, M1-P211, M1-E210, M1-E209, M1-E208, M1-K207, M1-M206, M1-
 E205, M1-Y204, M1-H203, M1-D202, M1-L201, M1-D200, M1-E199, M1-
 T198, M1-D197, M1-E196, M1-P195, M1-M194, M1-E193, M1-E192, M1-
 D191, M1-E190, M1-D189, M1-E188, M1-S187, M1-S186, M1-V185, M1-
 D184, M1-E183, M1-Q182, M1-T181, M1-C180, M1-Q179, M1-E178, M1-

10

20

30

40

【 0 3 1 2 】

【 化 1 6 】

A177, M1-P176, M1-L175, M1-P174, M1-Q173, M1-D172, M1-L171, M1-M170, M1-E169, M1-V168, M1-D167, M1-P166, M1-H165, M1-Q164, M1-P163, M1-L162, M1-N161, M1-Y160, M1-L159, M1-K158, M1-C157, M1-L156, M1-D155, M1-S154, M1-I153, M1-I152, M1-R151, M1-K150, M1-L149, M1-H148, M1-Q147, M1-L146, M1-L145, M1-L144, M1-T143, M1-N142, M1-G141, M1-K140, M1-K139, M1-I138, M1-D137, M1-V136, M1-L135, M1-R134, M1-E133, M1-L132, M1-V131, M1-A130, M1-A129, M1-L128, M1-N127, M1-P126, M1-D125, M1-D124, M1-S123, M1-E122, M1-V121, M1-S120, M1-W119, M1-I118, M1-P117, M1-P116, M1-V115, M1-A114, M1-P113, M1-Y112, M1-S111, M1-E110, M1-T109, M1-I108, M1-N107, M1-C106, M1-H105, M1-I104, M1-R103, M1-V102, M1-P101, M1-D100, M1-G99, M1-P98, M1-V97, M1-S96, M1-G95, M1-R94, M1-P93, M1-P92, M1-L91, M1-H90, M1-P89, M1-G88, M1-P87, M1-A86, M1-A85, M1-G84, M1-A83, M1-G82, M1-A81, M1-G80, M1-G79, M1-A78, M1-G77, M1-A76, M1-L75, M1-L74, M1-F73, M1-E72, M1-C71, M1-S70, M1-L69, M1-E68, M1-D67, M1-L66, M1-C65, M1-A64, M1-S63, M1-A62, M1-I61, M1-R60, M1-F59, M1-R58, M1-E57, M1-H56, M1-G55, M1-R54, M1-H53, M1-F52, M1-I51, M1-S50, M1-E49, M1-L48, M1-L47, M1-K46, M1-L45, M1-E44, M1-R43, M1-R42, M1-L41, M1-C40, M1-P39, M1-G38, M1-P37, M1-G36, M1-P35, M1-G34, M1-G33, M1-G32, M1-P31, M1-G30, M1-G29, M1-G28, M1-A27, M1-G26, M1-P25, M1-A24, M1-A23, M1-G22, M1-Q21, M1-G20, M1-G19, M1-L18, M1-Q17, M1-Q16, M1-G15, M1-P14, M1-G13, M1-P12, M1-Q11, M1-Q10, M1-Q9, M1-G8, および/または M1-Q7。

10

20

30

【0313】

これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列も提供する。1またはそれ以上のこれらC末端RATL1d6欠失ポリペプチドを本明細書の他の箇所に記載の免疫原性および/または抗原性エピトープとして用いることができる。

【0314】

あるいはまた、本発明の好ましいポリペプチド/ペプチドには、例えば配列番号2のRATL1d6ポリペプチドの内部領域(例えばNおよびC末端RATL1d6ポリペプチド欠失のあらゆる組み合わせ)に対応するポリペプチド/ペプチド配列が含まれる。例えば、内部領域は下記式により定義することができる：

アミノ酸「NX」～アミノ酸「CX」

[式中、「NX」はRATL1d6(配列番号2)のあらゆるN末端欠失ポリペプチドアミノ酸を表し、「CX」はRATL1d6(配列番号2)のあらゆるC末端欠失ポリペプチドアミノ酸を表す。]。これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。本発明にはこれらポリペプチドを本明細書の他の箇所に記載のごとく免疫原性および/または抗原性エピトープとして使用することも含まれる。

40

【0315】

実施例13

50

ヒト R A T L 1 D 6 ポリペプチドの発現プロフィール

以下の P C R プライマー対を用い、定量的 P C R により R A T L 1 d 6 m R N A の定常レベルを測定する：

センス：	5'-aggatcatctccgacctgtg-3' (配列番号 48)
アンチセンス：	5'-caagggttgatccagcatct-3' (配列番号 49)

【 0 3 1 6 】

簡単には、第 1 鎖 c D N A は、市販の m R N A (C l o n t e c h , P a l o A l t o
、 C A)、すなわち、図 6 の発現プロフィールにおいて分析した 15 組織から得られた m
R N A から作製した。各アッセイで使用した c D N A の相対量は、すべての組織において
等量に発現した遺伝子、すなわちシクロフィリンに対するプライマー対を用いる並行実験
を行うことにより決定した。シクロフィリンプライマー対は各試料中の c D N A の量の小
さな変動を検出し、これらデータを R A T L 1 d 6 遺伝子に対するプライマー対を用いて
得られたデータの正規化に用いた。 10

【 0 3 1 7 】

P C R データを、図 6 に示すように試験した組織間の転写物発生量の差の相対評価に変換
した。ユビキチン結合酵素、R A T L 1 D 6 に対応する転写物は多くの組織、主として精
巢、脾臓、および脊髄に高レベルに発現し、胸腺、小腸では有意に、前立腺、肺、骨髄、
腎臓、脳、肝臓、心臓、リンパ節、下垂体、および膵臓組織ではより少ない程度に発現し
た。R A T L 1 d 6 ポリペプチドの偏在性の発現は、ユビキチン結合酵素としての重要な
役割と一致しており、種々の細胞の過程における必須酵素としてのその機能が確認される
。 20

【 0 3 1 8 】

実施例 1 4

L P S 誘導性ルシフェラーゼレポーター系における R A T L 1 d 6 関連 D r o s o p h i
l a 相同分子種 E G : 2 5 E 8 . 2 の機能試験

【 0 3 1 9 】

安定な S 2 細胞株を、ルシフェラーゼレポーターと融合した L P S 反応性 A t t a c i n
(アタシン) D プロモーターを用いて作製した (T a u s z i g , S . ら、2000、P
r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、97:10520-10525 から
下記のごとく修飾)。S 2 細胞を I n v i t r o g e n から購入し、25 で、10% 加
熱不活化ウシ胎児血清 (C a t . N o . 10100-147、I n v i t r o g e n、
元 G I B C O B R L)、100 単位 / m l ペニシリン、100 μ g / m l ストレプトマ
イシン (ペニシリン - ストレプトマイシンの 100 X ストック液、C a t . N o . 15
140-148、I n v i t r o g e n、元 G I B C O B R L)、および 20 m M L -
グルタミン (100 x L - グルタミン、C a t . N o . 25030-149、I n v i
t r o g e n、元 G I B C O B R L) を含む完全 1 x S c h n e i d e r の D r o s
o p h i l a 培地 (C a t . N o . 11720-034、I n v i t r o g e n、元 G
I B C O B R L) 中で維持した。 30 40

【 0 3 2 0 】

A t t a c i n D A M P 遺伝子の 1 . 6 K b プロモーター領域を下記プライマー対を用
いる P C R により S 2 ゲノム D N A から単離した：

5' - a t g a g g c t t g g a t c a g c t t t t - 3' (配列番号 50)、(フォワ
ード、A E 0 0 3 7 1 8 D r o s o p h i l a ゲノムプロジェクトの 157904 - 1
57923 b p) および 5' - c c t g a a g c c t g a c a t t c c a t - 3' (配
列番号 51)、(逆、A E 0 0 3 7 1 8 の 159547 - 159566 b p)。プライマ
ーは G I B C O B R L から得た。P C R 条件は以下の通りであった：96
4、2 分間；55、45 秒間；72 2 分間；P C R 35 サイクル。1 . 6 k b A 50

ttacinD PCR断片をpCR2.1-TOPOベクターにサブクローンした(TOPO TAクローニングキット、Cat. No. K4500-01、Invitrogen)。AttacinD プロモーターはpCR2.1-TOPOベクターからvector into the制限酵素 SacIおよびXhoIを有するpGL3-エンハンサーシフェラーゼベクターにサブクローンした(pGL3-エンハンサーシフェラーゼレポーターベクター、Cat. No. E1771、Promega)。同様の領域がレポーターアッセイにおいてLPS反応性であることが示された(Tauszig、S.ら、2000、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97:10520-10525)。

【0321】

最終トランスフェクション構築物、pGL3-エンハンサー-AttacinDを、ヒグロマイシン-B耐性遺伝子を安定な選択として提供するpCoHYGROプラスミドを用い、既知のリソカルシウム法を用いて共トランスフェクションした。この構築物を用いてS2細胞をトランスフェクトした(Inducible DESキット、Cat. No. K4120-01、Drosophila Expression System Instruction Manual、Invitrogen)。

【0322】

簡単には、19 µgのpGL3-エンハンサー-AttacinD DNAを1 µgのpCoHYGRO DNAおよびトランスフェクション緩衝液と混合し、該混合物を用いて6ウェルFalcon組織培養プレート中、6-12 × 10⁶細胞/3ml/ウェルをトランスフェクションした。安定な細胞を選択し、300 µg/ml ヒグロマイシンB (Cat. No. R220-05、Invitrogen)を含む完全Schneider培地中で維持した。安定な株をLPSに対する応答性について試験した(Han、Z. S.およびIp、Y. T.、1999、J. Biol. Chem.、274:21355-21361)。細胞を20 µg/ml LPS (Cat. No. L-2654、Sigma)で5時間処理した。ルシフェラーゼ発現をBright-Glo(登録商標)ルシフェラーゼアッセイ系(Cat. No. E2620、Promega)を用いてアッセイし、ルミネッセンスシグナルを1450 MICROBETA Wallac Jet Liquid Scintillation & Luminescence Counter (Perkin Elmer Life Sciences)により検出した。3回の限界希釈後に2つの安定なAttD-lucレポーター細胞株(E4-1およびE4-9)を得、これをさらなる実験に用いた。

【0323】

RNAi構築物を以下のごとくEG:25E8.2およびコントロール遺伝子について作製した。Drosophila遺伝子に対する相補的DNA(cDNA)クローンをResearch Genetics、Inc (St. Louis、MO)から得た。これらにはRelish (EST GH01881)、IKKB (EST LD21354)、Cactus (LD18620)、およびEG:25E8.2 (LD09991)由来のcDNAが含まれた(Rubin、G. M.ら、2000、Science、287:2222-2224)。二本鎖RNAiをHammond、S. M.ら、2000、Nature、404:293-0296の改良プロトコールに従って作製した。簡単には、dsRNAを、MEGAscript(登録商標)T7 High Yield Transcription Kit (Cat. No. 1334、Ambion)を用いてT7プロモーター配列フランキングcDNA挿入物を用いるPCRにより増幅した鋳型から合成した。GH0881およびLD21354をpOT2ベクター中で用いる(フォワードプライマー:5'-actgcagccgattcattaatg-3'、(配列番号52)、(リバースプライマー:5'-gaattaatacgactcactataggagatatcatatacacaatacgaatttag-3')、(配列番号53))、LD18620およびCG2924をpBSベクター中で用いた(フォワードプライマー:5'-gaattaatacgactcactataggagagacatgatta

10

20

30

40

50

c g c c a a g c t c g a a - 3 ')、(配列番号 5 4)；(リバースプライマー：5 ' - t g t a a a a c g a c g g c c a g t g a a - 3 ')、(配列番号 5 5)。二本鎖 RNA (ds RNA) を 1 : 5 に希釈し、変性させ、次いで E 4 - 1 および E 4 - 9 細胞に加えた。

【 0 3 2 4 】

ds RNA の S 2 細胞へのトランスフェクションは、ds RNA を、無血清培地中の S 2 細胞に直接加えることにより行った (C l e m e n s , J . C . ら、2 0 0 0、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、9 7 : 6 4 9 9 - 6 5 0 3)。トランスフェクション前に、細胞をトランスフェクション前約 2 4 時間、完全 1 x S c h n e i d e r 培地中、 1×10^6 細胞 / m l で継代した。トランスフェクション直前に細胞を無血清 DES 発現培地 (C a t . N o . Q 5 0 0 - 0 1、I n v i t r o g e n) で 2 回洗浄し、無血清 DES 培地に 7×10^5 細胞 / m l で再浮遊させた。

10

【 0 3 2 5 】

1 0 0 μ L の細胞を 9 6 ウェル組織培養プレート (F a l c o n) の各ウェルに加えた。次に、5 μ l の ds RNA / ウェルを加え、次いで 4 5 分間 ~ 1 時間勢いよく振盪させた。最後に、1 5 0 μ l の完全 1 x S c h n e i d e r 培地 / ウェルを加えた。9 6 ウェルプレートをサララップで覆い、2 5 $^{\circ}$ でインキュベーションした。3 日間インキュベーションした後、各 ds RNA 処理細胞をルシフェラーゼアッセイ用にデュプリケート、増殖アッセイ用にトリプリケートで接種した。

【 0 3 2 6 】

総容量 1 0 0 μ l 中の細胞 5 - 1 5 μ l をルシフェラーゼアッセイに用い、総容量 1 0 0 μ l 中の細胞 3 0 - 3 5 μ l を増殖アッセイに用いた。ルシフェラーゼアッセイプレートに L P S 2 0 μ g / m l を加え、次いで 5 時間インキュベーションした。増殖アッセイプレートを 2 - 3 時間インキュベーション後、4 9 0 n m で光学濃度を測定した (C e l l T i t e r 9 6 A q u e o u s O n e S o l u t i o n C e l l P r o l i f e r a t i o n A s s a y f r o m P r o m e g a、C a t . N o . G 3 5 8 0)。

20

【 0 3 2 7 】

表 3 に示す結果は、コントロール試料に対する E 4 - 1 細胞を用いた 1 回の実験のデュプリケートでの平均成績を表す。変化は 1 . 0 0 に対するものであり、1 . 0 0 は、数回の実験を平均した、増殖アッセイで得られた細胞数で正規化した後のコントロール試料の相対ルシフェラーゼ活性を表す。同様の結果が、複数の反復実験で、E 4 - 9 安定細胞株を用いて得られた。表 3 において、NS は非刺激を表し、L P S は上記の L P S 処理を表す。

30

【 0 3 2 8 】

表 3

	NS	LPS
コントロール	1.2	0.8
EG:25E8.2 (Drosophila 相同分子種)	4.85	6.9
IKK-B	0.33	0.2
Relish	0.12	0.01
Cactus	6.9	9.65

40

【 0 3 2 9 】

50

表3に示すこれらの分析結果は、EG:25E8.2がcactus(カクタス)(IB)と同様のプロフィールでDrosophila細胞の不活性免疫モデルにおいて負の調節因子として働くことを示している。このシグナリング経路の正の調節因子のRNAi実験から、IKBおよびRelishで示されたように低いルシフェラーゼ活性を有することがわかった(Silverman, N.ら、2000、Genes Dev.、14:2461-2471)。これらの結果は、EG:25E8.2がLPS反応経路を調節しないことを示す。同様に、RATL1d6はEG:25E8.2との類似性により哺乳動物の免疫経路で同様の役割を有すると予想される。

【0330】

実施例15

部位指向性/部位特異的突然変異誘発

in vitro部位指向性突然変異誘発は、タンパク質の構造と機能の関係および例えば遺伝子発現の研究ならびにベクター修飾のためのきわめて重要な技術である。一本鎖DNA(ssDNA)を鋳型に用いるアプローチが報告されてきた(例えば、T. A. Kunkelら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、82:488-492; M. A. Vandeyarら、1988、Gene、65(1):129-133; M. Sugimotoら、1989、Anal. Biochem.、179(2):309-311; およびJ. W. Taylorら、1985、Nuc. Acids. Res.、13(24):8765-8785)。

【0331】

部位指向性突然変異誘発へのPCRの使用は、変性工程を用いて鎖を分離し、相補鎖を分離し、PCRプライマーの効率的重合を可能にすることにより達成される。すなわち、PCR部位指向性突然変異誘発法は、実質的にあらゆる二本鎖プラスミドに組みこむべき部位特異的突然変異を可能にし、M13ベースのバクテリオファージベクターへの再サブクロニングまたは一本鎖レスキュー(rescue)の必要性を排除する(M. P. Weinerら、1995、Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends、A. M. GriffinおよびH. G. Griffin編、Horizon Scientific Press、Norfolk、UK; およびC. Papworthら、1996、Strategies、9(3):3-4)。

【0332】

特にQuickChange(登録商標)部位指向性突然変異誘発キット(Stratagene、La Jolla、CA; 米国特許5,789,166および5,923,419)を用いる部位指向性突然変異誘発を実施するためのプロトコールは、点突然変異により本発明のRATL1d6アミノ酸配列中のアミノ酸を転換または置換し、1個または複数のアミノ酸を欠失または挿入するために提供される。

【0333】

プライマー設計

このプロトコールを用いるプライマー設計では、変異原性オリゴヌクレオチドプライマーを所望の突然変異に従って個々に設計する。変異原性プライマーの設計にあたって以下ことを考慮すべきである: 1) 両変異原性プライマーは所望の突然変異を含み、プラスミドの反対側の鎖の同じ配列とアニールしなければならない。2) プライマーは長さが25および45塩基であり、プライマーの融解温度(T_m)は、78と等しいかまたはそれ以上であるべきである。プライマーの T_m を推定するには通常以下の式を用いる: $T = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \%ミスマッチ$ 。 T_m の計算において、Nはプライマー長(塩基)であり、%GCおよび%ミスマッチの値は整数である。挿入または欠失を導入しようとするプライマーの T_m を計算するには、上記式を一部変更したものを用いる: $T = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N$ (ここで、Nは挿入または欠失される塩基を含まない)。3) 所望の突然変異(欠失または挿入)は両側に約10-15塩基の正しい配列を有するプライマーの中央にあるべきである。4) 最適には、プライマーは

10

20

30

40

50

40%の最小GC含量であり、1またはそれ以上のCまたはG塩基で終わるべきである。
 5) プライマーは5'-リン酸化されている必要はないが、高速ポリヌクレオチド液体クロマトグラフィー(FPLC)またはポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により精製しなければならない。プライマーの精製ができないと突然変異効率の著しい低下を招く。6) プライマー濃度が過剰であることが重要である。プライマー濃度を常に過剰に保ちながら鑄型の量が増えることが示唆される(QuickChange(登録商標)部位指向性突然変異誘発キット、Stratagene、La Jolla、CA)。

【0334】

反応のセットアッププロトコール

上記プライマー設計を用い、非修飾核酸配列と側面を接した所望の突然変異を含む2つの相補的オリゴヌクレオチドを合成する。得られるオリゴヌクレオチドプライマーを精製する。 10

【0335】

コントロール反応を5 μ l 10x反応緩衝液(100mM KCl; 100mM (NH₄)₂SO₄; 200mM Tris-HCl、pH 8.8; 20mM MgSO₄; 1% Triton(登録商標)X-100; 1mg/mlヌクレアーゼ不含ウシ血清アルブミン、BSA); 2 μ l(10ng)のpWhitescript(登録商標)、4.5kbコントロールプラスミド(5ng/ μ l); 1.25 μ l(125ng)のオリゴヌクレオチドコントロールプライマー#1(34量体、100ng/ μ l); 1.25 μ l(125ng)のオリゴヌクレオチドコントロールプライマー#2(34量体、100ng/ μ l); 1 μ lのdNTP混合物; 2回蒸留H₂O(終量50 μ l)を用いて調製する。次に、1 μ lのDNAポリメラーゼ(PfuTurbo DNAポリメラーゼ、Stratagene)、(2.5U/ μ l)を加える。PfuTurbo(登録商標)DNAポリメラーゼは、TaqポリメラーゼよりDNA合成において信頼度が6倍高いと記載されている。温度循環(cycling)性能を最大にするには、温度循環器(cycler)の加熱ブロックとの最適な接触を確実にするため壁の薄い試験管を用いることが示唆される。 20

【0336】

試料反応物を、5 μ lの10x反応緩衝液; x μ l(5-50ng)のdsDNA鑄型; x μ l(125ng)のオリゴヌクレオチドプライマー#1; x μ l(5-50ng)のdsDNA鑄型; x μ l(125ng)のオリゴヌクレオチドプライマー#2; 1 μ lのdNTP混合物; およびddH₂O(終量50 μ l)を混合することにより調製する。次に、1 μ lのDNAポリメラーゼ(PfuTurbo(登録商標)DNAポリメラーゼ、Stratagene)、(2.5U/ μ l)を加える。 30

【0337】

熱循環器がホットトップアセンブリを持たない場合、各反応物に約30 μ lの鉱油を重層すべきであることが示唆される。

【0338】

反応の循環

各反応を以下の循環パラメーターを用いて循環する: 40

セグメント	サイクル	温度	時間
1	1	95°C	30 秒間
2	12-18	95°C 55°C 68°C	30 秒間 1 分間 2 分間/kb プラスミ ド長

10

【0339】

コントロール反応では、12分間の延長時間を用い、反応を12サイクル行う。上記循環パラメーターのセグメント2を、所望の突然変異のタイプに従って調整する。例えば、点突然変異では12サイクルを用い、単アミノ酸変化では16サイクルを用い、多アミノ酸欠失または挿入には18サイクルを用いる。温度循環後、反応物を2分間氷上に置き、反応物を ≤ 37 に冷却する。

【0340】

生成物の消化およびコンピテントT細胞の形質転換

1 μ l の D p n I 制限酵素 (10 U / μ l) を、先のとがった小ピペットチップを用いて各増殖反応物に直接加える (鉱油重層物の下)。反応混合物を、溶液をピペットで数回上下させて静かに、完全に混合する。次に、反応混合物を微量遠心機を用いて1分間遠心する。直後に、各反応液を37 で1時間インキュベーションし、親 (すなわち、非突然変異) 超らせん ds DNA を消化する。

20

【0341】

コンピテントT細胞 (すなわち、X L 1 - B l u e スーパーコンピテント細胞、S t r a t a g e n e) を氷上で静かに解凍する。形質転換する各コントロールおよび試料反応物について、50 μ l のスーパーコンピテント細胞を予備冷却した試験管 (F a l c o n 2059 ポリプロピレン) に分注する。次に、1 μ l の D p n I 消化 DNA をコントロールおよび試料反応物から移し、スーパーコンピテント細胞の部分標本を分離する。形質転換反応物を静かに攪拌して混合し、氷上で30分間インキュベーションする。次に、形質転換反応物を2分間、42 で45秒間パルス加熱する。

30

【0342】

42 に予備加熱した N Z Y + プロス 0.5 ml を形質転換反応物に加え、次いでこれを 225 - 250 r p m で振盪させながら 37 で1時間インキュベーションする。各形質転換反応物の部分標本をベクター用の適切な抗生物質を含む寒天プレートに接種する。突然変異誘発および形質転換コントロールのために、細胞を 80 μ g / ml の X - g a l および 20 mM M I P T G を含む L B - アンピシリン寒天プレートに塗布する。形質転換プレートを 37 で > 16 時間インキュベーションする。

40

【0343】

表 4

配列表の説明

配列番号	説明
配列番号 1	RATL1d6 核酸配列 (FIG. 1)
配列番号 2	RATL1d6 ポリペプチド配列 (FIG. 3)
配列番号 3	<i>C. elegans</i> 相同分子種 F2H2.8 (FIG. 4)
配列番号 4	<i>Drosophila</i> 相同分子種 EG:25E8.2 (FIG. 4)
配列番号 5	E2 UBC P52483/マウス UB6B (FIG. 4)
配列番号 6	P27924/ヒト UBC1/Huntingtin 相互作用タンパク質(HIP)(FIG. 4)
配列番号 7	CAA72184/ <i>Drosophila</i> UBCD4 (FIG. 4)
配列番号 8	P14682/酵母 UBC3/CDC34 (FIG. 4)
配列番号 9	PCRプライマー PY508, 5'-tgcagtgtctggctcgggtgc-3'
配列番号 10	PCRプライマー PY509, 5'-ctgatctgcatgatcactgac-3'
配列番号 11	オリゴヌクレオチド PY495 5'- tccactgcaacatcacggagtcataccctg -3'
配列番号 12	オリゴヌクレオチド PY496 5'- atgcagtcgaactcgtgaatgacagctctgt- 3'
配列番号 13	5'プライマー, N-末端欠失 (実施例 12)
配列番号 14	3'プライマー, N-末端欠失 (実施例 12)
配列番号 15	5'プライマー, C-末端欠失 (実施例 12)
配列番号 16	3'プライマー, C-末端欠失 (実施例 12)
配列番号 17	RATL1d6 ポリペプチド 貫膜ドメイン
配列番号 18	PKC リン酸化部位 ポリペプチド, GSVQATDRLMKEL
配列番号 19	PKC リン酸化部位 ポリペプチド, IYRSQSFKGGNYA

10

20

30

40

配列番号 20	PKC リン酸化部位 ポリペプチド, ILLNFSFKDNFPF	
配列番号 21	PKC リン酸化部位 ポリペプチド, TRAQQSYKSLVQI	
配列番号 22	カゼインキナーゼIIリン酸化部位 ポリペプチド, PAEQCTQEDVSSSED	
配列番号 23	カゼインキナーゼIIリン酸化部位 ポリペプチド, TQEDVSSSEDEDEEM	10
配列番号 24	カゼインキナーゼIIリン酸化部位 ポリペプチド, QEDVSSSEDEDEEMP	
配列番号 25	カゼインキナーゼIIリン酸化部位 ポリペプチド, AEGKKSEDDGIGKE	
配列番号 26	カゼインキナーゼIIリン酸化部位 ポリペプチド, ELVNDSLYDWNVKL	
配列番号 27	カゼインキナーゼIIリン酸化部位 ポリペプチド, ILLNFSFKDNFPFD	20
配列番号 28	アスパラギングリコシル化部位 ポリペプチド, VRIHCNITESYP AV	
配列番号 29	アスパラギングリコシル化部位 ポリペプチド, AVELVNDSLYDWNV	
配列番号 30	アスパラギングリコシル化部位 ポリペプチド, DFILLNFSFKDNFP	
配列番号 31	アスパラギングリコシル化部位 ポリペプチド, VQFGANKSQYSLTR	30
配列番号 32	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, QQPGPGQQLGGQGAAP	
配列番号 33	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, PGQQLGGQGAAPGAGG	
配列番号 34	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, QLGGQGAAPGAGGGPG	
配列番号 35	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, AAPGAGGGPGGGPGPG	
配列番号 36	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, APGAGGGPGGGPGPGP	40
配列番号 37	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, EFLAGAGGAGAGAAP	
配列番号 38	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, LLAGAGGAGAGAAPGP	

配列番号 39	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, LAGAGGAGAGAAPGPH	
配列番号 40	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, HLPPRGSVPGDPVRIH	
配列番号 41	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, QDYLNQAVSGSVQATD	
配列番号 42	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, NGAVSGSVQATDRLMK	
配列番号 43	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, SQSFKGGNYAVELVND	
配列番号 44	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, GYVLGGGAICMELLTK	10
配列番号 45	N-ミリスチル化部位ポリペプチド, ARVQFGANKSQYSLTR	
配列番号 46	アミド化部位ポリペプチド EEEPAEGKKSEDDG	
配列番号 47	RATL1d6 の UBCドメイン	
配列番号 48	RATL1d6センスプライマー-- 発現プロファイリング, 5'- aggatcatctccgacctgtg -3' (実施例 13)	20
配列番号 49	RATL1d6アンチセンスプライマー-- 発現プロファイリング, 5'- caagggttgatccagcatct -3' (実施例 13)	20
配列番号 50	AttacinD AMP のプロモーター領域 フォワードプライマー(実施例 14), 5' - atgaggcttggatcagcttt - 3'	
配列番号 51	AttacinD AMP のプロモーター領域 リバースプライマー(実施例 14), 5' -- cctgaagcctgacattccat - 3'	
配列番号 52	フォワードプライマー-- dsDNA, 5' - actgcagccgattcattaatg -3' (実施例 14)	30
配列番号 53	リバースプライマー - dsDNA, 5' - gaattaatacgcactcactatagggagatat catacacatacgatttag - 3' (実施例 14)	
配列番号 54	フォワードプライマー-- dsDNA, 5' - gaattaatacgcactcactatagggagacat gattacgccaagctcgaa - 3' (実施例 14)	
配列番号 55	リバースプライマー - dsDNA, 5' - tgtaaaacgcagccagtgaa - 3' (実施例 14)	40

【 0 3 4 6 】

本明細書に記載のすべての特許、特許出願、PCT出願公開公報、ならびに論文、書籍、参考文献、参考マニュアルおよび抄録の内容は、本発明の関連分野の状況をより完全に説明するために本明細書の一部を構成する。

【 0 3 4 7 】

本発明の範囲と精神を離れることなく上記内容を種々に変更することができるので、上記明細書に含まれ、添付の請求の範囲に記載されたすべての内容は本発明の説明および例示

であると解釈されることを意図するものである。上記開示に照らして本発明の種々の修飾および変更が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1A】RATL1d6ユビキチン結合酵素相同体のポリヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。

【図1B】RATL1d6ユビキチン結合酵素相同体のポリヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。

【図2A】RATL1d6ユビキチン結合酵素相同体のヌクレオチド配列(配列番号1)および推定コードアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図2B】RATL1d6ユビキチン結合酵素相同体のヌクレオチド配列(配列番号1)および推定コードアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図3】RATL1d6ユビキチン結合酵素ポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図4】RATL1d6ユビキチン結合酵素(UBC)とそれぞれ仮定*C. elegans*および*Drosophila*相同分子種F2H2.8およびEG:25E8.2、およびE2UBCP52483/マウスUB6B、P27924/ヒトUBC1/Huntingtin相互作用タンパク質、CAA72184/*Drosophila*UBCD4、およびP14682/酵母UBC3/CDC34のアラインメントを示す。

【図5A】RATL1d6アミノ酸配列とその推定*Drosophila*相同分子種との間のBLASTアラインメントを示す。

【図5B】RATL1d6アミノ酸配列とその推定*C. elegans*相同分子種との間のBLASTアラインメントを示す。

【図6】実施例13に記載のRATL1d6のRT-PCR発現プロフィールを示す。

【図1B】

FIG. 1B

```

aaagaaggagccgacttcattctacttaacttttcccttaagataaactttccctttgac 1500
ccaccatttgcaggggtgtgtctccagtcctctctggagggtatgtctcggggcggagg 1560
gccatctgcattggaactctctaccaaaccgggctggagcagtcgctactccatagagtca 1620
gtgatcagcagatcagtgccacactggtgaaggggaaagcagcagtgagttggagcc 1680
aaccaatctcaatcacagctctgacaagcagcagcagtcctacaagtccttggtcagatc 1740
cagcaaaaaaacggctggttacacaccccccaaaagacggcctaaccctggagatcacc 1800
cttccctccctccccagccaccctggaccaattaccccttgaatgctgtatttggactca 1860
cgtgctctctggttccctccctccatttttctggagcgtgatgctctgctatttcag 1920
gcaatgatggctatttataaacctgaaggaaaaaaacacacagaactgttcaagta 1980
ctcaagactgacttacagaccacaccacctgctggaaacctgcttagcagccattc 2040
ttataaaagaaacttcgagcctccttatattgctggaaacctgctgctccagacta 2100
gagcctccttacctatgctatggatttttaatttatttctcttatttcatgtacactgc 2160
tttttttggttacagtgatgatggatgctatgaaaaaaatgtatctttgggaaacaa 2220
ttacagtttgttaatttgaaaaaaataaaaaaa 2280

```

(配列番号1)

【図3】

FIG. 3

```

MQQPQPQQO QPQPQQLOG QGAAPGAGGG PGGPQPGGPC 40
LRRELKLES IPHRGHERFR IASACLDLDS CEFLLAGAGG 80
AGAGAAPGPH LPPRGSVPGD FVRIHCNITE SYPVPPPIWS 120
VESDDPNLAA VLRLVDIKK GNTLLQLHLK RIISDLCKLY 160
NLPQHDPVEM LDQPLFAEQC TQEDVSSDE DSEMPEDTED 200
LDHYEMKREE PARGKKSDD GIGKENLAIL EKIKKNQRQD 240
YLNNAVSGSV QATDRMKEL RDIYRSQSPK GGNVAVELVN 280
DSLYDWNVKL LKVDQDSALH NDLQILKEKE GADFELNFS 320
FKDNFPDPPP FVRVVSFVLS GGYVLGGAI CMELLTKQGW 360
SSAYSIESVI MQISATLVKG KARVQFGANK SQYSLTRAQQ 400
SYKSLVQIHE KNGMYTPPKE DG 422

```

(配列番号2)

WO 02/36741 A2

patent (AI, BE, CH, CY, DE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). *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.*

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

WO 02/36741

PCT/US01/46559

Polynucleotide Encoding an Activated Human T-Lymphocyte-Derived Protein Related to Ubiquitin Conjugating Enzyme

FIELD OF THE INVENTION

5 The invention relates to the identification and isolation of a novel polynucleotide sequence and its encoded amino acid sequence defining a polypeptide expressed in activated human T-lymphocytes (T-cells) and having similarity to ubiquitin conjugating enzyme (UBC). The invention further relates to the use of the polynucleotides and the
10 polypeptide in regulating cell growth and cell cycle progression, as well as in targeting the degradation of cellular proteins, and in the diagnosis, treatment and prevention of neoplastic diseases, immune disorders, and developmental and neuronal disorders and diseases.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 The ubiquitin conjugation system (UCS) serves as a major pathway for the degradation of cellular proteins in eukaryotic cells and in some bacteria. The UCS mediates the elimination of abnormal or aberrant proteins and regulates the half-lives of important regulatory proteins that control cellular processes, such as gene transcription and cell cycle
20 progression. The UCS is believed to be involved in the degradation of mitotic cyclic kinases, oncoproteins, tumor suppressor gene products (e.g., p53), viral proteins, cell surface receptors associated with signal transduction, transcriptional regulators and mutated or damaged proteins (A. Ciechanover, 1994, *Cell*, 79:13-21).

25 Ubiquitin conjugating enzymes (UBCs) selectively target proteins for proteasomal degradation by the covalent attachment of ubiquitin moieties. The ubiquitination of cellular proteins appears to be mediated by the specific interplay between ubiquitin conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin protein ligases (E3s) (T.P. Moynihan et al., 1999, *J. Biol. Chem.*,
30 274(43):30963-8). Ubiquitin-mediated proteolysis controls diverse physiological processes in eukaryotic and mammalian cells, including, but

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 2 -

not limited to, DNA repair, cell cycle regulation and p53-dependent processes.

The ubiquitination pathway targets not only normal, i.e., short-lived, intracellular eukaryotic proteins for degradation when appropriate, but it also serves to eliminate abnormal, mutant, or misfolded proteins from the cell. (T.P. Moynihan et al., 1999, *Mammalian Genome*, 10:977-982). In the ubiquitin pathway proteins that are covalently ligated to ubiquitin are targeted for degradation by the cell. The selectivity of the destruction is ensured by the substrate specificity in the ubiquitination steps which are comprised of a series of enzymatic reactions. (F. Yamao, 1999, *J. Biochem. (Tokyo)*, 125(2):223-9). Ubiquitin ligase (E3), in conjunction with ubiquitin conjugating enzyme (E2), have been implicated in playing an essential role in the recognition of substrate.

The process of ubiquitin conjugation and protein degradation involves four main steps (S. Jentsch, 1992, *Ann. Rev. Genet.*, 26:179-207). In the first step, a ubiquitin activating enzyme (E1) activates ubiquitin (Ub), a small, heat stable protein (76 amino acids) in an ATP dependent reaction which binds the C-terminus of Ub to the thiol group of an internal cysteine residue in E1. Next, activated Ub is transferred to one of several Ub-conjugating enzymes (E2). Different ubiquitin-dependent proteolytic pathways employ structurally similar, but distinct, ubiquitin-conjugating enzymes that are associated with recognition subunits which direct them to proteins which carry a particular degradation signal. E2 then links the Ub molecule through its C-terminal glycine to an internal lysine (acceptor lysine) of a target protein. In some instances, accessory factors, known as ubiquitin ligases (E3s) are required to work in concert with E2s for the recognition of certain substrates. Additional Ub molecules may be added, ultimately forming a multi-Ub chain structure. The ubiquitinated protein is then recognized and degraded by the proteasome, a large multisubunit proteolytic enzyme complex, and Ub is released for reutilization.

UBCs and families of genes encoding UBCs have been identified in a variety of eukaryotic genera, e.g., *Saccharomyces*, *Dictyostellum*, *Drosophila*, *Caenorabditis elegans* (*C. elegans*), *Paramecia*, as well as in mice and humans. UBCs or E2s are encoded by a large family of genes that are related to each other.

The E2 ubiquitin-conjugating enzymes are important for substrate specificity in different UCS pathways. All E2 molecules have a conserved domain of approximately 16 kDa, called the UBC domain, that is at least 35% identical to all other E2s and contains a centrally located cysteine residue that is required for ubiquitin-enzyme thioester formation (S. Jentsch, *supra*). A highly conserved proline-rich element is located N-terminal to the active cysteine residue. Structural variations beyond this conserved domain are used to classify the E2 enzymes. The E2s of class I (E2-1) consist almost exclusively of the conserved UBC domain and include yeast E2-1 and UBCs 4, 5 and 7. These E2s are thought to require E3 to carry out their activities. (See, S. Jentsch, *supra*). UBC7 has been shown to recognize ubiquitin as a substrate and to form polyubiquitin chains *in vitro* (S. Van Nocker et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, 271:12150-12158). The E2s of class II (E2-2) have various unrelated C-terminal extensions that contribute to substrate specificity and cellular localization. The yeast E2-2 enzymes, UBC2 and UBC3, have highly acidic C-terminal extensions that promote interactions with basic substrates such as histones. Yeast UBC6 has a hydrophobic signal-anchor sequence that localizes the protein to the endoplasmic reticulum.

Defects or alterations in the normal activity of the UCS are associated with a number of diseases and disorders. These include increased ubiquitin-dependent proteolysis that is associated with cachexia (M. Llovera et al., 1995, *Int. J. Cancer*, 61:138-141), degradation of the tumor suppressor protein p53 (A. Ciechanover, *supra*), neurodegeneration, such as is observed in Alzheimer's disease (L. Gregori et al., 1994, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 203-1731-1738), and in muscle-wasting

- 4 -

disorders, such as is observed after serious injury and in diseases such as cancer and AIDS (*Scienceexpress*, 2001, 10:1126). Since ubiquitin conjugation is a rate-limiting step in antigen presentation, the ubiquitin degradation pathway is likely to play a role in the immune response to antigen (E.P. Grant et al., 1995, *J. Immunol.*, 155:3750-3758). Indeed, because the ubiquitin conjugating enzyme homologue of the present invention was identified and isolated from activated T lymphocytes, a link to a role in the immune system is supported by this invention.

The discovery of new ubiquitin conjugating enzymes and the polynucleotides encoding these proteins provides the art with new compositions and methods of use and treatment for the diagnosis, screening, monitoring, therapy, and prevention of neoplastic diseases, including cancers and tumors, immune disorders, and developmental and neuronal disorders, conditions, or diseases.

15 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a novel polynucleotide encoding a ubiquitin conjugating enzyme homologue, which was isolated from activated human T-cells, and hereinafter designated RATL1d6 ("Regulated in Activated T Lymphocytes 1d6"). RATL1d6 was discovered to be upregulated upon stimulation of Jurkat-line T cells and human peripheral blood T lymphocytes with antibodies directed against the CD3 and CD28 cell surface antigens. The RATL1d6 nucleic acid was identified in a subtraction library from activated human T lymphocytes as described herein. The RATL1d6 polypeptide encoded by the RATL1d6 nucleic acid sequence provided by this invention has similarity to ubiquitin conjugating enzyme.

It is an object of the present invention to provide an isolated RATL1d6 polynucleotide as depicted in SEQ ID NO:1. In accordance with this invention, the isolated RATL1d6 polynucleotide encodes a ubiquitin conjugating enzyme comprising the amino acid sequence as set forth in 30 SEQ ID NO:2. Fragments or portions of the RATL1d6 polynucleotide and

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 5 -

polypeptide are also embraced by the invention. Preferably, the isolated RATL1d6 polynucleotide or polypeptide, or fragment or portion thereof, is substantially purified.

5 It is another object of the present invention to provide an isolated RATL1d6 polynucleotide having the nucleic acid sequence of ATCC Deposit No. PTA-3745.

10 It is another object of the present invention to provide a ubiquitin conjugating enzyme homologue, the RATL1d6 polypeptide, encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:1 and having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a functional or biologically active portion thereof. Also provided are transmembrane domain regions of the RATL1d6 polypeptide and the encoding polynucleotides as elucidated herein.

15 Yet another object of the present invention is to provide a ubiquitin conjugating enzyme polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 80% to 90% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:2.

It is another object of the present invention to provide an isolated and substantially purified ubiquitin conjugating enzyme polypeptide encoded by the nucleic acid sequence of ATCC Deposit No. PTA-3745.

20 It is another object of the present invention to provide a ubiquitin conjugating enzyme polypeptide whose amino acid sequence differs from SEQ ID NO:2 only by conservative substitutions.

25 It is another object of the present invention to provide RATL1d6 polypeptides having N-terminal, C-terminal and internal deletions as described herein. Polynucleotides encoding these deletion polypeptides are also provided. According to the invention, such RATL1d6 polypeptides can comprise immunogenic and/or antigenic epitopes as described herein.

30 It is a further object of the present invention to provide the polynucleotide sequence of RATL1d6 (SEQ ID NO:1) lacking the initiating codon, as well as the resulting encoded polypeptide. In accordance with this invention, the polynucleotide corresponding to nucleotides 520 through

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 6 -

1782 of SEQ ID NO:1, and the polypeptide corresponding to amino acids 2 through 422 of SEQ ID NO:2 are provided.

It is yet another object of the present invention to provide a ubiquitin conjugating enzyme polypeptide having at least 80% to 95% sequence identity to the sequence as set forth in SEQ ID NO:2.

It is a further object of the present invention to provide a substantially purified ubiquitin conjugating enzyme fusion protein, wherein all or a portion of the RATL1d6 polypeptide is conjugated, coupled or linked to a heterologous polypeptide or peptide. More particularly, the invention provides an amino acid sequence having at least 80% to 95% sequence identity to the sequence as set forth in SEQ ID NO:2 and an amino acid sequence of an Fc portion of a human immunoglobulin protein. According to the present invention ubiquitin conjugating enzyme fusion protein is provided in which the amino acid sequence differs from SEQ ID NO:2 only by conservative substitutions.

It is a further object of the present invention to provide compositions comprising the RATL1d6 polynucleotide sequence, or a fragment thereof, or the encoded RATL1d6 polypeptide, or a fragment or portion thereof. Also provided by the present invention are pharmaceutical compositions comprising at least one RATL1d6 polypeptide, or a functional portion thereof, wherein the compositions further comprise a pharmaceutically or physiologically acceptable carrier, excipient, or diluent.

It is yet another object of the present invention to provide a novel isolated and purified, preferably substantially purified, polynucleotide that encodes the RATL1d6 ubiquitin conjugating enzyme homolog. In a particular aspect, the polynucleotide comprises the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1. The present invention also provides a polynucleotide sequence comprising the complement of SEQ ID NO:1, or variants thereof. In addition, the present invention features polynucleotide sequences which hybridize under moderately stringent or high stringency conditions to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1. The present invention further

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 7 -

provides an isolated polynucleotide comprising a nucleic acid sequence having (i) SEQ ID NO:1; (ii) a nucleic acid sequence degenerate from SEQ ID NO:1 as a result of genetic code redundancy, or (iii) a complementary nucleic acid sequence thereto. More particularly, the complementary nucleic acid sequence of (iii) can hybridize to either strand of a denatured, double-stranded polynucleotide comprising the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 under conditions of moderate or high stringency, where a nonlimiting example of moderately stringent conditions comprises 50% formamide, 5x Denhart's solution, 5xSSPE or SSC, 0.2% SDS at about 42°C, followed by washing in 0.2x SSPE or SSC and 0.2% SDS at a temperature of about 42°C to about 50°C. High stringency conditions typically permit hybridization of those nucleic acid sequences that form stable hybrids in 0.018 M NaCl at about 65°C.

It is yet another object of the present invention to provide a nucleic acid sequence encoding the RATL1d6 polypeptide and an antisense of the nucleic acid sequence, as well as oligonucleotides, fragments, or portions of the nucleic acid molecule or antisense molecule. The RATL1d6 nucleic acid sequence, particularly, oligonucleotides, fragments, or portions of the RATL1d6 nucleic acid molecule are useful as hybridization probes to detect, diagnose or monitor RATL1d6 in body fluid samples. Also provided are expression vectors and host cells comprising polynucleotides, or fragments or portions thereof, that encode the RATL1d6 polypeptide or peptides thereof.

It is also an object of the present invention to provide methods for producing a polypeptide comprising the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2, or a fragment thereof, comprising: (a) cultivating a host cell containing an expression vector containing at least a functional fragment of the polynucleotide sequence encoding the RATL1d6 ubiquitin conjugating enzyme homologue according to this invention under conditions suitable for the expression of the polynucleotide; and (b) recovering the polypeptide from the host cell.

It is yet another object of the present invention to provide antibodies, and binding fragments thereof, which bind specifically to the RATL1d6 polypeptide, or an epitope thereof, for use as therapeutics and diagnostic agents.

5 It is also an object of the present invention to provide methods for screening for agents which bind to and/or modulate RATL1d6 polypeptide, e.g., agonists and antagonists, as well as modulators, e.g., agonists and antagonists, particularly those that are obtained from the screening methods described.

10 It is another object of the present invention to provide a purified, preferably, substantially purified, antagonist of the polypeptide of SEQ ID NO:2. In this regard, and by way of example, a purified antibody that binds to a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is provided. In accordance with the present invention, substantially
15 purified agonists of the polypeptide of SEQ ID NO:2 are further provided.

It is yet another object of the present invention to provide RATL1d6 nucleic acid sequences, polypeptide, peptides and antibodies for use in the diagnosis and/or screening of disorders or diseases associated with expression of the polynucleotide and its encoded polypeptide as
20 described herein.

It is a further object of the present invention to provide kits for screening and diagnosis of disorders associated with aberrant or uncontrolled cellular development and with the expression of the polynucleotide and its encoded polypeptide as described herein.

25 It is another object of the present invention to provide methods for the treatment or prevention of cancers or tumors, immune disorders, lymphoproliferative disorders, or neurodegenerative disorders involving administering to an individual in need of treatment or prevention an amount of a purified antagonist or inhibitor of the RATL1d6 ubiquitin conjugating
30 enzyme effective to treat or prevent the disease or disorder. For example, in cancer or tumor therapy methods, the ubiquitin conjugating enzyme

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 9 -

antagonist is preferably utilized in an amount effective to block ubiquitination of a tumor suppressor gene in cancer or tumor cells.

Another object of the present invention is to provide a method of suppressing the immune response in a subject requiring immune
5 response suppression, comprising administration of an antagonist or inhibitor of RATL1d6 ubiquitin conjugating enzyme, or an agonist or activator of RATL1d6 ubiquitin conjugating enzyme in an amount effective to cause immunosuppression. In such methods, immunosuppression can be the
10 result of ubiquitination of a cell receptor and subsequent down regulation of receptor activity.

Another object of the present invention is to provide a method of treating aberrant or abnormal cell growth causing uncontrolled proliferation of a cell in a mammal comprising administration of the RATL1d6 polypeptide or its homologue as described in accordance with the invention,
15 or an agonist or antagonist thereof, in an amount effective to treat the abnormal or aberrant cell growth and uncontrolled cell proliferation.

It is yet another object of the present invention to provide a method of diagnosing a disease or susceptibility to a disease in a mammal related to expression or activity of ubiquitin conjugating enzyme. The
20 method comprises contacting a sample from a mammal with an antibody specific for the RATL1d6 polypeptide, its homologue, or antigenic fragment thereof, under conditions in which an antigen-antibody complex can form between the antibody and the polypeptide, or homologue, or antigenic
25 fragment thereof in the sample, and detecting an antigen-antibody complex, if formed. Detection of the complex indicates the presence of the RATL1d6 polypeptide, or homologue, or antigenic fragment thereof, in the sample, wherein an increased amount of complex formed with the polypeptide, homologue, or fragment thereof, in a test sample compared with the amount
30 in a normal control sample is indicative of disease or condition, or susceptibility to a disease or condition in the mammal. According to the

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 10 -

invention, the disease can be an immune disorder, a neuronal disorder, a developmental disorder, or neoplastic growth.

It is a further object of the present invention to provide a nucleic acid-based method of diagnosing a disease, disorder or condition, in
5 which the method comprises hybridizing a RATL1d6 polynucleotide or fragment or oligo thereof according to the invention to the nucleic acid material of a sample, thereby forming a hybridization complex; and detecting the hybridization complex. In the method, the presence of the complex
10 diagnoses a disease, disorder, or condition correlating with the presence of a polynucleotide encoding ubiquitin conjugating enzyme, or a fragment thereof, in the sample. Such a method can comprise *in situ* hybridization.

It is yet another object of the present invention to provide a method for detecting a polynucleotide that encodes the RATL1d6 polypeptide in a biological sample comprising (a) hybridizing the
15 complement of the polynucleotide sequence encoding SEQ ID NO:2 to a nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and (b) detecting the hybridization complex, wherein the presence of the complex correlates with the presence of a polynucleotide encoding the RATL1d6 polypeptide in the biological sample. The nucleic acid material
20 may be further amplified by the polymerase chain reaction prior to hybridization.

Another object of the present invention provides a method of detecting ubiquitin conjugating enzyme or homologue, or an antibody-reactive fragment thereof, in a sample, comprising contacting the sample
25 with an antibody specific for the RATL1d6 polypeptide, or an antigenic fragment thereof, under conditions in which an antigen-antibody complex can form between the antibody and the polypeptide or antigenic fragment thereof in the sample; and detecting an antigen-antibody complex formed. In such a method detection of the complex indicates the presence of
30 ubiquitin conjugating enzyme, or an antigenic fragment thereof, in the sample.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 11 -

It is a further object of the present invention to provide a method of screening a library of molecules or compounds with a polynucleotide to identify at least one molecule or compound therein which specifically binds to the polynucleotide sequence, comprising combining the RATL1d6 polynucleotide or peptide, or a bindable portion thereof peptide with a library of molecules or compounds under conditions to allow specific binding; and detecting specific binding, thereby identifying a molecule or compound which specifically binds to the polynucleotide sequence. In such a method, the library can comprise DNA molecules, RNA molecules, artificial chromosome constructions, PNAs, peptides and proteins.

It is yet another object of the present invention to provide a method of using the RATL1d6 polynucleotide sequence to purify a molecule or compound in a sample, in which the molecule or compound specifically binds to the RATL1d6 polynucleotide. The method comprises combining the RATL1d6 polynucleotide, a bindable portion thereof, or a RATL1d6 variant, under conditions to allow specific binding; detecting specific binding between the polynucleotide and the molecule or compound; recovering the bound polynucleotide; and separating the polynucleotide from the molecule or compound, thereby obtaining a purified molecule or compound.

Another object of the present invention is to provide a method of screening for candidate compounds or agents that are capable of modulating activity of a ubiquitin conjugating enzyme, such as RATL1d6. The method comprises contacting a test compound with a substantially or partially purified RATL1d6 polypeptide, peptide, or fragment; and selecting as candidate modulating compounds those test compounds that modulate activity of the polypeptide. The assay methods may be cell-based assays in which the RATL1d6 is expressed in a cell or tissue, or cell-free assays. According to the invention and as described herein, the candidate compounds are either agonists or antagonists, or agonists or activators, of ubiquitin conjugating enzyme activity. The activity of the RATL1d6 ubiquitin activating enzyme can be protein degradation associated with

lymphoproliferative disorders, cancers and tumors, neuronal disorders, or developmental disorders, or ubiquitination of a cell receptor.

A further object of this invention is to provide a method of screening for or detecting candidate compounds capable of binding to the
5 RATL1d6 ubiquitin conjugating enzyme. The method comprises contacting a test compound with a purified RATL1d6 polypeptide or a peptide thereof according to the invention and selecting as candidate compounds those test
10 compounds that bind to the polypeptide. In such a method, the RATL1d6 polypeptide or peptide, or the candidate compounds, can be immobilized onto a solid support. Also, in the method, selection of a candidate
15 compound can be based on affinity of binding determinations by analyzing thermal unfolding curves of complexes formed between candidate compound and the polypeptide.

In the screening methods provided by the present invention,
15 the candidate compounds can be small molecules, therapeutics, biological agents, and/or drugs. Such methods as provided by the present invention and described herein are quite suitable for being carried out via high
throughput screening technology.

Further objects, features and advantages of the present
20 invention will be better understood upon a reading of the detailed description of the invention when considered in connection with the accompanying figures/drawings.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIGS. 1A and 1B show separately the polynucleotide
25 sequence of the RATL1d6 ubiquitin conjugating enzyme homologue (SEQ ID NO:1), (FIG.1A), and the deduced amino acid sequence of the encoded RATL1d6 protein (FIG. 1B). The coding sequence (CDS) of RATL1d6 is
30 517 to 1782 of SEQ ID NO:1.

FIGS. 2A and 2B show the polynucleotide sequence (SEQ ID
NO:1) and the deduced, encoded amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 13 -

the RATL1d6 ubiquitin conjugating enzyme homologue, a portion of which was isolated from an activated T-cell subtraction library.

FIG. 3 shows the deduced amino acid sequence of the RATL1d6 ubiquitin conjugating enzyme polypeptide (SEQ ID NO:2). The predicted molecular weight of the RATL1d6 polypeptide encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:1 is MW = 46.1 Kd.

FIG. 4 shows an alignment of the RATL1d6 ubiquitin conjugating enzyme (UBC) with hypothetical *C. elegans* and *Drosophila* orthologs F2H2.8 (Genbank Accession No: gj|3876332; SEQ ID NO:3) and EG:25E8.2 (Genbank Accession No: gj|7290306; SEQ ID NO:4), respectively, and the E2 UBCs P52483/mouse UB6B (Genbank Accession No: gj|1717850; SEQ ID NO:5); P27924/human UBC1/Huntingtin interacting protein (HIP), (Genbank Accession No: gj|14727922; SEQ ID NO:6); CAA72184/*Drosophila* UBCE4 (Genbank Accession No: gj|7294882; SEQ ID NO:7); and P14682/yeast UBC3/CDC34 (Genbank Accession No: gj|6320259; SEQ ID NO:8). The ubiquitin conjugating domain identified through a search of the PFAM database is boxed in RATL1d6. Residues that are identical in three or more of the aligned sequences are highlighted, and the conserved Cys residue which has been shown in UBCs to be involved in ubiquitin transfer through a thiol ester intermediate to target proteins is marked with a "U". The % identity of RATL1d6 with *C. elegans* F2H2.8 is 42% over the entire peptide sequence; 47% with *Drosophila* EG:25E8.2 over the entire peptide sequence; and approximately 25% over the UBC domains only for the remaining proteins.

FIGS. 5A and 5B show a BLAST alignment between the RATL1d6 amino acid sequence and its putative *Drosophila* ortholog (FIG. 5A, 65% identity) and *C. elegans* ortholog (FIG. 5B, 61% identity). The query sequence is that of RATL1d6, while the subject sequence is the amino acid sequence, i.e., *Drosophila* (EG:25E8.2) or *C. elegans* (F25H2.8), showing a percent identity to the RATL1d6 sequence.

FIG. 6 presents an RT-PCR expression profile of RATL1d6 as described in Example 13.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides a novel isolated polynucleotide and encoded polypeptide, the expression of which is upregulated in human T lymphocytes that have been stimulated with anti-CD28 and anti-CD3 antibodies versus unstimulated T lymphocytes. This novel polypeptide is termed herein RATL1d6, an acronym for "Regulated in Activated T Lymphocytes 1d6", and is further characterized as a ubiquitin conjugating enzyme homologue.

The following definitions are provided to more fully describe the present invention in its various aspects. The definitions are intended to be useful for guidance and elucidation, and are not intended to limit the disclosed invention or its embodiments.

15 Definitions

The RATL1d6 polypeptide (or protein) refers to the amino acid sequence of substantially purified RATL1d6, which may be obtained from any species, preferably mammalian, and more preferably, human, and from a variety of sources, including natural, synthetic, semi-synthetic, or recombinant. Functional fragments of the RATL1d6 polypeptide are also embraced by the present invention.

An agonist refers to a molecule which, when bound to the RATL1d6 polypeptide, or a functional fragment thereof, increases or prolongs the duration of the effect of the RATL1d6 polypeptide. Agonists may include proteins, nucleic acids, carbohydrates, or any other molecules that bind to and modulate the effect of RATL1d6 polypeptide. An antagonist refers to a molecule which, when bound to the RATL1d6 polypeptide, or a functional fragment thereof, decreases the amount or duration of the biological or immunological activity of RATL1d6 polypeptide. Antagonists

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 15 -

may include proteins, nucleic acids, carbohydrates, antibodies, or any other molecules that decrease or reduce the effect of RATL1d6 polypeptide.

"Nucleic acid sequence", as used herein, refers to an oligonucleotide, nucleotide, or polynucleotide, and fragments or portions thereof, and to DNA or RNA of genomic or synthetic origin which may be single- or double-stranded, and represent the sense or antisense strand. By way of nonlimiting example, fragments include nucleic acid sequences that are greater than 20-60 nucleotides in length, and preferably include fragments that are at least 70-100 nucleotides, or which are at least 1000 nucleotides or greater in length.

Similarly, "amino acid sequence" as used herein refers to an oligopeptide, peptide, polypeptide, or protein sequence, and fragments or portions thereof, and to naturally occurring or synthetic molecules. Amino acid sequence fragments are typically from about 5 to about 30, preferably from about 5 to about 15 amino acids in length and retain the biological activity or function of the RATL1d6 polypeptide.

Where "amino acid sequence" is recited herein to refer to an amino acid sequence of a naturally occurring protein molecule, "amino acid sequence" and like terms, such as "polypeptide" or "protein" are not meant to limit the amino acid sequence to the complete, native amino acid sequence associated with the recited protein molecule. In addition, the terms RATL1d6 polypeptide and RATL1d6 protein are used interchangeably herein to refer to the encoded product of the RATL1d6 nucleic acid sequence of the present invention.

A variant of the RATL1d6 polypeptide refers to an amino acid sequence that is altered by one or more amino acids. The variant may have "conservative" changes, wherein a substituted amino acid has similar structural or chemical properties, e.g., replacement of leucine with isoleucine. More rarely, a variant may have "nonconservative" changes, e.g., replacement of a glycine with a tryptophan. Minor variations may also include amino acid deletions or insertions, or both. Guidance in determining

which amino acid residues may be substituted, inserted, or deleted without abolishing functional biological or immunological activity may be found using computer programs well known in the art, for example, DNASTAR software.

An allele or allelic sequence is an alternative form of the
5 RATL1d6 nucleic acid sequence. Alleles may result from at least one mutation in the nucleic acid sequence and may yield altered mRNAs or polypeptides whose structure or function may or may not be altered. Any given gene, whether natural or recombinant, may have none, one, or many allelic forms. Common mutational changes which give rise to alleles are
10 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 RATL1d6
15 polypeptide include nucleic acid sequences containing deletions, insertions and/or substitutions of different nucleotides resulting in a polynucleotide that encodes the same or a functionally equivalent RATL1d6 polypeptide. Altered nucleic acid sequences may further include polymorphisms of the polynucleotide encoding the RATL1d6 polypeptide; such polymorphisms may or may not be readily detectable using a particular oligonucleotide
20 probe. The encoded protein may also contain deletions, insertions, or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent RATL1d6 protein. 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
25 residues, as long as the biological activity of RATL1d6 protein is retained. For example, negatively charged amino acids may include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids may include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values may include leucine, isoleucine, and valine; glycine and
30 alanine; asparagine and glutamine; serine and threonine; and phenylalanine and tyrosine.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 17 -

"Peptide nucleic acid" (PNA) represents an oligomer of modified nucleic acid base pairs covalently linked through an amide bond. PNAs have utility in a number of antisense and anti-gene applications. These small molecules typically act by inhibiting transcription. (e.g., P.E.

5 Nielsen et al., 1993, *Anticancer Drug Des.*, 8:53-63). PNA may be pegylated to extend their lifespan in the cell where they preferentially bind to complementary single stranded DNA and RNA.

Oligonucleotides or oligomers refer to a nucleic acid sequence, preferably comprising contiguous nucleotides, of at least about 6 nucleotides
10 to about 60 nucleotides, preferably at least about 8 to 10 nucleotides in length, more preferably at least about 12 nucleotides in length e.g., about 15 to 35 nucleotides, or about 15 to 25 nucleotides, or about 20 to 35 nucleotides, which can be typically used in PCR amplification assays, hybridization assays, or in microarrays. It will be understood that the term
15 oligonucleotide is substantially equivalent to the terms primer, probe, or amplicon, as commonly defined in the art. It will also be appreciated by those skilled in the pertinent art that a longer oligonucleotide probe, or mixtures of probes, e.g., degenerate probes, can be used to detect longer, or more complex, nucleic acid sequences, for example, genomic DNA. In
20 such cases, the probe may comprise at least 20-200 nucleotides, preferably, at least 30-100 nucleotides, more preferably, 50-100 nucleotides.

Amplification refers to the production of additional copies of a nucleic acid sequence and is generally carried out using polymerase chain reaction (PCR) technologies, which are well known and practiced in the art
25 (See, D.W. Dieffenbach and G.S. Dveksler, 1995, *PCR Primer, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY).

Microarray is an array of distinct polynucleotides or oligonucleotides synthesized on a substrate, such as paper, nylon, or other type of membrane; filter; chip; glass slide; or any other type of suitable solid
30 support.

The term antisense refers to nucleotide sequences, and compositions containing nucleic acid sequences, which are complementary to a specific DNA or RNA sequence. The term "antisense strand" is used in reference to a nucleic acid strand that is complementary to the "sense" strand. Antisense (i.e., complementary) nucleic acid molecules include PNA and may be produced by any method, including synthesis or transcription. Once introduced into a cell, the complementary nucleotides combine with natural sequences produced by the cell to form duplexes which block either transcription or translation. The designation "negative" is sometimes used in reference to the antisense strand, and "positive" is sometimes used in reference to the sense strand.

The term consensus refers to the sequence that reflects the most common choice of base or amino acid at each position among a series of related DNA, RNA, or protein sequences. Areas of particularly good agreement often represent conserved functional domains.

A deletion refers to a change in either nucleotide or amino acid sequence and results in the absence of one or more nucleotides or amino acid residues. By contrast, an insertion (also termed "addition") refers to a change in a nucleotide or amino acid sequence that results in the addition of one or more nucleotides or amino acid residues, as compared with the naturally occurring molecule. A substitution refers to the replacement of one or more nucleotides or amino acids by different nucleotides or amino acids.

A derivative nucleic acid molecule refers to the chemical modification of a nucleic acid encoding, or complementary to, the encoded RATL1d8 polypeptide. Such modifications include, for example, replacement of hydrogen by an alkyl, acyl, or amino group. A nucleic acid derivative encodes a polypeptide which retains the essential biological and/or functional characteristics of the natural molecule. A derivative polypeptide is one which is modified by glycosylation, pegylation, or any similar process that retains the biological and/or functional or immunological activity of the polypeptide from which it is derived.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 19 -

The term "biologically active", i.e., functional, refers to a protein or polypeptide or fragment thereof having structural, regulatory, or biochemical functions of a naturally occurring molecule. Likewise, "immunologically active" refers to the capability of the natural, recombinant, or synthetic RATL1d6, or any oligopeptide thereof, to induce a specific immune response in appropriate animals or cells, for example, to generate antibodies, and to bind with specific antibodies.

The term hybridization refers to any process by which a strand of nucleic acid binds with a complementary strand through base pairing.

10 The term "hybridization complex" refers to a complex formed between two nucleic acid sequences by virtue of the formation of hydrogen bonds between complementary G and C bases and between complementary A and T bases. The hydrogen bonds may be further stabilized by base stacking interactions. The two complementary nucleic acid sequences hydrogen bond in an anti-parallel configuration. A hybridization complex may be formed in solution (e.g., C₀t or R₀t analysis), or between one nucleic acid sequence present in solution and another nucleic acid sequence immobilized on a solid support (e.g., membranes, filters, chips, pins, or glass slides, or any other appropriate substrate to which cells or their nucleic acids have been affixed).

15 The terms stringency or stringent conditions refer to the conditions for hybridization as defined by nucleic acid composition, salt and temperature. These conditions are well known in the art and may be altered to identify and/or detect identical or related polynucleotide sequences in a sample. A variety of equivalent conditions comprising either low, moderate, or high stringency depend on factors such as the length and nature of the sequence (DNA, RNA, base composition), reaction milieu (in solution or immobilized on a solid substrate), nature of the target nucleic acid (DNA, RNA, base composition), concentration of salts and the presence or absence of other reaction components (e.g., formamide, dextran sulfate and/or polyethylene glycol) and reaction temperature (within a range of from

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 20 -

about 5°C below the melting temperature of the probe to about 20°C to 25°C below the melting temperature). One or more factors may be varied to generate conditions, either low or high stringency, that are different from but equivalent to the aforementioned conditions.

5 As will be understood by those of skill in the art, the stringency of hybridization may be altered in order to identify or detect identical or related polynucleotide sequences. As will be further appreciated by the skilled practitioner, T_m can be approximated by the formulas as known in the art, depending on a number of parameters, such as the length of the
10 hybrid or probe in number of nucleotides, or hybridization buffer ingredients and conditions (See, for example, T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982 and J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. F.M. Ausubel et al., Vol. 1, "Preparation and Analysis of DNA", John Wiley and Sons, Inc., 1994-1995, Suppls. 26, 29, 35 and 42; pp. 2.10.7- 2.10.16; G.M. Wahl and S. L. Berger (1987; Methods Enzymol. 152:399-407); and A.R. Kimmel, 1987; Methods of Enzymol. 152:507-511). As a general guide, T_m decreases approximately 1°C -1.5°C
20 with every 1% decrease in sequence homology. Also, in general, the stability of a hybrid is a function of sodium ion concentration and temperature. Typically, the hybridization reaction is initially performed under conditions of low stringency, followed by washes of varying, but higher stringency. Reference to hybridization stringency, e.g., high, moderate, or
25 low stringency, typically relates to such washing conditions.

Thus, by way of nonlimiting example, high stringency refers to conditions that permit hybridization of those nucleic acid sequences that form stable hybrids in 0.018M NaCl at about 65°C (i.e., if a hybrid is not stable in 0.018M NaCl at about 65°C, it will not be stable under high
30 stringency conditions). High stringency conditions can be provided, for instance, by hybridization in 50% formamide, 5x Denhart's solution, 5xSSPE

(saline sodium phosphate EDTA) (1x SSPE buffer comprises 0.15 M NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA), (or 1x SSC buffer containing 150 mM NaCl, 15 mM Na₃ citrate • 2 H₂O, pH 7.0), 0.2% SDS at about 42°C, followed by washing in 1x SSPE (or saline sodium citrate, SSC) and 0.1% SDS at a temperature of at least about 42°C, preferably about 55°C, more preferably about 65°C.

Moderate stringency refers, by nonlimiting example, to conditions that permit hybridization in 50% formamide, 5x Denhart's solution, 5xSSPE (or SSC), 0.2% SDS at 42°C (to about 50°C), followed by washing in 0.2x SSPE (or SSC) and 0.2% SDS at a temperature of at least about 42°C, preferably about 55°C, more preferably about 65°C.

Low stringency refers, by nonlimiting example, to conditions that permit hybridization in 10% formamide, 5x Denhart's solution, 6xSSPE (or SSC), 0.2% SDS at 42°C, followed by washing in 1x SSPE (or SSC) and 0.2% SDS at a temperature of about 45°C, preferably about 50°C.

For additional stringency conditions, see T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982). It is to be understood that the low, moderate and high stringency hybridization / washing conditions may be varied using a variety of ingredients, buffers and temperatures well known to and practiced by the skilled practitioner.

The terms complementary or complementarity refer to the natural binding of polynucleotides under permissive salt and temperature conditions by base-pairing. For example, the sequence "A-G-T" binds to the complementary sequence "T-C-A". Complementarity between two single-stranded molecules may be "partial", in which only some of the nucleic acids bind, or it may be complete when total complementarity exists between single stranded molecules. The degree of complementarity between nucleic acid strands has significant effects on the efficiency and strength of hybridization between nucleic acid strands. This is of particular importance

in amplification reactions, which depend upon binding between nucleic acids strands, as well as in the design and use of PNA molecules.

The term homology refers to a degree of complementarity.

There may be partial homology or complete homology, wherein complete
5 homology is equivalent to identity. A partially complementary sequence that at least partially inhibits an identical sequence from hybridizing to a target nucleic acid is referred to using the functional term "substantially homologous." The inhibition of hybridization of the completely
10 complementary sequence to the target sequence may be examined using a hybridization assay (e.g., Southern or Northern blot, solution hybridization and the like) under conditions of low stringency.

A substantially homologous sequence or probe will compete for and inhibit the binding (i.e., the hybridization) of a completely homologous sequence or probe to the target sequence under conditions of
15 low stringency. Nonetheless, conditions of low stringency do not permit non-specific binding; low stringency conditions require that the binding of two sequences to one another be a specific (i.e., selective) interaction. The absence of non-specific binding may be tested by the use of a second target sequence which lacks even a partial degree of complementarity (e.g., less
20 than about 30% identity). In the absence of non-specific binding, the probe will not hybridize to the second non-complementary target sequence.

Those having skill in the art will know how to determine percent identity between/among sequences using, for example, algorithms such as those based on the CLUSTALW computer program (J.D. Thompson
25 et al., 1994, *Nucleic Acids Research*, 2(22):4673-4680), or FASTDB, (Brutlag et al., 1990, *Comp. App. Biosci.*, 6:237-245), as known in the art. Although the FASTDB algorithm typically does not consider internal non-matching deletions or additions in sequences, i.e., gaps, in its calculation, this can be corrected manually to avoid an overestimation of the % identity.
30 CLUSTALW, however, does take sequence gaps into account in its identity calculations.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 23 -

A composition comprising a given polynucleotide sequence refers broadly to any composition containing the given polynucleotide sequence. The composition may comprise a dry formulation or an aqueous solution. Compositions comprising polynucleotide sequence (SEQ ID NO:1) encoding RATL1d6 polypeptide, or fragments thereof, may be employed as hybridization probes. The probes may be stored in freeze-dried form and may be in association with a stabilizing agent such as a carbohydrate. In hybridizations, the probe may be employed in an aqueous solution containing salts (e.g., NaCl), detergents or surfactants (e.g., SDS) and other components (e.g., Denhardt's solution, dry milk, salmon sperm DNA, and the like).

The term "substantially purified" refers to nucleic acid sequences or amino acid sequences that are removed from their natural environment, isolated or separated, and are at least 60% free, preferably 75% to 85% free, and most preferably 90%, or greater, free from other components with which they are naturally associated.

The term sample, or biological sample, is meant to be interpreted in its broadest sense. A biological sample suspected of containing nucleic acid encoding RATL1d6 protein, or fragments thereof, or RATL1d6 protein itself, may comprise a body fluid, an extract from cells or tissue, chromosomes isolated from a cell (e.g., a spread of metaphase chromosomes), organelle, or membrane isolated from a cell, a cell, nucleic acid such as genomic DNA (in solution or bound to a solid support such as for Southern analysis), RNA (in solution or bound to a solid support such as for Northern analysis), cDNA (in solution or bound to a solid support), a tissue, a tissue print and the like.

Transformation refers to a process by which exogenous DNA enters and changes a recipient cell. It may occur under natural or artificial conditions using various methods well known in the art. Transformation may rely on any known method for the insertion of foreign nucleic acid sequences into a prokaryotic or eukaryotic host cell. The method is selected

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 24 -

based on the type of host cell being transformed and may include, but is not limited to, viral infection, electroporation, heat shock, lipofection, and partial bombardment. Such "transformed" cells include 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. Transformed cells also include those cells which transiently express the inserted DNA or RNA for limited periods of time.

The term "mimetic" refers to a molecule, the structure of which is developed from knowledge of the structure of RATL1d6 protein, or portions thereof, and as such, is able to effect some or all of the actions of RATL1d6 protein.

The term "portion" with regard to a protein (as in "a portion of a given protein") refers to fragments or segments of that protein. The fragments may range in size from four or five amino acid residues to the entire amino acid sequence minus one amino acid. Thus, a protein "comprising at least a portion of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2" encompasses the full-length human RATL1d6 polypeptide, and fragments thereof.

The term antibody refers to intact molecules as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, Fv, which are capable of binding an epitopic or antigenic determinant. Antibodies that bind to RATL1d6 polypeptides can be prepared using intact polypeptides or fragments containing small peptides of interest or prepared recombinantly for use as the immunizing antigen. The polypeptide or oligopeptide used to immunize an animal can be derived from the transcription 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 (BSA), keyhole limpet hemocyanin (KLH), and thyroglobulin. The coupled peptide is then used to immunize the animal (e.g., a mouse, a rat, or a rabbit).

The term "humanized" antibody refers to antibody molecules in which amino acids have been replaced in the non-antigen binding regions in order to more closely resemble a human antibody, while still retaining the original binding capability, e.g., as described in U.S. Patent No. 5,585,089 to
5 C.L. Queen et al.

The term "antigenic determinant" refers to that portion of a molecule that makes contact with a particular antibody (i.e., an epitope). When a protein or fragment of a protein is used to immunize a host animal, numerous regions of the protein may induce the production of antibodies
10 which bind specifically to a given region or three-dimensional structure on the protein; these regions or structures are referred to as antigenic determinants. 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 terms "specific binding" or "specifically binding" refer to the interaction between a protein or peptide and a binding molecule, such as an agonist, an antagonist, or an antibody. The interaction is dependent upon the presence of a particular structure (i.e., an antigenic determinant or epitope) of the protein that is recognized by the binding molecule. For
20 example, if an antibody is specific for epitope "A", the presence of a protein containing epitope A (or free, unlabeled A) in a reaction containing labeled "A" and the antibody will reduce the amount of labeled A bound to the antibody.

The term "correlates with expression of a polynucleotide" indicates that the detection of the presence of ribonucleic acid that is similar to SEQ ID NO:1 by Northern analysis is indicative of the presence of mRNA encoding RATL1d6 polypeptide in a sample and thereby correlates with
25 expression of the transcript from the polynucleotide encoding the protein.

An alteration in the polynucleotide of SEQ ID NO:1 comprises
30 any alteration in the sequence of the polynucleotides encoding RATL1d6 polypeptide, including deletions, insertions, and point mutations that may be

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 26 -

detected using hybridization assays. Included within this definition is the detection of alterations to the genomic DNA sequence which encodes RATL1d6 polypeptide (e.g., by alterations in the pattern of restriction fragment length polymorphisms capable of hybridizing to SEQ ID NO:1), the inability of a selected fragment of SEQ ID NO:1 to hybridize to a sample of genomic DNA (e.g., using allele-specific oligonucleotide probes), and improper or unexpected hybridization, such as hybridization to a locus other than the normal chromosomal locus for the polynucleotide sequence encoding RATL1d6 polypeptide (e.g., using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to metaphase chromosome spreads).

Description of the Present Invention

The present invention is based on the discovery of a novel polypeptide isolated from activated human T-cells, and designated RATL1d6 herein, that was found to be upregulated upon stimulation of Jurkat-line T cells and human peripheral blood T lymphocytes with antibodies directed against the CD3 and CD28 cell surface antigens. The invention encompasses the polynucleotide encoding the RATL1d6 polypeptide and the use of compositions comprising the RATL1d6 polynucleotide or polypeptide for the screening, diagnosis, treatment or prevention of disorders associated with aberrant or uncontrolled cellular growth and/or function, such as neoplastic diseases (e.g., cancers and tumors) and immune and neurodegenerative disorders and conditions.

The invention also encompasses the polynucleotide encoding the RATL1d6 polypeptide and the use of compositions comprising the RATL1d6 polynucleotide or polypeptide for the screening, diagnosis, treatment or prevention of disorders associated with aberrant immune responses, such as for autoimmune conditions, degenerative conditions, cachexia, muscle degeneration, etc.

Also encompassed by the present invention are fragments or portions of the RATL1d6 polynucleotide and polypeptide sequences provided herein. Functional or active portions of the RATL1d6 polypeptide

are preferred. The RATL1d6 polypeptide has similarity to ubiquitin conjugating enzymes.

Nucleic acid encoding human RATL1d6 according to the present invention were first identified by subtraction cloning. (Example 1).

- 5 Additional nucleic acids were identified in Incyte Clone Nos. 2396483 (THP-1, promonocyte library); 5818240 (prostate tumor library); 5396270 (liver tumor library); and 4741202 (thymus library) through BLAST searches of the Incyte database. The sequences were aligned and the resulting contig was utilized to design oligonucleotides to obtain a full-length clone. (See
- 10 Examples 1 and 2).

In one of its embodiments, the present invention encompasses a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 as shown in Fig. 3. The RAT1d6 polypeptide is 422 amino acids in length and shares amino acid sequence homology to ubiquitin conjugating enzymes.

- 15 The RATL1d6 protein is thus characterized as a newly-discovered member of the UBC family isolated from activated T lymphocytes. In addition, Fig. 4 provides an alignment of the RATL1d6 polypeptide sequence with interspecies sequences comprising a ubiquitin conjugating enzyme (UBC) family of proteins having UBC domains.

- 20 That EG:25E8.2 is concluded to be a ubiquitin conjugating enzyme and likely ortholog of Rat1d6 is due to the significant level of homology between the proteins. To better elucidate the function of RATL1d6, studies with EG:25E8.2 were undertaken in a *Drosophila* cell-based model for immunity. (see Example 14).

- 25 Mammals have a complex immune response that relies on innate and adaptive immune pathways, and these pathways share similar classes of molecules. Most components of innate immunity are evolutionarily conserved from *Drosophila* to man, while only higher eukaryotes have acquired immunity (Silverman, N. and Maniatis, T., 2001,
- 30 *Genes Dev.*, 15:2321-2342).

Insects have a potent and rapid response to a broad spectrum of pathogens. Fungal and bacterial infections of *Drosophila* lead to transcriptional activation of antimicrobial peptide (AMP) genes. The induction of each AMP gene is regulated by a balance of inputs that are manifested by combinations of the three Rel/ NF- κ B proteins, namely, Relish, Dorsal and Dif. The AMP AttacinD gene is regulated by activation of Relish homodimers, or heterodimers of Relish and Dorsal (Han, Z.S. and Ip, Y.T., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274:21355-21361). Activation of Rel/ NF- κ B pathways are essential for the *Drosophila* innate immune response. For example, *Drosophila* mutations in the Relish gene do not express certain classes of antimicrobial peptides and are susceptible to gram-negative bacterial infection (Hendengren, M. et al., 1999, *Mol. Cell.*, 4(5):827-837).

Drosophila Rel proteins, like mammalian Rel, are sequestered in the cytoplasm as a result of association with an I κ B-like inhibitor protein. When cells are activated by pathogens, signaling pathways are activated leading to the degradation of I κ B, nuclear translocation of Rel proteins and Rel activated transcription (Silverman, N. and Maniatis, T., 2001, *Genes Dev.*, 15:2321-2342). Cactus is the I κ B protein that inhibits Dorsal and Dif. Relish is the mammalian homolog of p105 NF- κ B, and like NF- κ B, Relish contains both a Rel domain and a I κ B inhibitory domain. Relish is activated by a cleavage event that releases the I κ B domain (Stoven, S. et al., 2000, *EMBO Rep.*, 1:347-352).

The above-discussed studies correlate the function of EG:25E8.2 protein to regulation of the *Drosophila* innate immune response. Central to these studies was the generation of a "knock out" phenotype with double-stranded RNA-mediated interference (RNAi) of EG:25E8.2 mRNA in *Drosophila* Schneider 2 (S2) cultured cells. RNAi technologies were developed to produce sustained post-transcriptional gene-silencing and have been reported to work in S2 cells (Caplen, N.J. et al., 2000, *Gene*, 252:95-105 and Clemens, J.C. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 29 -

97:6499-6503). S2 cells can be induced by the bacterial cell wall component lipopolysaccharide (LPS) to express a subset of antimicrobial peptides, including attacin (Han, Z.S. and Ip, Y.T., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274:21355-21361). The experiments described in Example 14 have tested
5 EG:25E8.2 RNAI in a LPS-inducible luciferase reporter system in S2 cells.

Variants of the RATL1d6 polypeptide are also encompassed by the present invention. A preferred RATL1d6 variant has at least 75 to 80%, more preferably at least 85 to 90%, and even more preferably at least 90% amino acid sequence identity to the amino acid sequence claimed
10 herein, and which retains at least one biological, immunological, or other functional characteristic or activity of RATL1d6 polypeptide. Most preferred is a variant having at least 95% amino acid sequence identity to that of SEQ ID NO:2.

In another embodiment, the present invention encompasses
15 polynucleotides which encode RATL1d6 polypeptide. Accordingly, any nucleic acid sequence which encodes the amino acid sequence of RATL1d6 polypeptide can be used to produce recombinant molecules that express RATL1d6 protein. In a particular embodiment, the present invention encompasses the RATL1d6 polynucleotide comprising the nucleic acid
20 sequence of SEQ ID NO:1 and as shown in Figures 1A and 1B. More particularly, the present invention provides the RATL1d6 clone, deposited at the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 on October 1, 2001 and under ATCC Accession No. PTA-3745 according to the terms of the Budapest Treaty.

As will be appreciated by the skilled practitioner in the art, the
25 degeneracy of the genetic code results in the production of a multitude of nucleotide sequences encoding RATL1d6 polypeptide. Some of the sequences bear minimal homology to the nucleotide sequences of any known and naturally occurring gene. Accordingly, the present invention
30 contemplates each and every possible variation of nucleotide sequence that could be made by selecting combinations based on possible codon choices.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 30 -

These combinations are made in accordance with the standard triplet genetic code as applied to the nucleotide sequence of naturally occurring RATL1d6, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

5 Although nucleotide sequences which encode RATL1d6 polypeptide and its variants are preferably capable of hybridizing to the nucleotide sequence of the naturally occurring RATL1d6 polypeptide under appropriately selected conditions of stringency, it may be advantageous to produce nucleotide sequences encoding RATL1d6 polypeptide, or its
10 derivatives, which possess a substantially different codon usage. Codons may be selected to increase the rate at which expression of the peptide/polypeptide 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
15 encoding RATL1d6 polypeptide, 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 present invention also encompasses production of DNA
20 sequences, or portions thereof, which encode RATL1d6 polypeptide, and its derivatives, 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 that are well known and practiced by those in the art. Moreover, synthetic chemistry may be used to introduce
25 mutations into a sequence encoding RATL1d6 polypeptide, or any fragment thereof.

Also encompassed by the present invention are polynucleotide sequences that are capable of hybridizing to the claimed nucleotide sequence of RATL1d6, such as that shown in SEQ ID NO:1, under various
30 conditions of stringency. Hybridization conditions are typically based on the melting temperature (T_m) of the nucleic acid binding complex or probe (See,

G.M. Wahl and S.L. Berger, 1987; *Methods Enzymol.*, 152:399-407 and A.R. Kimmel, 1987; *Methods of Enzymol.*, 152:507-511), and may be used at a defined stringency. For example, included in the present invention are sequences capable of hybridizing under moderately stringent conditions to the RATL1d6 sequence of SEQ ID NO:1 and other sequences which are degenerate to those which encode RATL1d6 polypeptide (e.g., as a nonlimiting example: prewashing solution of 2X SSC, 0.5% SDS, 1.0mM EDTA, pH 8.0, and hybridization conditions of 50°C, 5XSSC, overnight.

The nucleic acid sequence encoding RATL1d6 protein may be extended utilizing a partial nucleotide sequence and employing various methods known in the art to detect upstream sequences such as promoters and regulatory elements. For example, one method which may be employed is restriction-site PCR, which utilizes universal primers to retrieve unknown sequence adjacent to a known locus (G. Sarkar, 1993, *PCR Methods Applic.*, 2:318-322). In particular, genomic DNA is first amplified in the presence of primer to a linker sequence and a primer specific to the known region. The amplified sequences are then subjected to a second round of PCR with the same linker primer and another specific primer internal to the first one. Products of each round of PCR are transcribed with an appropriate RNA polymerase and sequenced using reverse transcriptase.

Inverse PCR may also be used to amplify or extend sequences using divergent primers based on a known region or sequence (T. Triglia et al., 1988, *Nucleic Acids Res.*, 16:8186). The primers may be designed using OLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences Inc., Plymouth, MN.), or another appropriate program, to be 22-30 nucleotides in length, to have a GC content of 50% or more, and to anneal to the target sequence at temperatures about 68°-72°C. The method uses several restriction enzymes to generate a suitable fragment in the known region of a gene. The fragment is then circularized by intramolecular ligation and used as a PCR template.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 32 -

Another method which may be used is capture PCR which involves PCR amplification of DNA fragments adjacent to a known sequence in human and yeast artificial chromosome (YAC) DNA (M. Lagerstrom et al., 1991, *PCR Methods Applic.*, 1:111-119). In this method, multiple restriction enzyme digestions and ligations may also be used to place an engineered double-stranded sequence into an unknown portion of the DNA molecule before performing PCR. J.D. Parker et al. (1991; *Nucleic Acids Res.*, 19:3055-3060) provide another method which may be used to retrieve unknown sequences. In addition, PCR, nested primers, and PROMOTERFINDER libraries can be used to walk genomic DNA (Clontech, Palo Alto, CA). This process avoids the need to screen libraries and is useful in finding intron/exon junctions.

When screening for full-length cDNAs, it is preferable to use libraries that have been size-selected to include larger cDNAs. Also, random-primed libraries are preferable, since they will contain more sequences which contain the 5' regions of genes. The use of a randomly primed library may be especially 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 the 5' and 3' non-transcribed regulatory regions, or to identify exon usage in alternatively-spliced transcripts.

The embodiments of the present invention can be practiced using methods for DNA sequencing which are well known and generally available in the art. The methods may employ such enzymes as the Klenow fragment of DNA polymerase I, SEQUENASE (US Biochemical Corp. Cleveland, OH), Taq polymerase (PE Biosystems), thermostable T7 polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), or combinations of recombinant polymerases and proofreading exonucleases such as the ELONGASE Amplification System marketed by Life Technologies (Gaithersburg, Md.). Preferably, the process is automated with machines such as the Hamilton Micro Lab 2200 (Hamilton, Reno, NV).

Peltier Thermal Cycler (PTC200; MJ Research, Watertown, MA) and the ABI Catalyst and 373 and 377 DNA sequencers (PE Biosystems).

Commercially available capillary electrophoresis systems 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 fluorescent dyes (one for each nucleotide) which are laser activated, and detection of the emitted wavelengths by a charge coupled device camera. Output/light intensity may be converted to electrical signal using appropriate software (e.g., GENOTYPER and SEQUENCE NAVIGATOR, PE 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 the sequencing of small pieces of DNA which might be present in limited amounts in a particular sample.

In another embodiment of the present invention, polynucleotide sequences or fragments thereof which encode RATL1d6 polypeptide, or peptides thereof, may be used in recombinant DNA molecules to direct the expression of RATL1d6 polypeptide product, or fragments or functional equivalents thereof, in appropriate host cells. Because of 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 these sequences may be used to clone and express RATL1d6 protein.

As will be appreciated by those having skill in the art, it may be advantageous to produce RATL1d6 polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of protein expression or to produce a recombinant RNA transcript having desirable properties, such as a half-life

which is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

The nucleotide sequence of the present invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter RATL1d6 polypeptide-encoding sequences for a variety of reasons, including, but not limited to, alterations which modify 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, site-directed (or site-specific) mutagenesis may be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, or introduce mutations, and the like. A variety of techniques for performing site-directed mutagenesis are known and practiced in the art and are described, for example, in M.J. McPherson (ed), 1991, *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford; J.L. Owen et al., Apr., 1994, *Focus*, Life Technologies, Inc., Vol. 16.2:39-44; and R. Andag and E. Schutz, 2001, *BioTechniques*, 30(3):486-488). Kits for performing *in vitro* site-directed mutagenesis are also commercially available and widely used (e.g., Quik-Change® Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA; and Unique Site Elimination Mutagenesis Kit, Pharmacia Biotechnology, Piscataway, NJ).

In another embodiment of the present invention, natural, modified, or recombinant nucleic acid sequences encoding RATL1d6 polypeptide may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, for screening peptide libraries for inhibitors of RATL1d6 activity, it may be useful to encode a chimeric RATL1d6 protein that can be recognized by a commercially available antibody. A fusion protein may also be engineered to contain a cleavage site located between the RATL1d6 protein-encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that RATL1d6 protein may be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 35 -

In another embodiment, ligand-binding assays are useful to identify inhibitor compounds that interfere with the function of the RATL1d6 product. Such assays are useful even if the function of a protein is not known. These assays are designed to detect binding of test compounds to particular target molecules, e.g., proteins or peptides. The detection may involve direct measurement of binding. Alternatively, indirect indications of binding may involve stabilization of protein structure or disruption of a biological function. Non-limiting examples of useful ligand-binding assays are detailed below.

10 One useful method for the detection and isolation of binding proteins is the Biomolecular Interaction Assay (BIAcore) system developed by Pharmacia Biosensor and described in the manufacturer's protocol (LKB Pharmacia, Sweden). The BIAcore system uses an affinity purified anti-GST antibody to immobilize GST-fusion proteins onto a sensor chip. The sensor utilizes surface plasmon resonance, which is an optical phenomenon that detects changes in refractive indices. Accordingly, a protein of interest, e.g., the RATL1d6 polypeptide, or fragment thereof, of the present invention, is coated onto a chip and test compounds are passed over the chip. Binding is detected by a change in the refractive index (surface plasmon resonance).

20 A different type of ligand-binding assay involves scintillation proximity assays (SPA), as described in U.S. Patent No. 4,568,649. In a modification of this assay currently undergoing development, chaperonins are used to distinguish folded and unfolded proteins. A tagged protein is attached to SPA beads, and test compounds are added. The bead is then subjected to mild denaturing conditions, such as, for example, heat, exposure to SDS, and the like, and a purified labeled chaperonin is added. If a test compound has bound to a target protein, the labeled chaperonin will not bind; conversely, if no test compound has bound, the protein will undergo some degree of denaturation and the chaperonin will bind. In another type of ligand binding assay, proteins containing mitochondrial targeting signals are imported into isolated mitochondria *in vitro* (Hurt et al.,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 36 -

1985, *EMBO J.*, 4:2061-2066; Eilers and Schatz, 1986, *Nature*, 322:228-231). In a mitochondrial import assay, expression vectors are constructed in which nucleic acids encoding particular target proteins are inserted downstream of sequences encoding mitochondrial import signals. The chimeric proteins are synthesized and tested for their ability to be imported into isolated mitochondria in the absence and presence of test compounds. A test compound that binds to the target protein should inhibit its uptake into isolated mitochondria *in vitro*.

Another type of ligand-binding assay suitable for use according to the present invention is the yeast two-hybrid system (Fields and Song, 1989, *Nature*, 340:245-246). The yeast two-hybrid system takes advantage of the properties of the GAL4 protein of the yeast *S. cerevisiae*. The GAL4 protein is a transcriptional activator required for the expression of genes encoding enzymes involving the utilization of galactose. GAL4 protein consists of two separable and functionally essential domains: an N-terminal domain, which binds to specific DNA sequences (UASG); and a C-terminal domain containing acidic regions, which is necessary to activate transcription. The native GAL4 protein, containing both domains, is a potent activator of transcription when yeast cells are grown on galactose medium. The N-terminal domain binds to DNA in a sequence-specific manner but is unable to activate transcription. The C-terminal domain contains the activating regions but cannot activate transcription because it fails to be localized to UASG. In the two-hybrid system, a system of two hybrid proteins containing parts of GAL4: (1) a GAL4 DNA-binding domain fused to a protein 'X', and (2) a GAL4 activation region fused to a protein 'Y'. If X and Y can form a protein-protein complex and reconstitute proximity of the GAL4 domains, transcription of a gene regulated by UASG occurs. Creation of two hybrid proteins, each containing one of the interacting proteins X and Y, allows the activation region of UASG to be brought to its normal site of action.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 37 -

The binding assay described in Fodor et al., 1991, *Science*, 251:767-773, which involves testing the binding affinity of test compounds for a plurality of defined polymers synthesized on a solid substrate, may also be useful. Compounds that bind to the RATL1d6 polypeptide, or portions thereof, according to this invention are potentially useful as agents for use in therapeutic compositions.

In another embodiment, sequences encoding the RATL1d6 polypeptide may be synthesized in whole, or in part, using chemical methods well known in the art (See, for example, M.H. Caruthers et al., 1980, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.*, 215-223 and T. Horn, T et al., 1980, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.*, 225-232). Alternatively, the protein itself may be produced using chemical methods to synthesize the amino acid sequence of RATL1d6 polypeptide, or a fragment or portion thereof. For example, peptide synthesis can be performed using various solid-phase techniques (J.Y. Roberge et al., 1995, *Science*, 269:202-204) and automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 431A Peptide Synthesizer (PE Biosystems). The newly synthesized peptide can be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g., T. Creighton, 1983, *Proteins, Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, N.Y.), by reversed-phase high performance liquid chromatography, or other purification methods as are known in the art. The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman degradation procedure; Creighton, *supra*). In addition, the amino acid sequence of RATL1d6 polypeptide or any portion thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with sequences from other proteins, or any part thereof, to produce a variant polypeptide.

Polypeptide lacking a start methionine

In a preferred embodiment, the present invention encompasses a polynucleotide lacking the initiating start codon, in addition

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 38 -

to the resulting encoded polypeptide of RATL1d6. Specifically, the present invention encompasses the polynucleotide corresponding to nucleotides 520 through 1782 of SEQ ID NO:1, and the polypeptide corresponding to amino acids 2 through 422 of SEQ ID NO:2. Also encompassed by this invention are recombinant vectors comprising the polynucleotide sequence encoding RATL1d6, and host cells comprising the vector.

RATL1d6 UBC Domain

The UBC domain of the novel RATL1d6 polypeptide is located from about G248 to about K411 of SEQ ID NO:2. The conserved cysteine involved in ubiquitin transfer is located at amino acid 351 of SEQ ID NO:2.

In a preferred embodiment, the following RATL1d6 UBC domain polypeptide is encompassed by the present invention:
GSVQATDRLMKELRDIYRSQSFKGGNYAVELVNDSLYDWNVKKLLKVDQD
SALHNDLQILKEKEGADFILLNFSFKDNFPDPPFVRVVSPLSGGYVLGG
15 GAICMELLTKQGWSSAYSIESVIMQISATLVK GKARVQFGANKSQYSLTRA
QQSYKSLVQIHEK (SEQ ID NO:47). The polynucleotide encoding this polypeptide is also provided. The present invention also encompasses the use of the RATL1d6 UBC domain polypeptide as an immunogenic and/or antigenic epitope as described elsewhere herein.

20 In additional preferred embodiments, the following N-terminal RATL1d6 UBC domain deletion polypeptides are encompassed by the present invention: G1-K164, S2-K164, V3-K164, Q4-K164, A5-K164, T6-K164, D7-K164, R8-K164, L9-K164, M10-K164, K11-K164, E12-K164, L13-K164, R14-K164, D15-K164, I16-K164, Y17-K164, R18-K164, S19-K164,
25 Q20-K164, S21-K164, F22-K164, K23-K164, G24-K164, G25-K164, N26-K164, Y27-K164, A28-K164, V29-K164, E30-K164, L31-K164, V32-K164, N33-K164, D34-K164, S35-K164, L36-K164, Y37-K164, D38-K164, W39-K164, N40-K164, V41-K164, K42-K164, L43-K164, L44-K164, K45-K164, V46-K164, D47-K164, Q48-K164, D49-K164, S50-K164, A51-K164, L52-
30 K164, H53-K164, N54-K164, D55-K164, L56-K164, Q57-K164, I58-K164,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 39 -

L59-K164, K80-K164, E81-K164, K82-K164, E63-K164, G84-K164, A85-
 K164, D86-K164, F67-K164, I68-K164, L69-K164, L70-K164, N71-K164,
 F72-K164, S73-K164, F74-K164, K75-K164, D76-K164, N77-K164, F78-
 K164, P79-K164, F80-K164, D81-K164, P82-K164, P83-K164, F84-K164,
 5 V85-K164, R86-K164, V87-K164, V88-K164, S89-K164, P90-K164, V91-
 K164, L92-K164, S93-K164, G94-K164, G95-K164, Y96-K164, V97-K164,
 L98-K164, G99-K164, G100-K164, G101-K164, A102-K164, I103-K164,
 C104-K164, M105-K164, E106-K164, L107-K164, L108-K164, T109-K164,
 K110-K164, Q111-K164, G112-K164, W113-K164, S114-K164, S115-K164,
 10 A116-K164, Y117-K164, S118-K164, I119-K164, E120-K164, S121-K164,
 V122-K164, I123-K164, M124-K164, Q125-K164, I126-K164, S127-K164,
 A128-K164, T129-K164, L130-K164, V131-K164, K132-K164, G133-K164,
 K134-K164, A135-K164, R136-K164, V137-K164, Q138-K164, F139-K164,
 G140-K164, A141-K164, N142-K164, K143-K164, S144-K164, Q145-K164,
 15 Y146-K164, S147-K164, L148-K164, T149-K164, R150-K164, A151-K164,
 Q152-K164, Q153-K164, S154-K164, Y155-K164, K156-K164, S157-K164,
 and/or L158-K164 of SEQ ID NO:2. Polynucleotide sequences encoding
 these polypeptides are also provided. The present invention also
 encompasses the use of one or more of these N-terminal RATL1d6 UBC
 20 domain deletion polypeptides as immunogenic and/or antigenic epitopes as
 described elsewhere herein.

In yet other preferred embodiments, the following C-terminal
 RATL1d6 UBC domain deletion polypeptides are encompassed by the
 present invention: G1-K164, G1-E163, G1-H162, G1-I161, G1-Q160, G1-
 25 V159, G1-L158, G1-S157, G1-K156, G1-Y155, G1-S154, G1-Q153, G1-
 Q152, G1-A151, G1-R150, G1-T149, G1-L148, G1-S147, G1-Y146, G1-
 Q145, G1-S144, G1-K143, G1-N142, G1-A141, G1-G140, G1-F139, G1-
 Q138, G1-V137, G1-R136, G1-A135, G1-K134, G1-G133, G1-K132, G1-
 V131, G1-L130, G1-T129, G1-A128, G1-S127, G1-I126, G1-Q125, G1-
 30 M124, G1-I123, G1-V122, G1-S121, G1-E120, G1-I119, G1-S118, G1-
 Y117, G1-A116, G1-S115, G1-S114, G1-W113, G1-G112, G1-Q111, G1-

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 40 -

K110, G1-T109, G1-L108, G1-L107, G1-E106, G1-M105, G1-C104, G1-
I103, G1-A102, G1-G101, G1-G100, G1-G99, G1-L98, G1-V97, G1-Y96,
G1-G95, G1-G84, G1-S93, G1-L92, G1-V91, G1-P90, G1-S89, G1-V88, G1-
V87, G1-R86, G1-V85, G1-F84, G1-P83, G1-P82, G1-D81, G1-F80, G1-
5 P79, G1-F78, G1-N77, G1-D76, G1-K75, G1-F74, G1-S73, G1-F72, G1-
N71, G1-L70, G1-L69, G1-I68, G1-F67, G1-D66, G1-A65, G1-G64, G1-E63,
G1-K62, G1-E61, G1-K60, G1-L59, G1-I58, G1-Q57, G1-L56, G1-D55, G1-
N54, G1-H53, G1-L52, G1-A51, G1-S50, G1-D49, G1-Q48, G1-D47, G1-
V46, G1-K45, G1-L44, G1-L43, G1-K42, G1-V41, G1-N40, G1-W39, G1-
10 D38, G1-Y37, G1-L36, G1-S35, G1-D34, G1-N33, G1-V32, G1-L31, G1-
E30, G1-V29, G1-A28, G1-Y27, G1-N26, G1-G25, G1-G24, G1-K23, G1-
F22, G1-S21, G1-Q20, G1-S19, G1-R18, G1-Y17, G1-I16, G1-D15, G1-
R14, G1-L13, G1-E12, G1-K11, G1-M10, G1-L9, G1-R8, and/or G1-D7 of
SEQ ID NO:2. Polynucleotide sequences encoding these polypeptides are
15 also provided. The present invention also encompasses the use of one or
more of these C-terminal RATL1d6 UBC domain deletion polypeptides as
immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

In additional preferred embodiments, the following RATL1d6
UBC domain amino acid substitutions are encompassed by the present
20 invention: wherein G248 is substituted with either an A, C, D, E, F, H, I, K, L,
M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein S249 is
substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W,
or Y amino acid residue; wherein V250 is substituted with either an A, C, D,
E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein
25 Q251 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S,
T, V, W, or Y amino acid residue; wherein A252 is substituted with either a
C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue;
wherein T253 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N,
P, Q, R, S, V, W, or Y amino acid residue; wherein D254 is substituted with
30 either an A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid
residue; wherein R255 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 41 -

L, M, N, P, Q, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L256 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein M257 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein

5 K258 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein E259 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L260 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein R261 is substituted with

10 either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein D262 is substituted with either an A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein I263 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein Y264 is substituted with either an A, C, D,

15 E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, or W amino acid residue; wherein R265 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein S266 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein Q267 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N,

20 P, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein S268 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein F269 is substituted with either an A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein K270 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W,

25 or Y amino acid residue; wherein G271 is substituted with either an A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein G272 is substituted with either an A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein N273 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue;

30 wherein Y274 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, or W amino acid residue; wherein A275 is substituted with

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 42 -

either a C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein V276 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein E277 is substituted with either an A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L278 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein V279 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein N280 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein D281 is substituted with either an A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein S282 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L283 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein Y284 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, or W amino acid residue; wherein D285 is substituted with either an A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein W286 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, or Y amino acid residue; wherein N287 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein V288 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein K289 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L290 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L291 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein K292 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein V293 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein D294 is substituted with either an A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue;

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 43 -

wherein Q295 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein D296 is substituted with either an A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein S297 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein A298 is substituted with either a C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L299 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein H300 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein N301 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein D302 is substituted with either an A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L303 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein Q304 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein I305 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L306 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein K307 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein E308 is substituted with either an A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein K309 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein E310 is substituted with either an A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein G311 is substituted with either an A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein A312 is substituted with either a C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein D313 is substituted with either an A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein F314 is substituted with either an A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 44 -

T, V, W, or Y amino acid residue; wherein I315 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L316 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L317 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein N318 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein F319 is substituted with either an A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein S320 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein F321 is substituted with either an A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein K322 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein D323 is substituted with either an A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein N324 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein F325 is substituted with either an A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein P326 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein F327 is substituted with either an A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein D328 is substituted with either an A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein P329 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein P330 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein F331 is substituted with either an A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein V332 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein R333 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein V334 is substituted with either an A, C, D,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 45 -

E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein V335 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein S336 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue;

5 wherein P337 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein V338 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein L339 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein S340 is

10 substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein G341 is substituted with either an A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein G342 is substituted with either an A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein Y343 is substituted with either an

15 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, or W amino acid residue; wherein V344 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein L345 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein G346 is substituted with either an A, C, D, E, F, H, I, K, L,

20 M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein G347 is substituted with either an A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein G348 is substituted with either an A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein A349 is substituted with either a C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T,

25 V, W, or Y amino acid residue; wherein I350 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein C351 is substituted with either an A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein M352 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid

30 residue; wherein E353 is substituted with either an A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L354 is

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 46 -

substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L355 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein T356 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, or Y amino acid residue; wherein K357 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein Q358 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein G359 is substituted with either an A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein W360 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, or Y amino acid residue; wherein S361 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein S362 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein A363 is substituted with either a C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein Y364 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, or W amino acid residue; wherein S365 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein I366 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein E367 is substituted with either an A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein S368 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein V369 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein I370 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein M371 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein Q372 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein I373 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 47 -

residue; wherein S374 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein A375 is substituted with either a C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein T376 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, or Y amino acid residue; wherein L377 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein V378 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein K379 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein G380 is substituted with either an A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein K381 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein A382 is substituted with either a C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein R383 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein V384 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein Q385 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein F386 is substituted with either an A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein G387 is substituted with either an A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein A388 is substituted with either a C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein N389 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein K390 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein S391 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein Q392 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein Y393 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 48 -

S, T, V, or W amino acid residue; wherein S394 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L395 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein T396 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, or Y amino acid residue; wherein R397 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein A398 is substituted with either a C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y; wherein Q399 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein Q400 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein S401 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein Y402 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, or W amino acid residue; wherein K403 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein S404 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein L405 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein V406 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, or Y amino acid residue; wherein Q407 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein I408 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein H409 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; wherein E410 is substituted with either an A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue; and/or wherein K411 is substituted with either an A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y amino acid residue of SEQ ID NO:2, in addition to any combination thereof. The present invention also encompasses the use of one or more of these RATL1d6 UBC domain amino acid substituted

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 49 -

polypeptides as immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

In other preferred embodiments, the following RATL1d6 UBC domain conservative amino acid substitutions are encompassed by the present invention: wherein G248 is substituted with either an A, M, S, or T; wherein S249 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein V250 is substituted with either an A, I, or L; wherein Q251 is substituted with a N; wherein A252 is substituted with either a G, I, L, M, S, T, or V; wherein T253 is substituted with either an A, G, M, or S; wherein D254 is substituted with an E; wherein R255 is substituted with either a K, or H; wherein L256 is substituted with either an A, I, or V; wherein M257 is substituted with either an A, G, S, or T; wherein K258 is substituted with either a R, or H; wherein E259 is substituted with a D; wherein L260 is substituted with either an A, I, or V; wherein R261 is substituted with either a K, or H; wherein D262 is substituted with an E; wherein I263 is substituted with either an A, V, or L; wherein Y264 is either an F, or W; wherein R265 is substituted with either a K, or H; wherein S266 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein Q267 is substituted with a N; wherein S268 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein F269 is substituted with either a W, or Y; wherein K270 is substituted with either a R, or H; wherein G271 is substituted with either an A, M, S, or T; wherein G272 is substituted with either an A, M, S, or T; wherein N273 is substituted with a Q; wherein Y274 is either an F, or W; wherein A275 is substituted with either a G, I, L, M, S, T, or V; wherein V276 is substituted with either an A, I, or L; wherein E277 is substituted with a D; wherein L278 is substituted with either an A, I, or V; wherein V279 is substituted with either an A, I, or L; wherein N280 is substituted with a Q; wherein D281 is substituted with an E; wherein S282 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein L283 is substituted with either an A, I, or V; wherein Y284 is either an F, or W; wherein D285 is substituted with an E; wherein W286 is either an F, or Y; wherein N287 is substituted with a Q; wherein V288 is substituted with either an A, I, or L; wherein K289 is

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 50 -

substituted with either a R, or H; wherein L290 is substituted with either an A, I, or V; wherein L291 is substituted with either an A, I, or V; wherein K292 is substituted with either a R, or H; wherein V293 is substituted with either an A, I, or L; wherein D294 is substituted with an E; wherein Q295 is substituted with a N; wherein D296 is substituted with an E; wherein S297 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein A298 is substituted with either a G, I, L, M, S, T, or V; wherein L299 is substituted with either an A, I, or V; wherein H300 is substituted with either a K, or R; wherein N301 is substituted with a Q; wherein D302 is substituted with an E; wherein L303 is substituted with either an A, I, or V; wherein Q304 is substituted with a N; wherein I305 is substituted with either an A, V, or L; wherein L306 is substituted with either an A, I, or V; wherein K307 is substituted with either a R, or H; wherein E308 is substituted with a D; wherein K309 is substituted with either a R, or H; wherein E310 is substituted with a D; wherein G311 is substituted with either an A, M, S, or T; wherein A312 is substituted with either a G, I, L, M, S, T, or V; wherein D313 is substituted with an E; wherein F314 is substituted with either a W, or Y; wherein I315 is substituted with either an A, V, or L; wherein L316 is substituted with either an A, I, or V; wherein L317 is substituted with either an A, I, or V; wherein N318 is substituted with a Q; wherein F319 is substituted with either a W, or Y; wherein S320 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein F321 is substituted with either a W, or Y; wherein K322 is substituted with either a R, or H; wherein D323 is substituted with an E; wherein N324 is substituted with a Q; wherein F325 is substituted with either a W, or Y; wherein P326 is a P; wherein F327 is substituted with either a W, or Y; wherein D328 is substituted with an E; wherein P329 is a P; wherein P330 is a P; wherein F331 is substituted with either a W, or Y; wherein V332 is substituted with either an A, I, or L; wherein R333 is substituted with either a K, or H; wherein V334 is substituted with either an A, I, or L; wherein V335 is substituted with either an A, I, or L; wherein S336 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein P337 is a P; wherein V338 is substituted with

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 51 -

either an A, I, or L; wherein L339 is substituted with either an A, I, or V;
wherein S340 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein G341 is
substituted with either an A, M, S, or T; wherein G342 is substituted with
either an A, M, S, or T; wherein Y343 is either an F, or W; wherein V344 is
5 substituted with either an A, I, or L; wherein L345 is substituted with either
an A, I, or V; wherein G346 is substituted with either an A, M, S, or T;
wherein G347 is substituted with either an A, M, S, or T; wherein G348 is
substituted with either an A, M, S, or T; wherein A349 is substituted with
either a G, I, L, M, S, T, or V; wherein I350 is substituted with either an A, V,
10 or L; wherein C351 is a C; wherein M352 is substituted with either an A, G,
S, or T; wherein E353 is substituted with a D; wherein L354 is substituted
with either an A, I, or V; wherein L355 is substituted with either an A, I, or V;
wherein T356 is substituted with either an A, G, M, or S; wherein K357 is
substituted with either a R, or H; wherein Q358 is substituted with a N;
15 wherein G359 is substituted with either an A, M, S, or T; wherein W360 is
either an F, or Y; wherein S361 is substituted with either an A, G, M, or T;
wherein S362 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein A363 is
substituted with either a G, I, L, M, S, T, or V; wherein Y364 is either an F, or
W; wherein S365 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein I366 is
20 substituted with either an A, V, or L; wherein E367 is substituted with a D;
wherein S368 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein V369 is
substituted with either an A, I, or L; wherein I370 is substituted with either an
A, V, or L; wherein M371 is substituted with either an A, G, S, or T; wherein
Q372 is substituted with a N; wherein I373 is substituted with either an A, V,
25 or L; wherein S374 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein A375
is substituted with either a G, I, L, M, S, T, or V; wherein T376 is substituted
with either an A, G, M, or S; wherein L377 is substituted with either an A, I,
or V; wherein V378 is substituted with either an A, I, or L; wherein K379 is
substituted with either a R, or H; wherein G380 is substituted with either an
30 A, M, S, or T; wherein K381 is substituted with either a R, or H; wherein
A382 is substituted with either a G, I, L, M, S, T, or V; wherein R383 is

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 52 -

substituted with either a K, or H; wherein V384 is substituted with either an A, I, or L; wherein Q385 is substituted with a N; wherein F386 is substituted with either a W, or Y; wherein G387 is substituted with either an A, M, S, or T; wherein A388 is substituted with either a G, I, L, M, S, T, or V; wherein 5 N389 is substituted with a Q; wherein K390 is substituted with either a R, or H; wherein S391 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein Q392 is substituted with a N; wherein Y393 is either an F, or W; wherein S394 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein L395 is substituted with either an A, I, or V; wherein T396 is substituted with either an A, G, M, or S; 10 wherein R397 is substituted with either a K, or H; wherein A398 is substituted with either a G, I, L, M, S, T, or V; wherein Q399 is substituted with a N; wherein Q400 is substituted with a N; wherein S401 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein Y402 is either an F, or W; wherein K403 is substituted with either a R, or H; wherein S404 is substituted with either an A, G, M, or T; wherein L405 is substituted with either an A, I, or V; 15 wherein V406 is substituted with either an A, I, or L; wherein Q407 is substituted with a N; wherein I408 is substituted with either an A, V, or L; wherein H409 is substituted with either a K, or R; wherein E410 is substituted with a D; and/or wherein K411 is substituted with either a R, or H 20 of SEQ ID NO:2 in addition to any combination thereof. Other suitable substitutions within the RATL1d6 UBC domain are encompassed by the present invention and are referenced elsewhere herein. The present invention also encompasses the use of one or more of these RATL1d6 UBC domain conservative amino acid substituted polypeptides as immunogenic 25 and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

To express a biologically active RATL1d6 polypeptide or peptide, the nucleotide sequences encoding RATL1d6 polypeptide, or functional equivalents, may be inserted into an appropriate expression vector, *i.e.*, a vector which contains the necessary elements for the 30 transcription and translation of the inserted coding sequence.

Methods which are well known to those skilled in the art may be used to construct expression vectors containing sequences encoding RATL1d6 polypeptide and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* recombinant DNA

5 techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. Such techniques are described in J. Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. and in F.M. Ausubel et al., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

10 A variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express sequences encoding RATL1d6 polypeptide. Such expression vector/host systems include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast
15 transformed with yeast expression vectors; insect cell systems infected with virus expression vectors (e.g., baculovirus); plant cell systems transformed with virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus (CaMV) and tobacco mosaic virus (TMV)), or with bacterial expression vectors (e.g., Ti or pBR322 plasmids); or animal cell systems. The host cell employed is not
20 limiting to the present invention.

"Control elements" or "regulatory sequences" are those non-translated regions of the vector, e.g., enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions, which interact with host cellular proteins to carry out
25 transcription and translation. Such elements may vary in their strength and specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, may be used. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such as the hybrid lacZ promoter of the
30 BLUESCRIPT phagemid (Stratagene, La Jolla, CA) or PSPO1 plasmid (Life Technologies), and the like, may be used. The baculovirus polyhedrin promoter may be used in insect cells. Promoters or enhancers derived from

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 54 -

the genomes of plant cells (e.g., heat shock, RUBISCO; and storage protein genes), or from plant viruses (e.g., viral promoters or leader sequences), may be cloned into the vector. In mammalian cell systems, promoters from mammalian genes or from mammalian viruses are preferred. If it is
5 necessary to generate a cell line that contains multiple copies of the sequence encoding RATL1d6, vectors based on SV40 or EBV may be used with an appropriate selectable marker.

In bacterial systems, a number of expression vectors may be selected, depending upon the use intended for the expressed RATL1d6
10 product. For example, when large quantities of expressed protein are needed for the induction of antibodies, vectors which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified may be used. Such vectors include, but are not limited to, the multifunctional *E. coli* cloning and expression vectors such as BLUESCRIPT (Stratagene), in which the
15 sequence encoding RATL1d6 polypeptide may be ligated into the vector in-frame with sequences for the amino-terminal Met and the subsequent 7 residues of β -galactosidase, so that a hybrid protein is produced; pIN vectors (See, G. Van Heeke and S.M. Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.*, 264:5503-5509); and the like. pGEX vectors (Promega, Madison, WI) may
20 also be used to express foreign polypeptides, as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can be easily purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. Proteins made in such systems may be designed to include
25 heparin, thrombin, or factor XA protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety at will.

In the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH may be used. (For reviews, see F.M. Ausubel et al.,
30 *supra*, and Grant et al., 1987, *Methods Enzymol.*, 153:516-544).

Should plant expression vectors be desired and used, the expression of sequences encoding RATL1d6 polypeptide may be driven by any of a number of promoters. For example, viral promoters such as the 35S and 19S promoters of CaMV may be used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (N. Takamatsu, 1987, *EMBO J.*, 6:307-311). Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO, or heat shock promoters, may be used (G. Coruzzi et al., 1984, *EMBO J.*, 3:1671-1680; R. Broglie et al., 1984, *Science*, 224:838-843; and J. Winter 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. Such techniques are described in a number of generally available reviews (See, for example, S. Hobbs or L.E. Murry, In: McGraw Hill *Yearbook of Science and Technology* (1992) McGraw Hill, New York, N.Y.; pp. 191-196).

An insect system may also be used to express RATL1d6 polypeptide. For example, in one such system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes in *Spodoptera frugiperda* cells or in *Trichoplusia* larvae. The sequences encoding RATL1d6 polypeptide may be cloned into a non-essential region of the virus such as the polyhedrin gene and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of RATL1d6 polypeptide will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus lacking coat protein. The recombinant viruses may then be used to infect, for example, *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which the RATL1d6 polypeptide product may be expressed (E.K. Engelhard et al., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 91:3224-3227).

In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding RATL1d6 polypeptide may be ligated into an adenovirus transcription/translation complex containing 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 a viable virus which is capable of expressing RATL1d6 polypeptide in infected host cells (J. Logan and T. Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 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.

5 Specific initiation signals may also be used to achieve more efficient translation of sequences encoding RATL1d6 polypeptide. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding RATL1d6 polypeptide, its initiation codon, and upstream 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 the ATG initiation codon, should be provided. Furthermore, the initiation codon should be in the correct reading frame to ensure translation of the entire insert.

10 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 which are appropriate for the particular cell system that is used, such as those described in the literature (D. Scharf et al., 1994, *Results Probl. Cell Differ.*, 20:125-162).

Moreover, a host cell strain may be chosen for its ability to modulate the 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" form of the protein may also be used to facilitate correct insertion, folding and/or function. Different host cells having specific cellular machinery and characteristic mechanisms for such post-translational activities (e.g., CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and W138) are available from the American Type Culture Collection (ATCC), American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA

25
30

20110-2209, and may be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express
5 RATL1d8 protein may be transformed 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 1-2
10 days in an enriched cell culture medium before they are switched to selective medium. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows the growth and recovery of cells which successfully express the introduced sequences. Resistant clones of stably transformed cells may be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

15 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 (HSV TK), (M. Wigler et al., 1977, *Cell*, 11:223-32) and adenine phosphoribosyltransferase (I. Lowy et al., 1980, *Cell*, 22:817-23) genes which can be employed in tk⁻ or apt⁻ cells,
20 respectively. Also, anti-metabolite, antibiotic or herbicide resistance can be used as the basis for selection; for example, dhfr, which confers resistance to methotrexate (M. Wigler et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:3567-70); npt, which confers resistance to the aminoglycosides neomycin and G-418 (F. Colbere-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.*, 150:1-14); and als or pat,
25 which confer resistance to chlorsulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively (Murry, *supra*). Additional selectable genes have been described, for example, trpB, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or hisD, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (S.C. Hartman and R.C. Mulligan, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.*,
30 85:8047-51). Recently, the use of visible markers has gained popularity with such markers as the anthocyanins, β -glucuronidase and its substrate GUS,

and luciferase and its substrate luciferin, which are widely used not only to identify transformants, but also to quantify the amount of transient or stable protein expression that is attributable to a specific vector system (C.A. Rhodes et al., 1995, *Methods Mol. Biol.*, 55:121-131).

5 Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, the presence and expression of the desired gene of interest may need to be confirmed. For example, if the nucleic acid sequence encoding RATL1d6 polypeptide is inserted within a marker gene sequence, recombinant cells containing
10 sequences encoding RATL1d6 polypeptide can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding RATL1d76 polypeptide under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates co-expression of the tandem gene.

15 Alternatively, host cells which contain the nucleic acid sequence encoding RATL1d6 polypeptide and which express RATL1d6 polypeptide product may be identified by a variety of procedures known to those having skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations and protein bioassay or
20 immunoassay techniques, including membrane, solution, or chip based technologies, for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein.

 The presence of polynucleotide sequences encoding RATL1d6 polypeptide can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridization, or by
25 amplification using probes or portions or fragments of polynucleotides encoding RATL1d6 polypeptide. Nucleic acid amplification based assays involve the use of oligonucleotides or oligomers, based on the sequences encoding RATL1d6 polypeptide, to detect transformants containing DNA or RNA encoding RATL1d6 polypeptide.

30 A wide variety of labels and conjugation techniques are known and employed by those skilled in the art and may be used in various nucleic

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 59 -

acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding RATL1d6 polypeptide include oligo-labeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequences encoding RATL1d6 polypeptide, or any portions or 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 SP(6) and labeled nucleotides. These procedures may be conducted using a variety of commercially available kits (e.g., Amersham Pharmacia Biotech, Promega and U.S. Biochemical Corp.). Suitable reporter molecules or labels which may be used 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 RATL1d6 protein, or fragments thereof, may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The protein produced by a recombinant cell may be secreted or contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those having skill in the art, expression vectors containing polynucleotides which encode RATL1d6 protein may be designed to contain signal sequences which direct secretion of the RATL1d6 protein through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane. Other constructions may be used to join nucleic acid sequences encoding RATL1d6 protein to nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals; protein A domains that allow purification on immobilized immunoglobulin; and the domain utilized in the FLAGS extension/affinity purification system (Immunex Corp., Seattle, WA).

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 60 -

The inclusion of cleavable linker sequences such as those specific for Factor XA or enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA) between the purification domain and RATL1d6 protein may be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein containing RATL1d6 and a nucleic acid encoding 6 histidine residues preceding a thioredoxin or an enterokinase cleavage site. The histidine residues facilitate purification on IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography) as described by J. Porath et al., 1992, *Prot. Exp. Purif.*, 3:263-281, while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying from the fusion protein. For a discussion of suitable vectors for fusion protein production, see D.J. Kroll et al., 1993, *DNA Cell Biol.*, 12:441-453.

In addition to recombinant production, fragments of RATL1d6 polypeptide may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (J. Merrifield, 1963, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154). Protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be achieved, for example, using ABI 431A Peptide Synthesizer (PE Biosystems). Various fragments of RATL1d6 polypeptide can be chemically synthesized separately and then combined using chemical methods to produce the full length molecule.

Human artificial chromosomes (HACs) may be used to deliver larger fragments of DNA than can be contained and expressed in a plasmid vector. HACs are linear microchromosomes which may contain DNA sequences of 10K to 10M in size, and contain all of the elements that are required for stable mitotic chromosome segregation and maintenance (See, J.J. Harrington et al., 1997, *Nature Genet.*, 15:345-355). HACs of 6 to 10M are constructed and delivered via conventional delivery methods (e.g., liposomes, polycationic amino polymers, or vesicles) for therapeutic purposes.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of RATL1d6 polypeptide using either polyclonal or monoclonal

antibodies specific for the protein are known and practiced in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive with two non-interfering epitopes on the RATL1d6 polypeptide is preferred, but a competitive binding assay may also be employed. These and other assays are described in the art as represented by the publication of R. Hampton et al., 1990; *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, MN and D.E. Maddox et al., 1983; *J. Exp. Med.*, 158:1211-1216).

Transmembrane domain Regions

The RATL1d6 polypeptide was determined to comprise two transmembrane domains, one located from about amino acid 69 to about amino acid 88, and the other located from about amino acid 334 to about amino acid 356 of SEQ ID NO:2. In this context, the term "about" can be construed to mean 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 amino acids beyond the N-terminus and/or C-terminus of the above referenced transmembrane domain polypeptides. The TMPRED program was used for transmembrane prediction (K Hofmann and W Stoffel, 1993, *Biol. Chem.*, 347:166).

In a preferred embodiment, the following transmembrane domain polypeptide is encompassed by the present invention:
PHLPPRGSVPGDPVRIHCNITESYPVAVPPIWVSVESDDPNLAAVLERLVDIKK
GNTLLQHLKRIISDLCKLYNLPQHPDVEMLDQPLPAEQCTQEDVSSDED
EEMPEDTEDLDHYEMKEEPAEGKKSDEDDGIGKENLAILEKIKKNQRQDYL
NGAVSGSVQATDRLMKELRDIYRSQSFKGGNYAVELVNDVNDVWNVKLLK
VDQDSALHNDLQILKEGADGADFNFSFKDNFPDFPFVFR (SEQ ID
NO:17). Polynucleotides encoding this polypeptide is also provided. The present invention also encompasses the use of the RATL1d6 transmembrane domain polypeptide as an immunogenic and/or antigenic epitope, or the source of such epitopes, as described elsewhere herein.

In preferred embodiments, the following N-terminal RATL1d6 inter-transmembrane domain deletion polypeptides are encompassed by the present invention: P1-R245, H2-R245, L3-R245, P4-R245, P5-R245, R6-R245, G7-R245, S8-R245, V9-R245, P10-R245, G11-R245, D12-R245, 5 P13-R245, V14-R245, R15-R245, I16-R245, H17-R245, C18-R245, N19-R245, I20-R245, T21-R245, E22-R245, S23-R245, Y24-R245, P25-R245, A26-R245, V27-R245, P28-R245, P29-R245, I30-R245, W31-R245, S32-R245, V33-R245, E34-R245, S35-R245, D36-R245, D37-R245, P38-R245, N39-R245, L40-R245, A41-R245, A42-R245, V43-R245, L44-R245, E45-R245, 10 R245, R46-R245, L47-R245, V48-R245, D49-R245, I50-R245, K51-R245, K52-R245, G53-R245, N54-R245, T55-R245, L56-R245, L57-R245, L58-R245, Q59-R245, H60-R245, L61-R245, K62-R245, R63-R245, I64-R245, I65-R245, S66-R245, D67-R245, L68-R245, C69-R245, K70-R245, L71-R245, Y72-R245, N73-R245, L74-R245, P75-R245, Q76-R245, H77-R245, 15 P78-R245, D79-R245, V80-R245, E81-R245, M82-R245, L83-R245, D84-R245, Q85-R245, P86-R245, L87-R245, P88-R245, A89-R245, E90-R245, Q91-R245, C92-R245, T93-R245, Q94-R245, E95-R245, D96-R245, V97-R245, S98-R245, S99-R245, E100-R245, D101-R245, E102-R245, D103-R245, E104-R245, E105-R245, M106-R245, P107-R245, E108-R245, 20 D109-R245, T110-R245, E111-R245, D112-R245, L113-R245, D114-R245, H115-R245, Y116-R245, E117-R245, M118-R245, K119-R245, E120-R245, E121-R245, E122-R245, P123-R245, A124-R245, E125-R245, G126-R245, K127-R245, K128-R245, S129-R245, E130-R245, D131-R245, D132-R245, G133-R245, I134-R245, G135-R245, K136-R245, E137-R245, N138-R245, 25 L139-R245, A140-R245, I141-R245, L142-R245, E143-R245, K144-R245, I145-R245, K146-R245, K147-R245, N148-R245, Q149-R245, R150-R245, Q151-R245, D152-R245, Y153-R245, L154-R245, N155-R245, G156-R245, A157-R245, V158-R245, S159-R245, G160-R245, S161-R245, V162-R245, Q163-R245, A164-R245, T165-R245, D166-R245, R167-R245, L168-R245, 30 M169-R245, K170-R245, E171-R245, L172-R245, R173-R245, D174-R245, I175-R245, Y176-R245, R177-R245, S178-R245, Q179-R245, S180-R245,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 63 -

F181-R245, K182-R245, G183-R245, G184-R245, N185-R245, Y186-R245, A187-R245, V188-R245, E189-R245, L190-R245, V191-R245, N192-R245, D193-R245, S194-R245, L195-R245, Y196-R245, D197-R245, W198-R245, N199-R245, V200-R245, K201-R245, L202-R245, L203-R245, K204-R245, 5 V205-R245, D206-R245, Q207-R245, D208-R245, S209-R245, A210-R245, L211-R245, H212-R245, N213-R245, D214-R245, L215-R245, Q216-R245, I217-R245, L218-R245, K219-R245, E220-R245, K221-R245, E222-R245, G223-R245, A224-R245, D225-R245, F226-R245, I227-R245, L228-R245, L229-R245, N230-R245, F231-R245, S232-R245, F233-R245, K234-R245, 10 D235-R245, N236-R245, F237-R245, P238-R245, and/or F239-R245 of SEQ ID NO:2. Polynucleotide sequences encoding these polypeptides are also provided. The present invention also encompasses the use of these N-terminal RATL1d6 inter-transmembrane domain deletion polypeptides as immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

15 In other preferred embodiments, the following C-terminal RATL1d6 inter-transmembrane domain deletion polypeptides are encompassed by the present invention: P1-R245, P1-V244, P1-F243, P1-P242, P1-P241, P1-D240, P1-F239, P1-P238, P1-F237, P1-N236, P1-D235, P1-K234, P1-F233, P1-S232, P1-F231, P1-N230, P1-L229, P1-L228, P1- 20 I227, P1-F226, P1-D225, P1-A224, P1-G223, P1-E222, P1-K221, P1-E220, P1-K219, P1-L218, P1-I217, P1-Q216, P1-L215, P1-D214, P1-N213, P1-H212, P1-L211, P1-A210, P1-S209, P1-D208, P1-Q207, P1-D206, P1-V205, P1-K204, P1-L203, P1-L202, P1-K201, P1-V200, P1-N199, P1-W198, P1-D197, P1-Y196, P1-L195, P1-S194, P1-D193, P1-N192, P1-V191, P1- 25 L190, P1-E189, P1-V188, P1-A187, P1-Y186, P1-N185, P1-G184, P1-G183, P1-K182, P1-F181, P1-S180, P1-Q179, P1-S178, P1-R177, P1-Y176, P1-I175, P1-D174, P1-R173, P1-L172, P1-E171, P1-K170, P1-M169, P1-L168, P1-R167, P1-D166, P1-T165, P1-A164, P1-Q163, P1-V162, P1-S161, P1-G160, P1-S159, P1-V158, P1-A157, P1-G156, P1-N155, P1- 30 L154, P1-Y153, P1-D152, P1-Q151, P1-R150, P1-Q149, P1-N148, P1-K147, P1-K146, P1-I145, P1-K144, P1-E143, P1-L142, P1-I141, P1-A140,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 64 -

P1-L139, P1-N138, P1-E137, P1-K136, P1-G135, P1-H134, P1-G133, P1-D132, P1-D131, P1-E130, P1-S129, P1-K128, P1-K127, P1-G126, P1-E125, P1-A124, P1-P123, P1-E122, P1-E121, P1-E120, P1-K119, P1-M118, P1-E117, P1-Y116, P1-H115, P1-D114, P1-L113, P1-D112, P1-E111, P1-T110, P1-D109, P1-E108, P1-P107, P1-M106, P1-E105, P1-E104, P1-D103, P1-E102, P1-D101, P1-E100, P1-S99, P1-S98, P1-V97, P1-D96, P1-E95, P1-Q94, P1-T93, P1-C92, P1-Q91, P1-E90, P1-A89, P1-P88, P1-L87, P1-P86, P1-Q85, P1-D84, P1-L83, P1-M82, P1-E81, P1-V80, P1-D79, P1-P78, P1-H77, P1-Q76, P1-P75, P1-L74, P1-N73, P1-Y72, P1-L71, P1-K70, P1-C69, P1-L68, P1-D67, P1-S66, P1-I65, P1-I64, P1-R63, P1-K62, P1-L61, P1-H60, P1-Q59, P1-L58, P1-L57, P1-L56, P1-T55, P1-N54, P1-G53, P1-K52, P1-K51, P1-I50, P1-D49, P1-V48, P1-L47, P1-R46, P1-E45, P1-L44, P1-V43, P1-A42, P1-A41, P1-L40, P1-N39, P1-P38, P1-D37, P1-D36, P1-S35, P1-E34, P1-V33, P1-S32, P1-W31, P1-I30, P1-P29, P1-P28, P1-V27, P1-A26, P1-P25, P1-Y24, P1-S23, P1-E22, P1-T21, P1-I20, P1-N19, P1-C18, P1-H17, P1-I16, P1-R15, P1-V14, P1-P13, P1-D12, P1-G11, P1-P10, P1-V9, P1-S8, and/or P1-G7 of SEQ ID NO:2.

Polynucleotide sequences encoding these polypeptides are also provided.

The present invention also encompasses the use of these C-terminal

20 RATL1d6 inter-transmembrane domain deletion polypeptides as immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

Therapeutics

RATL1d6 polypeptide shares homology with known ubiquitin conjugating enzymes and is thus provided as a new member of the UBC protein family. Because RATL1d6 was expressed in and isolated from activated T lymphocytes, the RATL1d6 product may play a role in immune disorders, e.g., lymphoproliferative disease, for example, in cell cycle regulation, and/or in cell signaling. In a manner similar to that of other ubiquitin conjugating enzyme family members, the RATL1d6 protein may be further involved in neoplastic, developmental and neuronal disorders, where 30 it may also be associated with cell cycle and cell signaling activities, as

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 65 -

described further below. With specific regard to lymphoproliferative diseases and inflammation, inhibitors of the RATL1d6 protein may play a role as immunosuppressive agents, for example, by preventing entry of lymphocytic cells into the cell cycle, or by blocking intracellular signaling events. In addition, RATL1d6 inhibitors may serve as anti-inflammatory drugs.

Degradation of tumor suppressor proteins, such as p53, by E2 enzymes may contribute to the development of neoplastic disorders. Thus, in one embodiment of the present invention, an antagonist or inhibitor of RATL1d6 polypeptide may be administered to an individual to prevent or treat a neoplastic disorder. Such disorders may include, but are not limited to, adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, melanoma, myeloma, sarcoma, and teratocarcinoma, and particularly, 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. In cancers or tumors of the above-origins, blocking ubiquitination might prolong the half-life, and therefore the function, of p53. In a related aspect, an antibody which specifically binds to RATL1d6 may be used directly as an antagonist or indirectly as a targeting or delivery mechanism for bringing a pharmaceutical agent to cells or tissue which express RATL1d6 polypeptide.

In a related embodiment, an inhibitor of RATL1d6 function may be useful as an anti-cancer drug or agent with particular regard to the treatment of lymphoproliferative diseases, or as an immunosuppressive drug by functioning as a dominant negative to a UBC such as the RATL1d6 protein product, in a manner similar to the tumor susceptibility gene TSG101, which has been found to be mutated at a high frequency in human breast cancers. (C.P. Ponting et al., 1997, *J. Mol. Med.*, 75:467-469; L. Li et al., 1997, *Cell*, 88:143-154). TSG101 has been implicated as a tumor suppressor gene, encoding a product having homology to ubiquitin

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 66 -

conjugating enzymes, but lacking the conserved cysteine that is typically present in E2 proteins and is necessary for enzyme function. (C.P. Ponting et al., *supra*). TSG101 has also been reported to function as a dominant negative regulator of the ubiquitination of short-lived proteins (C.P. Ponting et al., *supra* and E.V. Koonin and R.A. Abagyan, 1997, *Nature Genetics*, 16:330-331). Accordingly, an antagonist of certain UBCs, such as RATL1d6 of the present invention, may also act in a manner similar to that of the TSG101 product and be utilized in the treatment of cancers, including T-cell and B-cell lymphoproliferative disorders and/or as an agent to suppress adverse immune system reactions.

That RATL1d6 plays a negative role in the NF- κ B pathway, a pathway of key importance in innate immunity, suggests that antagonists of this gene product could activate innate immunity. Innate immunity is the first line of defense against microbial pathogens including bacteria, fungi, viruses, etc. The cells of the immune system which are responsible for innate immunity are primarily macrophages/monocytes, and to a limited extent, neutrophils. Without wishing to be bound by theory, it is believed that antagonists of RATL1d6 could enhance the innate immune response and provide protection from invading pathogens in humans. In contrast, agonists of RATL1d6 would be expected to inhibit the NF- κ B pathway and attenuate an inflammatory response. Hence, agonists of RATL1d6 may be useful in the treatment of inflammatory diseases including rheumatoid arthritis, asthma, multiple sclerosis, osteoarthritis, among others.

Since RATL1d6 was identified in a T-cell library, this suggests that the gene product may play a role in modulating an adaptive immune response, as well. Adaptive immune responses are primarily mediated by T-cells and require the processing and display of foreign, and in the case of autoimmune disease, native antigens. T-cell mediated responses are important in developing immunity after vaccination and also in eliminating tumor cells. Thus, it would be predicted that antagonists of RATL1d6 may enhance a person's immunity after vaccination. The RATL1d6 gene or gene

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 67 -

product may also stimulate immune an immune response to tumors. In contrast, agonists of this gene could be useful for treating T-cell mediated autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, psoriasis, among others.

5 The RATL1d6 protein, or functional portion thereof, can be employed in a method of suppressing the immune response in a patient, preferably human, who requires immunosuppression. For example, an antagonist or agonist can be administered to the patient in an amount effective to modulate the activity of the RATL1d6 protein, or portion thereof, thereby causing an immunosuppressive effect. In the case of agonists or
10 activators of RATL1d6 activity, immunosuppression may be caused by ubiquitination of a cell receptor, preferably a T cell receptor, or component, or interactive component thereof, and subsequent down regulation of the receptor activity.

15 Abnormalities in processing of neural proteins (AP) by enzymes of the UCS may contribute to the cause of neuronal disorders. Since UCS are found in neuronal tissues, the RATL1d6 polypeptide, which appears to be a member of the family of proteins involved in UCS dependent proteolysis, may be affected, for example, by an antagonist of
20 the RATL1d6 polypeptide. Accordingly, a RATL1d6 polypeptide antagonist may be administered to a subject to prevent or treat a neuronal disorder. Such disorders may include, but are not limited to, akathisia, Alzheimer's disease, amnesia, amyotrophic lateral sclerosis, bipolar disorder, catatonia, cerebral neoplasms, dementia, depression, Down's syndrome, tardive
25 dyskinesia, dystonias, epilepsy, Huntington's disease, multiple sclerosis, Parkinson's disease, paranoid psychoses, schizophrenia, and Tourette's disorder.

 In a preferred embodiment of the present invention, an antagonist or inhibitory agent of the RATL1d6 polypeptide may be
30 administered to an individual to prevent or treat an immune disorder, or an immune-related disorder. Such disorders may include, but are not limited to,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 68 -

AIDS, Addison's disease, adult respiratory distress syndrome, allergies, anemia, asthma, atherosclerosis, bronchitis, cholecystitis, Crohn's disease, ulcerative colitis, atopic dermatitis, dermatomyositis, diabetes mellitus, emphysema, erythema nodosum, atrophic gastritis, glomerulonephritis, 5 gout, Graves' disease, hypereosinophilia, irritable bowel syndrome, lupus erythematosus, multiple sclerosis, myasthenia gravis, myocardial or pericardial inflammation, osteoarthritis, osteoporosis, pancreatitis, polymyositis, rheumatoid arthritis, scleroderma, Sjogren's syndrome, and autoimmune thyroiditis; complications of cancer, hemodialysis, 10 extracorporeal circulation; viral, bacterial, fungal, parasitic, protozoal, and helminthic infections and trauma. RATL1d6 inhibitors or antagonists may be utilized to prevent graft rejection, such as in solid organ or bone marrow transplants; or to prevent graft-versus-host disease following bone marrow transplantation.

15 In another embodiment of the present invention, an antagonist of RATL1d6 polypeptide may be administered to an individual in need thereof to prevent or treat a developmental disorder. Such disorders include, but are not limited to, renal tubular acidosis, Cushing's syndrome, achondroplastic dwarfism, Duchenne and Becker muscular dystrophy, 20 gonadal dysgenesis, myelodysplastic syndrome, hereditary mucoepithelial dysplasia, hereditary keratodermas, hereditary neuropathies, such as Charcot-Marie-Tooth disease and neurofibromatosis, hypothyroidism, hydrocephalus, seizure disorders such as Sydenham's chorea and cerebral palsy, spina bifida, and congenital glaucoma, cataract, or 25 sensorineural hearing loss.

In another embodiment of the present invention, an expression vector containing the complement of the polynucleotide encoding RATL1d6 polypeptide may be administered to an individual to treat or prevent a neoplastic disorder, including, but not limited to, the types of cancers and 30 tumors described above.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 69 -

In another embodiment of the present invention, an expression vector containing the complement of the polynucleotide encoding RATL1d6 polypeptide may be administered to an individual to treat or prevent a neuronal disorder, including, but not limited to, the types of disorders described above.

In yet another embodiment of the present invention, an expression vector containing the complement of the polynucleotide encoding RATL1d6 polypeptide may be administered to an individual to treat or prevent an immune disorder, including, but not limited to, the types of immune disorders described above.

In a further embodiment of the present invention, an expression vector harboring the complement of the polynucleotide encoding RATL1d6 polypeptide may be administered to an individual to treat or prevent a developmental disorder, including, but not limited to, the types of disorders described above.

In another embodiment, the proteins, antagonists, antibodies, agonists, complementary sequences, or vectors of the present invention can 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.

Antagonists or inhibitors of the RATL1d6 polypeptide of the present invention may be produced using methods which are generally known in the art. In particular, purified RATL1d6 protein, or fragments thereof, can be used to produce antibodies, or to screen libraries of pharmaceutical agents, to identify those which specifically bind RATL1d6.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 70 -

such as via high throughput screening techniques known and practiced in the art.

Antibodies specific for RATL1d6 polypeptide, or immunogenic peptide fragments thereof, can be generated using methods that have long been known and conventionally practiced in the art. Such antibodies may include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and fragments produced by an Fab expression library. Neutralizing antibodies, (i.e., those which inhibit dimer formation) are especially preferred for therapeutic use. For polyclonal and/or monoclonal anti-RATL1d6 antibody production, the full-length RATL1d6 polypeptide can be utilized as an immunogen; alternatively, portions of the full-length polypeptide can be employed. Preferably, portions of the RATL1d6 polypeptide employed as immunogens include a portion that contains a domain, for example, the UBC (e.g., residues 246-422) or non-UBC (e.g., residues 1-245) domains of the protein.

For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, sheep, rats, mice, humans, and others, can be immunized by injection with RATL1d6 polypeptide, or any fragment or oligopeptide thereof, which has immunogenic properties. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase the immunological response. Nonlimiting examples of suitable adjuvants include Freund's (complete or incomplete), RIBI, mineral gels such as aluminum hydroxide or silica, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, KLH, and dinitrophenol. Adjuvants typically used in humans include BCG (bacilli Calmette Guérin) and *Corynebacterium parvum*.

Preferably, the peptides, fragments, or oligopeptides used to induce antibodies to RATL1d6 polypeptide (i.e., immunogens) have an amino acid sequence having at least five amino acids, and more preferably, at least 7-10 amino acids. It is also preferable that the immunogens are identical to a portion of the amino acid sequence of the natural protein; they

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 71 -

may also contain the entire amino acid sequence of a small, naturally occurring molecule. The peptides, fragments or oligopeptides may comprise a single epitope or antigenic determinant or multiple epitopes. Short stretches of RATL1d6 amino acids may be fused, or covalently attached, to those of another protein, such as KLH, and antibodies are produced against the chimeric molecule.

5
10
15
20
25
30

Monoclonal antibodies to RATL1d6 polypeptide, or immunogenic fragments thereof, 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 (G. Kohler et al., 1975, *Nature*, 256:495-497; D. Kozbor et al., 1985, *J. Immunol. Methods*, 81:31-42; R.J. Cote et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2026-2030; and S.P. Cole et al., 1984, *Mol. Cell Biol.*, 4:109-120). The production of monoclonal antibodies is well known and routinely used in the art.

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (S.L. Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855; M.S. Neuberger et al., 1984, *Nature*, 312:604-608; and S. Takeda 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 RATL1d6 polypeptide-specific single chain antibodies. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, may be generated by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries (D.R. Burton, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:11120-3). Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as

disclosed in the literature (R. Orlandi et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3833-3837 and G. Winter et al., 1991, *Nature*, 349:293-299).

Antibody fragments which contain specific binding sites for RATL1d6 polypeptide may also be generated. For example, such fragments
5 include, but are not limited to, F(ab')₂ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and Fab fragments which can be 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
10 (W.D. Huse et al., 1989, *Science*, 254:1275-1281).

Various immunoassays can 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
15 art. Such immunoassays typically involve measuring the formation of complexes between RATL1d6 polypeptide and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive with two non-interfering RATL1d6 polypeptide epitopes is preferred, but a competitive binding assay may also be employed (Maddox, *supra*).

In an embodiment of the present invention, the polynucleotide encoding RATL1d6 polypeptide, or any fragment or complement thereof, may be used for therapeutic purposes. In one aspect, antisense to the polynucleotide encoding RATL1d6 polypeptide may be used in situations in
20 which it would be desirable to block translation of mRNA, due, at least in some instances, to degradation of mRNA. In particular, cells may be transformed with sequences complementary to polynucleotides encoding RATL1d6 polypeptide. Thus, complementary molecules may be used to modulate RATL1d6 polynucleotide and polypeptide activity, or to achieve regulation of gene function. Such technology is now well known in the art,
25 and sense or antisense oligomers or oligonucleotides, or larger fragments,
30

can be designed from various locations along the coding or control regions of polynucleotide sequences encoding RATL1d6 polypeptide.

Expression vectors derived from retroviruses, adenovirus, herpes or vaccinia viruses, or from various bacterial plasmids may be used
5 for delivery of nucleotide sequences to the targeted organ, tissue or cell population. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct recombinant vectors which will express nucleic acid sequence that is complementary to the nucleic acid sequence encoding
10 RATL1d6 polypeptide. These techniques are described both in J. Sambrook et al., *supra* and in F.M. Ausubel et al., *supra*.

The genes encoding the RATL1d6 polypeptide can be turned off by transforming a cell or tissue with an expression vector that expresses high levels of a RATL1d6 polypeptide-encoding polynucleotide, or a
15 fragment thereof. Such constructs may be used to introduce untranslatable sense or antisense sequences into a cell. Even in the absence of integration into the DNA, such vectors may continue to transcribe RNA molecules until they are disabled by endogenous nucleases. Transient expression may last for a month or more with a non-replicating vector, and even longer if appropriate replication elements are designed to be part of the
20 vector system.

Modifications of gene expression can be obtained by designing antisense molecules or complementary nucleic acid sequences (DNA, RNA, or PNA), to the control, 5', or regulatory regions of the gene encoding
25 RATL1d6 polypeptide, (e.g., signal sequence, promoters, enhancers, and introns). Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, e.g., between positions -10 and +10 from the start site, are preferred. 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
30 factors, or regulatory molecules. Recent therapeutic advances using triplex DNA have been described (See, for example, J.E. Gee et al., 1994, In: B.E.

Huber and B.I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY). The antisense molecule or complementary sequence may also be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes, or by causing the degradation of
5 the transcripts.

Ribozymes, i.e., 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. Suitable
10 examples include engineered hammerhead motif ribozyme molecules that can specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of sequences encoding RATL1d6 polypeptide.

Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme
15 cleavage sites which include 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
20 may also be evaluated by testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays.

Complementary ribonucleic acid molecules and ribozymes according to the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of nucleic acid molecules. Such methods include
25 techniques for chemically synthesizing oligonucleotides, for example, solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by *in vitro* and *in vivo* transcription of DNA sequences encoding RATL1d6. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors with suitable RNA polymerase promoters such as T7 or
30 SP. Alternatively, the cDNA constructs that constitutively or inducibly

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 75 -

synthesize complementary RNA 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.

Many methods for introducing vectors into cells or tissues are available and are 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 and by liposome injections may be achieved using methods which are well known in the art.

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

A further embodiment of the present invention embraces the administration of a pharmaceutical composition, in conjunction with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient, for any of the above-described therapeutic uses and effects. Such pharmaceutical compositions may comprise RATL1d6 nucleic acid, polypeptide, or peptides, antibodies to RATL1d6 polypeptide, mimetics, agonists, antagonists, or inhibitors of RATL1d6 polypeptide or polynucleotide. The compositions may be administered alone or in combination with at least one other agent, such as a stabilizing compound, which may be administered in any sterile,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 76 -

biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited to, saline, buffered saline, dextrose, and water. The compositions may be administered to a patient alone, or in combination with other agents, drugs, hormones, or biological response modifiers.

5 The pharmaceutical compositions for use in the present invention can be administered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal, intraventricular, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, enteral, topical, sublingual, vaginal, or rectal means.

10 In addition to the active ingredients (i.e., the RATL1d6 nucleic acid or polypeptide, or functional fragments thereof), the pharmaceutical compositions may contain suitable pharmaceutically acceptable carriers or excipients comprising auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Further
15 details on techniques for formulation and administration are provided in the latest edition of *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

Pharmaceutical compositions for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art
20 in dosages suitable for oral administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for ingestion by the patient.

Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained by
25 the combination of active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are carbohydrate or protein fillers, such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; starch from corn, wheat, rice, potato,
30 or other plants; cellulose, such as methyl cellulose, hydroxypropyl-methylcellulose, or sodium carboxymethylcellulose; gums, including arabic

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 77 -

and tragacanth, and proteins such as gelatin and collagen. If desired, disintegrating or solubilizing agents may be added, such as cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, alginic acid, or a physiologically acceptable salt thereof, such as sodium alginate.

5 Dragee cores may be used in conjunction with physiologically suitable coatings, such as concentrated sugar solutions, which may also contain gum arabic, talc, polyvinylpyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments may be added to the
10 tablets or dragee coatings for product identification, or to characterize the quantity of active compound, i.e., dosage.

Pharmaceutical preparations which can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a coating, such as glycerol or sorbitol. Push-fit capsules can
15 contain active ingredients mixed with a filler or binders, such as lactose or starches, lubricants, such as talc or magnesium stearate, and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds may be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

20 Pharmaceutical formulations suitable for parenteral administration may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks' solution, Ringer's solution, or physiologically buffered saline. Aqueous injection suspensions may contain substances which increase the viscosity of the suspension,
25 such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. In addition, suspensions of the active compounds may be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyloleate or triglycerides, or liposomes. Optionally, the suspension may also contain
30 suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 78 -

For topical or nasal administration, penetrants or permeation agents that are appropriate to the particular barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

The pharmaceutical compositions of the present invention may
5 be manufactured in a manner that is known in the art, e.g., by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes.

The pharmaceutical composition may be provided as a salt and can be formed with many acids, including but not limited to,
10 hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, and the like. Salts tend to be more soluble in aqueous solvents, or other protonic solvents, than are the corresponding free base forms. In other cases, the preferred preparation may be a lyophilized powder which may contain any or all of the following: 1-50 mM histidine, 0.1%-2% sucrose, and 2-7%
15 mannitol, at a pH range of 4.5 to 5.5, combined with a buffer prior to use. After the pharmaceutical compositions have been prepared, they can be placed in an appropriate container and labeled for treatment of an indicated condition. For administration of RATL1d6 product, such labeling would include amount, frequency, and method of administration.

20 Pharmaceutical compositions suitable for use in the present invention include compositions wherein the active ingredients are contained in an effective amount to achieve the intended purpose. The determination of an effective dose or amount is well within the capability of those skilled in the art. For any compound, the therapeutically effective dose can be
25 estimated initially either in cell culture assays, e.g., using neoplastic cells, or in animal models, usually mice, rabbits, dogs, or pigs. The animal model may also be used to determine the appropriate concentration range and route of administration. Such information can then be used and extrapolated to determine useful doses and routes for administration in
30 humans.

A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient, for example, RATL1d6 polypeptide, or fragments thereof, antibodies to RATL1d6 polypeptide, agonists, antagonists or inhibitors of RATL1d6 polypeptide, which ameliorates, reduces, or eliminates the symptoms or condition. Therapeutic efficacy and toxicity may be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population). The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, which can be expressed as the ratio, LD₅₀/ED₅₀. Pharmaceutical compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies are used in determining a range of dosages for human use. Preferred dosage contained in a pharmaceutical composition is within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, sensitivity of the patient, and the route of administration.

The exact dosage will be determined by the practitioner, who will consider the factors related to the individual 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 individual's disease state, general health of the patient, age, weight, and gender of the patient, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. As a general guide, long-acting pharmaceutical compositions may be administered every 3 to 4 days, every week, or once every two weeks, depending on half-life and clearance rate of the particular formulation.

Normal dosage amounts may vary from 0.1 to 100,000 micrograms (μg), up to a total dose of about 1 gram (g), depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 80 -

delivery is provided in the literature and is 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, 5 locations, and the like.

In another embodiment of the present invention, antibodies which specifically bind to the RATL1d6 polypeptide may be used for the diagnosis of conditions or diseases characterized by expression (or overexpression) of RATL1d6 polynucleotide or polypeptide, or in assays to 10 monitor patients being treated with RATL1d6 polypeptide, or its agonists, antagonists, or inhibitors. The antibodies useful for diagnostic purposes may be prepared in the same manner as those described above for use in therapeutic methods. Diagnostic assays for RATL1d6 polypeptide include methods which utilize the antibody and a label to detect the protein in 15 human body fluids or extracts of cells or tissues. The antibodies may be used with or without modification, and may be labeled by joining them, either covalently or non-covalently, with a reporter molecule. A wide variety of reporter molecules which are known in the art may be used, several of which are described above.

Several assay protocols including ELISA, RIA, and FACS for 20 measuring RATL1d6 polypeptide are known in the art and provide a basis for diagnosing altered or abnormal levels of RATL1d6 polypeptide expression. Normal or standard values for RATL1d6 polypeptide expression are established by combining body fluids or cell extracts taken from normal 25 mammalian subjects, preferably human, with antibody to RATL1d6 polypeptide under conditions suitable for complex formation. The amount of standard complex formation may be quantified by various methods; photometric means are preferred. Quantities of RATL1d6 polypeptide expressed in subject sample, control sample, and disease samples from 30 biopsied tissues are compared with the standard values. Deviation between

standard and subject values establishes the parameters for diagnosing disease.

According to another embodiment of the present invention, the polynucleotides encoding RATL1d6 polypeptide 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 RATL1d6-encoding nucleic acid expression in biopsied tissues in which expression (or under- or overexpression) of RATL1d6 polynucleotide may be correlated with disease. For, example, RATL1d6 polynucleotides, and fragments thereof, may be used to carry out *in situ* hybridization in both normal and diseased tissues, such as for prognostic, diagnostic, or monitoring purposes, employing labeled RATL1d6 polynucleotide as a probe and techniques known and practiced in the art. RATL1d6 polynucleotide may be radiolabeled, or labeled by other means known in the art, e.g., enzymatic, fluorescent, chemiluminescent, or biotin-avidin systems. The diagnostic assay may be used to distinguish between the absence, presence, and excess expression of RATL1d6, and to monitor regulation of RATL1d6 polynucleotide levels during therapeutic treatment or intervention.

In a related aspect, hybridization with PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding RATL1d6 polypeptide, or closely related molecules, may be used to identify nucleic acid sequences which encode RATL1d6 polypeptide. The specificity of the probe, whether it is made from a highly specific region, e.g., about 8 to 10 contiguous nucleotides in the 5' regulatory region, or a less specific region, e.g., especially in the 3' coding region, and the stringency of the hybridization or amplification (maximal, high, intermediate, or low) will determine whether the probe identifies only naturally occurring sequences encoding RATL1d6 polypeptide, alleles thereof, or related sequences.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 82 -

Probes may also be used for the detection of related sequences, and should preferably contain at least 50% of the nucleotides encoding RATL1d6 polypeptide. The hybridization probes of this invention may be DNA or RNA and may be derived from the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or from genomic sequence including promoter, enhancer elements, and introns of the naturally occurring RATL1d6 protein.

5 Methods for producing specific hybridization probes for DNA encoding RATL1d6 polypeptide include the cloning of nucleic acid sequence that encodes RATL1d6 polypeptide, or RATL1d6 derivatives, into vectors for the production of mRNA probes. Such vectors are known in the art, 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 detector/reporter groups, e.g., radionuclides such as ³²P or ³⁵S, or enzymatic labels, such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/ biotin coupling systems, and the like.

The polynucleotide sequence encoding RATL1d6 polypeptide, or fragments thereof, may be used for the diagnosis of disorders associated with expression of RATL1d6. Examples of such disorders or conditions are described above for "Therapeutics". The polynucleotide sequence encoding RATL1d6 polypeptide may be used in Southern or Northern analysis, dot blot, or other membrane-based technologies; in PCR technologies; or in dip stick, pin, ELISA or chip assays utilizing fluids or tissues from patient biopsies to detect the status of, e.g., levels or overexpression of RATL1d6, or to detect altered RATL1d6 expression. Such qualitative or quantitative methods are well known in the art.

In a particular aspect, the nucleotide sequence encoding RATL1d6 polypeptide may be useful in assays that detect activation or induction of various neoplasms or cancers, particularly those mentioned *supra*. The nucleotide sequence encoding RATL1d6 polypeptide 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 biopsied or extracted sample is significantly altered from that of a comparable control sample, the nucleotide sequence has hybridized with nucleotide sequence present in the sample, and the presence of altered levels of nucleotide sequence encoding RATL1d6 polypeptide in the sample indicates the presence of the associated disease. Such assays may also be used to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regimen in animal studies, in clinical trials, or in monitoring the treatment of an individual patient.

To provide a basis for the diagnosis of disease associated with expression of RATL1d6, 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, which encodes RATL1d6 polypeptide, under conditions suitable for hybridization or amplification. Standard hybridization may be quantified by comparing the values obtained from normal subjects with those from an experiment where a known amount of a substantially purified polynucleotide is used. Standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from patients who are symptomatic for disease. Deviation between standard and subject (patient) values is used to establish the presence of disease.

Once disease is established and a treatment protocol is initiated, hybridization assays may be repeated on a regular basis to evaluate whether the level of expression in the patient begins to approximate that which is observed in a normal individual. 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 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 nucleic acid sequence encoding RATL1d6 polypeptide may involve the use of PCR. Such oligomers may be chemically synthesized, generated enzymatically, or produced from a recombinant source. Oligomers will preferably comprise two nucleotide sequences, one with sense orientation (5'→3') and another with antisense (3'→5'), employed under optimized conditions for identification of a specific gene or condition. The same two oligomers, nested sets of oligomers, or even a degenerate pool of oligomers may be employed under less stringent conditions for detection and/or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

Methods suitable for quantifying the expression of RATL1d6 include radiolabeling or biotinylating nucleotides, co-amplification of a control nucleic acid, and standard curves onto which the experimental results are interpolated (P.C. Melby et al., 1993, *J. Immunol. Methods*, 159:235-244; and C. Duplaa et al., 1993, *Anal. Biochem.*, 229-236). The speed of quantifying multiple samples may be accelerated by running the assay in an ELISA format where the oligomer of interest is presented in various dilutions and a spectrophotometric or colorimetric response gives rapid quantification.

In another embodiment of the present invention, oligonucleotides, or longer fragments derived from the RATL1d6 polynucleotide sequence described herein may be used as targets in a microarray. The microarray can be used to monitor the expression level of large numbers of genes simultaneously (to produce a transcript image), and to identify genetic variants, mutations and polymorphisms. This information

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 85 -

may be used to determine gene function, to understand the genetic basis of a disease, to diagnose disease, and to develop and monitor the activities of therapeutic agents. In a particular aspect, the microarray is prepared and used according to the methods described in WO 95/11995 (Chee et al.);

- 5 D.J. Lockhart et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:1675-1680; and M. Schena et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:10614-10619).

Microarrays are further described in U.S. Patent No. 6,015,702 to P. Lal et al.

- In another embodiment of this invention, the nucleic acid
10 sequence which encodes RATL1d6 polypeptide may also be used to generate hybridization probes which are useful for mapping the naturally occurring genomic sequence. The sequences may be mapped to a particular chromosome, to a specific region of a chromosome, or to artificial chromosome constructions (HACs), yeast artificial chromosomes (YACs),
15 bacterial artificial chromosomes (BACs), bacterial PI constructions, or single chromosome cDNA libraries, as reviewed by C.M. Price, 1993, *Blood Rev.*, 7:127-134 and by B.J. Trask, 1991, *Trends Genet.*, 7:149-154.

- Fluorescent In Situ Hybridization (FISH), (as described in I. Verma et al., 1988, *Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques*
20 Pergamon Press, New York, NY) may be correlated with other physical chromosome mapping techniques and genetic map data. Examples of genetic map data can be found in numerous scientific journals, or at Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Correlation between the location of the gene encoding RATL1d6 polypeptide on a physical chromosomal map
25 and a specific disease, or predisposition to a specific disease, may help delimit the region of DNA associated with that genetic disease. The nucleotide sequences, particularly that of SEQ ID NO:1, or fragments thereof, according to this invention may be used to detect differences in gene sequences between normal, carrier, or affected individuals.

- 30 *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 number or arm of a particular human chromosome is not known. New sequences can be assigned to chromosomal arms, or parts thereof, by physical mapping. This provides valuable information to investigators searching for disease genes using positional cloning or other gene discovery techniques. Once the disease or syndrome has been crudely localized by genetic linkage to a particular genomic region, for example, AT to 11q22-23 (R.A. Gatti et al., 1988, *Nature*, 336:577-580), any sequences mapping to that area may represent associated or regulatory genes for further investigation. The nucleotide sequence of the present invention may also be used to detect differences in the chromosomal location due to translocation, inversion, and the like, among normal, carrier, or affected individuals.

In another embodiment of the present invention, RATL1d6 polypeptide, 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 RATL1d6 polypeptide, or portion thereof, and the agent being tested, may be measured utilizing techniques commonly practiced in the art.

Another technique for drug screening which may be used provides for high throughput screening of compounds having suitable binding affinity to the protein of interest as described in WO 84/03564. In this method, as applied to RATL1d6 protein, large numbers of different small test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The test compounds are reacted with RATL1d6 polypeptide, or fragments thereof, and washed. Bound RATL1d6 polypeptide is then detected by methods well known in the art. Purified RATL1d6 polypeptide can also be coated directly onto plates for use in the

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 87 -

aforementioned drug screening techniques. Alternatively, non-neutralizing antibodies can be used to capture the peptide and immobilize it on a solid support.

5 The present invention further embraces method for high throughput screening of chemical libraries for agonists or antagonists of RATL1d6. Such assays are based on measuring UBC enzymatic activity, e.g., as described herein in Example 6, or similarly adapted assays which rely on the measurement of UBC activity.

10 Other screening and small molecule (e.g., drug) detection assays which involve the detection or identification of small molecules that can bind to a given protein, i.e., the RATL1d6 protein, are encompassed by the present invention. Particularly preferred are assays suitable for high throughput screening methodologies. In such binding-based screening or detection assays, a functional assay is not typically required. All that is
15 needed is a target protein, preferably substantially purified, and a library or panel of compounds (e.g., ligands, drugs, small molecules) to be screened or assayed for binding to the protein target. Preferably, most small molecules that bind to the target protein will modulate activity in some manner, due to preferential, higher affinity binding to functional areas or
20 sites on the protein.

An example of such an assay is the fluorescence based thermal shift assay (3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc., 3DP, Exton, PA) as described in U.S. Patent Nos. 6,020,141 and 6,036,920 to Pantoliano et al.; see also, J. Zimmerman, 2000, *Gen. Eng. News*, 20(8)). The assay
25 allows the detection of small molecules (e.g., drugs, ligands) that bind to expressed, and preferably purified, RATL1d6 polypeptide based on affinity of binding determinations by analyzing thermal unfolding curves of protein-drug or ligand complexes. The drugs or binding molecules determined by this technique can be further assayed, if desired, by methods, such as those
30 described herein, to determine if the molecules affect or modulate function or activity of the target protein.

In a further embodiment of this invention, competitive drug screening assays can be used in which neutralizing antibodies capable of binding RATL1d6 polypeptide specifically compete with a test compound for binding to RATL1d6 polypeptide. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with RATL1d6 polypeptide.

It will be understood that the nucleotide sequences which encode RATL1d6 polypeptide 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.

Motifs and Descriptions

The RATL1d6 polypeptide of the present invention was determined to comprise several phosphorylation sites based upon the Motif algorithm (Genetics Computer Group, Inc.). The phosphorylation of such sites may regulate biological activity of the RATL1d6 polypeptide. For example, phosphorylation at specific sites may be involved in regulating the ability of the protein to associate or bind to other molecules (e.g., proteins, ligands, substrates, DNA, etc.). In the present case, phosphorylation may modulate the ability of the RATL1d6 polypeptide to associate with other polypeptides, particularly a cognate ligand for RATL1d6, or its ability to modulate certain cellular signal pathways.

Specifically, the RATL1d6 polypeptide was predicted to comprise four protein kinase C (PKC) phosphorylation sites using the Motif algorithm (Genetics Computer Group, Inc.). In vivo, PKC exhibits a preference for the phosphorylation of serine or threonine residues. The PKC phosphorylation sites have the following consensus pattern: [ST]-x-[RK], where S or T represents the site of phosphorylation and 'x' an intervening amino acid residue. Additional information regarding PKC

phosphorylation sites can be found in Woodget, J.R. et al., 1986, *Eur. J. Biochem.*, 161:177-184 and Kishimoto A. et al., 1985, *J. Biol. Chem.*, 260:12492-12499, which are hereby incorporated by reference herein.

Preferably, the following PKC phosphorylation site

- 5 polypeptides are encompassed by the present invention:
GSVQATDRLMKEL (SEQ ID NO:18), IYRSQSFKGGNYA (SEQ ID NO:19),
ILLNFSFKDNFPF (SEQ ID NO:20), and/or TRAQQSYKSLVQI (SEQ ID
NO:21). Polynucleotides encoding these polypeptides are also provided.
The present invention also encompasses the use of one or more of the
10 RATL1d6 PKC phosphorylation site polypeptides as immunogenic and/or
antigenic epitopes as described elsewhere herein.

- The RATL1d6 polypeptide was predicted to comprise six
casein kinase II phosphorylation sites using the Motif algorithm (Genetics
Computer Group, Inc.). Casein kinase II (CK-2) is a protein serine/threonine
15 kinase whose activity is independent of cyclic nucleotides and calcium. CK-
2 has the ability to phosphorylate many different proteins. The substrate
specificity of this enzyme can be summarized as follows: (1) Under
comparable conditions Ser is favored over Thr; (2) An acidic residue (either
Asp or Glu) must be present three residues from the C-terminus of the
20 phosphate acceptor site; (3) Additional acidic residues in positions +1, +2,
+4 and +5 increase the phosphorylation rate. Most physiological substrates
have at least one acidic residue in these positions; (4) Asp is preferred over
Glu as the provider of acidic determinants; and (5) A basic residue at the N-
terminus of the acceptor site decreases the phosphorylation rate, while an
25 acidic residue increases it.

- A consensus pattern for a typical casein kinase II
phosphorylation site is as follows: [ST]-x(2)-[DE], where 'x' represents any
amino acid, and S or T is the phosphorylation site. Additional information
specific to aminoacyl-transfer RNA synthetase class-II domains can be
30 found in the following publication: Pinna, L.A., 1990, *Biochim. Biophys.*

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 90 -

Acfa, 1054:267-284; which is hereby incorporated by reference herein in its entirety.

The following casein kinase II phosphorylation site polypeptides are preferably encompassed by the present invention:

- 5 PAEQCTQEDVSSSED (SEQ ID NO:22), TQEDVSSSEDEDEEM (SEQ ID NO:23), QEDVSSSEDEDEEMP (SEQ ID NO:24), AEGKKSEDDGIGKE (SEQ ID NO:25), ELVNDSLYDWNVNL (SEQ ID NO:26), and/or
10 ILLNFSFKDNFPFD (SEQ ID NO:27). Polynucleotides encoding these polypeptides are also provided. The present invention also encompasses
15 the use of the casein kinase II phosphorylation site polypeptides as an immunogenic and/or antigenic epitope as described elsewhere herein.

- The RATL1d6 polypeptide has been shown to comprise four glycosylation sites according to the Motif algorithm (Genetics Computer Group, Inc.). As discussed more specifically herein, protein glycosylation is
15 thought to serve a variety of functions including augmentation of protein folding, inhibition of protein aggregation, regulation of intracellular trafficking to organelles, increasing resistance to proteolysis, modulation of protein antigenicity, and mediation of intercellular adhesion.

- Asparagine glycosylation sites have the following consensus
20 pattern, N-{P}-[ST]-{P}, where N represents the glycosylation site. It is well known that potential N-glycosylation sites are specific to the consensus sequence Asn-Xaa-Ser/Thr. However, the presence of the consensus tripeptide is not sufficient to conclude that an asparagine residue is glycosylated, due to the fact that the folding of the protein plays an important
25 role in the regulation of N-glycosylation. It has been shown that the presence of proline between Asn and Ser/Thr will inhibit N-glycosylation; this has been confirmed by a recent statistical analysis of glycosylation sites, which also shows that about 50% of the sites that have a proline C-terminal to Ser/Thr are not glycosylated. Additional information relating to
30 asparagine glycosylation can be found in the following publications, which are hereby incorporated by reference herein: Marshall R.D., *Annu. Rev.*

Biochem., 41:673-702(1972); Pless D.D. and Lennarz W.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74:134-138(1977); Bause E., *Biochem. J.*, 209:331-336(1983); Gavel Y. and von Heijne G., *Protein Eng.*, 3:433-442(1990); and Milešič J.P. and Broze G.J. Jr., *J. Biol. Chem.*, 265:11397-11404(1990).

5 In preferred embodiments, the following asparagine glycosylation site polypeptides are encompassed by the present invention: VRIHCNITESYPVAV (SEQ ID NO:28), AVELVNDSDLYDWNV (SEQ ID NO:29), DFILLNFSFKDNFP (SEQ ID NO:30), and/or VQFGANKSQYSLTR (SEQ ID NO:31). Polynucleotides encoding these polypeptides are also
10 provided. The present invention also encompasses the use of one or more of these RATL1d6 asparagine glycosylation site polypeptides as immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

The RATL1d6 polypeptide was predicted to comprise fourteen N-myristylation sites using the Motif algorithm (Genetics Computer Group,
15 Inc.). An appreciable number of eukaryotic proteins are acylated by the covalent addition of myristate (a C₁₄-saturated fatty acid) to their N-terminal residue via an amide linkage. The sequence specificity of the enzyme responsible for this modification, myristyl CoA:protein N-myristyl transferase (NMT), has been derived from the sequence of known N-myristylated
20 proteins and from studies using synthetic peptides. The specificity seems to be the following: i) The N-terminal residue must be glycine; ii) In position 2, uncharged residues are allowed; iii) Charged residues, proline and large hydrophobic residues are not allowed; iv) In positions 3 and 4, most, if not all, residues are allowed; v) In position 5, small uncharged residues are
25 allowed (Ala, Ser, Thr, Cys, Asn and Gly). Serine is favored; and vi) In position 6, proline is not allowed.

A consensus pattern for N-myristylation is as follows: G-(EDRKHPFYW)-x(2)-[STAGCN]-[P], wherein 'x' represents any amino acid, and G is the N-myristylation site. Additional information specific to N-
30 myristylation sites may be found in the following publications: Towler D.A. et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 57:69-99(1988); and Grand R.J.A., *Biochem. J.*,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 92 -

258:625-638 (1989); which are hereby incorporated by reference herein in their entirety.

The following N-myristylation site polypeptides are preferably encompassed by the present invention: QQPGGQQLGGQGAAP (SEQ ID NO:32), PGQQLGGQGAAPGAGG (SEQ ID NO:33),
5 QLGGQGAAPGAGGGPG (SEQ ID NO:34), AAPGAGGGPGGGPGPG (SEQ ID NO:35), APGAGGGPGGGPGPG (SEQ ID NO:36),
EFLLAGAGGAGAGAAP (SEQ ID NO:37), LLAGAGGAGAGAAPGP (SEQ ID NO:38), LAGAGGAGAGAAPGPH (SEQ ID NO:39),
10 HLPFRGSVPGDPVRIH (SEQ ID NO:40), QDYLNQAVSGSVQATD (SEQ ID NO:41), NQAVSGSVQATDRLMK (SEQ ID NO:42),
SQSFKGGNYAVELVND (SEQ ID NO:43), GYVLGGGAICMELLTK (SEQ ID NO:44), and/or ARVQFGANKSQYSLTR (SEQ ID NO:45). Polynucleotides encoding these polypeptides are also provided. The present invention
15 further encompasses the use of these RATL1d6 N-myristylation site polypeptides as immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

The RATL1d6 polypeptide has been shown to comprise one amidation site according to the Molif algorithm (Genetics Computer Group,
20 Inc.). The precursor of hormones and other active peptides which are C-terminally amidated is always directly followed by a glycine residue which provides the amide group, and most often by at least two consecutive basic residues (Arg or Lys) which generally function as an active peptide precursor cleavage site. Although all amino acids can be amidated, neutral
25 hydrophobic residues, such as Val or Phe, are good substrates, while charged residues, such as Asp or Arg, are much less reactive. A consensus pattern for amidation sites is the following: x-G-[RK]-[RK], wherein "x" represents the amidation site. Additional information relating to amidation may be found in the following publications, which are hereby incorporated by
30 reference herein: Kreil, G., *Meth. Enzymol.*, 106:218-223(1984) and Bradbury, A.F. and Smyth D.G., *Biosci. Rep.*, 7:907-916(1987).

In a preferred embodiment, the following amidation site polypeptide is encompassed by the present invention: EEEPAEGKKSEDDG (SEQ ID NO:46). The polynucleotide encoding this polypeptide is also provided. The present invention also encompasses the use of this RATL1d6 amidation site polypeptide as an immunogenic and/or antigenic epitope as described elsewhere herein.

Method Of Enhancing The Biological Activity/Functional Characteristics Of the Present Invention Through Molecular Evolution

Although many of the most biologically active proteins known are highly effective for their specified function in an organism, they often possess characteristics that make them undesirable for transgenic, therapeutic, pharmaceutical and/or industrial applications. Among these traits, a short physiological half-life is the most prominent problem, and is present either at the level of the protein, or at the level of the mRNA. The ability to extend the half-life of a protein or peptide would be particularly important for its use, for example, in gene therapy, transgenic animal production, the bioprocess production and purification of the protein and the use of the protein as a chemical modulator, among others. Therefore, there is a need to identify novel variants of isolated proteins possessing characteristics which enhance their application as therapeutics for treating diseases of animal origin, in addition to having applicability to common industrial and pharmaceutical applications.

Thus, one aspect of the present invention relates to the ability to enhance specific characteristics of the polypeptides of the present invention through directed molecular evolution. Such an enhancement may, in a non-limiting example, benefit the utility of the newly described polynucleotide and/or protein products as an essential component in a kit; the physical attributes of a protein and/or polynucleotide of the invention, such as its solubility, structure, or codon optimization; the specific biological activity of a protein of the invention, including any associated enzymatic activity; the enzyme kinetics of the proteins of the invention (if applicable);

the K_i , K_{cat} , K_m , V_{max} , K_d , protein-protein activity, protein-DNA binding activity, antagonist/inhibitory activity (including direct or indirect interaction), agonist activity (including direct or indirect interaction) of the protein of the invention; the antigenicity of the protein of the invention (e.g., where it would
5 be desirable to either increase or decrease the antigenic potential of the protein); the immunogenicity of the protein of the invention; the ability of the protein of the invention to form dimers, trimers, or multimers with either itself or other proteins; the antigenic efficacy of a protein of the invention, including its subsequent use as a preventative treatment for disease or
10 disease states, or as an effector for targeting diseased genes.

Moreover, the ability to enhance specific characteristics of a protein may also be applicable to changing the characterized activity of an enzyme to an activity completely unrelated to its initially characterized activity. Other desirable enhancements of the protein of the present
15 invention would be specific to each individual protein, and would thus be appreciated by the skilled practitioner in the art and contemplated by the present invention.

For example, an engineered ubiquitin conjugating enzyme, e.g., RATL1d6 protein, may be constitutively active upon binding of its
20 substrate. Alternatively, an engineered ubiquitin conjugating enzyme may be constitutively active in the absence of substrate binding. In yet another example, an engineered ubiquitin conjugating enzyme may be capable of being activated with less than all of the regulatory factors and/or conditions typically required for ubiquitin conjugating enzyme activation (e.g., substrate
25 binding, phosphorylation, conformational changes, etc.). Such a ubiquitin conjugating enzyme would be useful in screens to identify ubiquitin conjugating enzyme modulators, among other uses described herein. Alternatively, an engineered ubiquitin conjugating enzyme may have altered substrate specificity, and/or enhanced ubiquitin conjugating enzyme activity.
30 As yet another alternative, an engineered ubiquitin conjugating enzyme may have decreased ubiquitin conjugating enzyme activity.

Directed evolution is comprised of several steps. The first step involves establishing a library of variants for the gene or protein of interest. The most important step is then selecting for those variants which possess the activity to be identified. The design of the screen is essential, since the screen should be selective enough to eliminate non-useful variants, but not so stringent as to eliminate all variants. The last step is repeating the above steps using the best variant from the previous screen. Each successive cycle can then be tailored as necessary, such as by increasing the stringency of the screen, for example.

Over the years, there have been a number of methods developed to introduce mutations into macromolecules. Some of these methods include random mutagenesis, "error-prone" PCR, chemical mutagenesis, site-directed mutagenesis, and other methods well known in the art (for a comprehensive listing of current mutagenesis methods, see T. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982)). Typically, such methods have been used, for example, as tools for identifying the core functional region(s) of a protein or the function of specific domains of a protein (if a multi-domain protein). However, such methods have more recently been applied to the identification of macromolecule variants with specific or enhanced characteristics.

Random mutagenesis has been the most widely recognized method to date. Typically, this has been carried out either through the use of "error-prone" PCR (as described in Moore, J. et al, *Nature Biotechnology* 14:458, (1996), or through the application of randomized synthetic oligonucleotides corresponding to specific regions of interest (as described by Derbyshire, K.M. et al, *Gene*, 46:145-152, (1986), and Hill, D.E. et al, *Methods Enzymol.*, 55:559-568, (1987)). Both approaches have limits to the level of mutagenesis that can be obtained. However, either approach enables the investigator to effectively control the rate of mutagenesis. This is particularly important, since mutations beneficial to the activity of the

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 96 -

enzyme are fairly rare. In fact, using too high a level of mutagenesis may counter or inhibit the desired benefit of a useful mutation.

While both of the aforementioned methods are effective for creating randomized pools of macromolecule variants, a third method, termed "DNA Shuffling", or "sexual PCR" (Stemmer, W.P.C., *PNAS*, 91:10747, (1994)) has recently been elucidated. DNA shuffling has also been referred to as "directed molecular evolution", "exon-shuffling", "directed enzyme evolution", "*in vitro* evolution", and "artificial evolution". Such reference terms are known in the art and are encompassed by the invention. The new, preferred, method apparently overcomes the limitations of the previous methods in that it not only propagates positive traits, but simultaneously eliminates negative traits in the resulting progeny.

DNA shuffling accomplishes this task by combining the principal of *in vitro* recombination, along with the method of "error-prone" PCR. In effect, a randomly digested pool of small DNA fragments of a given gene (i.e., a RATL1d6 gene according to this invention) is created by DNase I digestion. The resulting fragments are then introduced into an "error-prone" PCR assembly reaction. During the PCR reaction, the randomly sized DNA fragments hybridize not only to their cognate strand, but also to other DNA fragments corresponding to different regions of the polynucleotide of interest – regions not typically accessible via hybridization of the entire polynucleotide. Moreover, since the PCR assembly reaction utilizes "error-prone" PCR reaction conditions, random mutations are introduced during the DNA synthesis step of the PCR reaction for all of the fragments, thus further diversifying the potential hybridization sites during the annealing step of the reaction.

A variety of reaction conditions can be employed to carry out the DNA shuffling reaction. However, specific reaction conditions for DNA shuffling are provided hereinbelow for guidance, (see also, *PNAS*, 91:10747, (1994). Briefly: the DNA substrate that is to be subjected to the DNA shuffling reaction is prepared. The preparation may be in the form of

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 97 -

simply purifying the DNA from contaminating cellular material, chemicals, buffers, oligonucleotide primers, deoxynucleotides, RNAs, etc., and may utilize commercially available DNA purification kits, such as those provided by Qiagen, Inc., or by Promega, Corp., for example.

5 Once the DNA substrate has been purified, it is subjected to DNase I digestion. About 2-4 μ g of the DNA substrate(s) is digested with .0015 units of DNase I (Sigma) per μ l in 100 μ l of 50mM Tris-HCL, pH 7.4/1mM MgCl₂ for 10-20 minutes at room temperature. The resulting fragments of 10-50bp are then purified by subjecting them to agarose gel electrophoresis (e.g., a 2% low-melting point agarose gel) and then transferring them onto DE81 ion-exchange paper (Whatman); the fragment can also be purified using Microcon concentrators (Amicon) of the appropriate molecular weight cutoff, or by using oligonucleotide purification columns (Qiagen), in addition to other methods known in the art. If using DE81 ion-exchange paper, the 10-50bp fragments are then eluted from said paper using 1M NaCl, followed by ethanol precipitation.

10 The resulting purified fragments are then be subjected to a PCR assembly reaction by re-suspension in a PCR mixture containing: 2mM of each dNTP, 2.2mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10mM Tris-HCL, pH 9.0, and 0.1% Triton X-100®, at a final fragment concentration of 10-30ng/ μ l. No primers are added at this point.

15 *Taq* DNA polymerase (Promega) is used at 2.5 units per 100 μ l of reaction mixture. A PCR program used is 94 C for 60s; 94 C for 30 sec, 50-55 C for 30 sec, and 72 C for 30 sec using 30-45 cycles, followed by 25 72 C for 5 min using an MJ Research (Cambridge, MA) PTC-150 thermocycler. After the assembly reaction is completed, a 1:40 dilution of the resulting primerless product is then introduced into a PCR mixture (using the same buffer mixture used for the assembly reaction) containing 0.8 μ M of each primer and subjecting this mixture to 15 cycles of PCR (using 94 C for 30s, 50 C for 30s, and 72 C for 30s). The referred primers are primers 30 corresponding to the nucleic acid sequences of the polynucleotide(s) utilized

in the shuffling reaction. Such primers can contain modified nucleic acid base pairs using methods known in the art and referred to elsewhere herein, or can contain additional sequences (i.e., for adding restriction sites, mutating specific base pairs, etc.).

5 The resulting shuffled, assembled, and amplified product can be purified using methods well known in the art (e.g., Qiagen PCR purification kits) and then subsequently cloned using appropriate restriction enzymes.

10 Although a number of variations of DNA shuffling have been published to date, such variations are understood and practiced by the skilled artisan and are encompassed by the invention. The DNA shuffling method can also be tailored to the desired level of mutagenesis using the methods described by Zhao et al. 1997, *Nucl Acid Res.*, 25(6):1307-1308.

15 As described above, once the randomized pool has been created, it can then be subjected to a specific screen to identify the variant possessing the desired characteristic(s). Once the variant has been identified, DNA corresponding to the variant can be used as the DNA substrate for initiating another round of DNA shuffling. This cycle of shuffling, selecting the optimized variant of interest, and then re-shuffling, 20 can be repeated until the ultimate variant is obtained. Examples of model screens applied to identify variants created using DNA shuffling technology are found in the following publications: J. C. Moore et al., *J. Mol. Biol.*, 272:336-347, (1997), F.R. Cross et al., *Mol. Cell. Biol.*, 18:2923-2931, (1998), and A. Cramer et al., *Nat. Biotech.*, 15:436-438, (1997).

25 DNA shuffling has several advantages. First, it makes use of beneficial mutations. When combined with screening, DNA shuffling allows the discovery of the best mutational combinations and does not assume that the best combination contains all the mutations in a population. Second, recombination occurs simultaneously with point mutagenesis. An effect of 30 forcing DNA polymerase to synthesize full-length genes from the small fragment DNA pool is a background mutagenesis rate. In combination with

a stringent selection method, enzymatic activity has been evolved to up to a 16000-fold increase over the wild-type form of the enzyme. In essence, the background mutagenesis yielded the genetic variability on which recombination acted to enhance the activity.

5 A third feature of recombination is that it can be used to remove deleterious mutations. As discussed above, during the process of the randomization, for every one beneficial mutation, there may be at least one or more neutral or inhibitory mutation(s). Such mutation(s) can be removed by including in the assembly reaction an excess of the wild-type
10 random-size fragments, in addition to the random-size fragments of the selected mutant from the previous selection. During the subsequent selection, some of the most active variants of the polynucleotide/polypeptide/enzyme should have lost the inhibitory mutations.

15 Finally, recombination enables parallel processing. This represents a significant advantage, since there are likely to be multiple characteristics that would make a protein more desirable (e.g. solubility, activity, etc.). Since it is increasingly difficult to screen for more than one desirable trait at a time, other methods of molecular evolution tend to be
20 inhibitory. However, using recombination, it is possible to combine the randomized fragments of the best representative variants for the various traits, and then to select for multiple properties at one time.

DNA shuffling can also be applied to the polynucleotides and polypeptides of the present invention to decrease their immunogenicity in a
25 specified host, particularly if the polynucleotides and polypeptides provide a therapeutic use. For example, a particular variant of the present invention may be created and isolated using DNA shuffling technology. Such a variant may have all of the desired characteristics, though it may be highly immunogenic in a host due to its novel intrinsic structure. Specifically, the
30 desired characteristic may cause the polypeptide to have a non-native structure which is no longer be recognized as a "self" molecule, but rather as

a "foreign" molecule, and thus activate a host's immune response directed against the novel variant. Such a limitation can be overcome, for example, by including a copy of the gene sequence for a xenobiotic ortholog of the native protein with the gene sequence of the novel variant gene in one or more cycles of DNA shuffling. The molar ratio of the ortholog and novel variant DNAs could be varied accordingly. Ideally, the resulting hybrid variant identified would contain at least some of the coding sequence which enabled the xenobiotic protein to evade the host immune system, and additionally, the coding sequence of the original novel variant that provided the desired characteristics.

Likewise, the present invention encompasses the application of DNA shuffling technology to the evolution of polynucleotides and polypeptides of the invention, wherein one or more cycles of DNA shuffling include, in addition to the gene template DNA, oligonucleotides coding for known allelic sequences, optimized codon sequences, known variant sequences, known polynucleotide polymorphism sequences, known ortholog sequences, known homolog sequences, additional homologous sequences, additional non-homologous sequences, sequences from another species, and any number and combination of the above.

In addition to the above-described methods, there are a number of related methods that may also be applicable, or desirable, in certain cases. Representative among these are the methods discussed in PCT applications WO 98/31700, and WO 98/32845, which are hereby incorporated by reference. Furthermore, related methods can also be applied to the polynucleotide sequences of the present invention in order to evolve and create ideal variants for use in gene therapy, protein engineering, evolution of whole cells containing the variant, or in the evolution of entire enzyme pathways, containing polynucleotides of the invention, such as described in PCT applications WO 98/13485, WO 98/13487, WO 98/27230, WO 98/31837, and Cramer, A. et al., *Nat. Biotechnol.*, 15:436-438, (1997).

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 101 -

Additional methods of applying "DNA Shuffling" technology to the polynucleotides and polypeptides of the present invention, including their proposed applications, may be found in US Patent No. 5,605,793; PCT Application No. WO 95/22625; PCT Application No. WO 97/20078; PCT Application No. WO 97/35966; and PCT Application No. WO 98/42832. The foregoing are hereby incorporated by reference in their entirety herein for all purposes.

EXAMPLES

10 The Examples below are provided to illustrate the subject invention and are not intended to limit the invention.

Example 1

Methods

15 A. T-Cell Preparation

T cells were prepared by standard rosetting protocols with sheep red blood cells (SRBCs). Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 225 ml of heparinized blood from each of 2 donors were prepared by centrifugation over Ficoll. T cells (E+ fraction) were isolated by rosetting with SRBCs. Messenger RNA (mRNA) from one half of the unstimulated T cells (approximately 2.25×10^8 cells) was prepared according to the manufacturer's instructions with a FAST-TRACK mRNA isolation kit (Invitrogen). The remaining T cells were diluted to 1.25×10^6 /ml in RPMI/10%FBS containing the costimulatory anti-CD28 mAb 2E12 at 5 μ g/ml and added (20ml/plate) to 10cm tissue culture plates (Corning) that had been coated with anti-CD3 mAb G19-4. Plates were coated by incubating 5 ml of 5 μ g/ml mAb diluted in PBS for 7 hours at 37°C followed by washing 3 times with PBS. The plates were cultured under normal conditions of cell culture for 18 hours. Activated cells were harvested by vigorous pipetting and scraping to obtain both suspension and adherent

20
25
30

cells, pelleted by centrifugation, and processed for mRNA isolation as described above.

B. Subtraction Library Construction

A cDNA subtraction library was made using the CLONTECH
5 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech, Palo Alto, CA).
Manufacturer's protocols were followed for 500 ng of anti-CD3/anti-CD28
activated peripheral blood T cell poly A+ RNA (tester) and 500 ng of
unactivated, resting peripheral blood T cell poly A+ RNA (driver). Five
secondary PCR reactions were combined and run on a 1.2% agarose gel.
10 Fragments ranging from approximately 0.3kb-1.5 kb were gel purified using
the QIAgen gel extraction kit (QIAgen Inc., Valencia, CA) and inserted into
the TA cloning vector, pCR2.1 (Invitrogen). TOP10F' competent E. Coli
(Invitrogen) were transformed and plated on Lauria-Bertani (LB) plates
containing 50 micrograms/ml ampicillin. Approximately 600 clones were
15 isolated and grown in LB broth containing similar concentrations of
ampicillin. Plasmids were isolated using QIAgen miniprep spin (QIAgen)
and sequenced using ABI cycle sequencers (ABI Prism, PE Applied
Biosystems).

C. Database Mining for Overlapping EST clones

20 Over six hundred clone inserts were analyzed using BLAST2
(Basic Local Alignment Search Tool). Clones with ESTs (Expressed
Sequence Tags) of known genes were removed using the non-redundant
nucleotide database maintained by NCBI. A number of clones proved to be
novel, i.e., such clones were not published by NCBI or found in the
25 database. A further search was performed using the geneseq nucleotide
patent database (also available through BLAST2). Clones containing ESTs
of patented sequences were eliminated depending on the size of the known
sequence, quality of known sequence information, and/or lack of utility
associated with publicly available sequence.

30 After analyzing the sequences for novelty, virtual cloning was
performed using the D2 clustered EST database (also available on

BLAST2). This D2 clustered database was designed by the Bristol-Myers Squibb Bioinformatics department. It contains both public and proprietary (Incyte Pharmaceuticals, Inc.) ESTs assembled into contigs. A contig is a collection of smaller EST clones assembled into larger sequence fragments.

- 5 The subtraction clone sequences were used to query this clustered database. Cluster sequences were assembled with the subtraction clone sequence using the sequence analysis program Sequencher (Gene Codes). The larger contig sequence was then back-searched against the non-redundant nucleotide (NRN), geneseq nucleotide patent (GNP), non-redundant protein (NRP), and geneseq peptide patent (GPP) databases.
- 10

D. *Drosophila* Ortholog Identification

- To search the *Drosophila* orthologue of the human RATL1d6 gene, the RATL1d6 protein sequence was searched against the public *Drosophila* protein and genomic sequence database from GenBank, using the BLAST software (Altschul, S.F. et al., 1997, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). The *Drosophila* gene EG:25E8 (Genbank Accession No: AAF45767) was found to have the highest homology with the human RATL1d6 gene, with 48% identity at the amino acid level covering the majority of the gene. The *Drosophila* gene EG:25E8 was used to search against the public human protein and genomic sequence database from GenBank. Among all of the human genes, RATL1d6 was found to be most similar to the *Drosophila* EG:25E8 gene. The results of the database search indicate that EG:25E8 is the *Drosophila* orthologue of the human UBC enzyme RATL1d6 gene.
- 15
- 20

25

Example 2

Cloning of RATL1d6 Polynucleotide

- Full-length cloning experiments to isolate and obtain the RATL1d6 polynucleotide were performed using Gene Trapper technology (LifeTechnologies, MD) according to the manufacturer's instructions. Briefly, PCR primers PY508, (5'-TGCAGTGTCTGGCTCGGTGC-3'), (SEQ ID NO:9)
- 30

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 104 -

and PY809, (5'-CTGATCTGCATGATCACTGAC-3'), (SEQ ID NO:10) were used to screen a panel of human cDNA libraries (LifeTechnologies), including bone marrow, heart, lung, brain, kidney, peripheral blood leukocyte, liver, spleen, testis and fetal brain cDNA libraries. A strong positive PCR product was identified in human brain and bone marrow cDNA libraries (LifeTechnologies).

The double stranded cDNA plasmid libraries were converted to single stranded DNA (ssDNA) using Gene II and Exonuclease III. Hybrids between the biotinylated oligonucleotide (PY495: 5'-TCCACTGCAACATCACGGAGTCATACCCCTG-3'), (SEQ ID NO:11) or (PY496: 5'-ATGCAGTCCGAACCTCGTGAATGACAGTCTGT-3'), (SEQ ID NO:12) and the ssDNA were formed and then captured on paramagnetic beads. (D.A. Tagle et al., 1993, *Nature*, 361:751-753). After washing, the ssDNA was released and converted to dsDNA by DNA polymerase. Following transformation and plating of DH10B cells, positive clones were identified by PCR analysis. Through this technique, positive clones were identified for the novel RATL1d6 gene. The plasmids were prepared using a QIAprep spin miniprep kit (Qiagen) and the resulting DNA was subjected to sequencing using conventional protocols known in the art.

Sequence analysis of the 5' end of the sequenced polynucleotide indicated that three of the clones from the bone marrow cDNA library contained the full-length coding region for the RATL1d6 polypeptide. Additional primers were synthesized and used to sequence the entire insert using conventional sequencing protocols. The vector for these cDNA inserts was pCMVSPORT2 with cloning sites Sali (5'-end) and NotI (3'-end).

Example 3

Labeling of Hybridization Probes and Use Thereof

Hybridization probes derived from SEQ ID NO:1 are employed to screen cDNAs, genomic DNAs, or mRNAs. Although the labeling of

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 105 -

oligonucleotides containing about 20 base pairs is described in this Example, essentially the same procedure is used with larger cDNA fragments. Oligonucleotides are designed using state-of-the-art software such as OLIGO 4.06 (National Biosciences), labeled by combining 50 pmol
5 of each oligomer and 250 μ Cl of [γ - 32 P] adenosine triphosphate (Amersham) and T4 polynucleotide kinase (DuPont NEN, Boston, Mass.). The labeled oligonucleotides are substantially purified with SEPHADEX G-25 superfine resin column (Amersham Pharmacia Biotech). A portion containing 10^7
10 counts per minute of each of the sense and antisense oligonucleotides is used in a typical membrane based hybridization analysis of human genomic DNA digested with one of the following endonucleases (e.g., 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 percent agarose gel and transferred to nylon membranes (Nytran Plus, Schleicher &
15 Schuell, Durham, N.H.). Hybridization is carried out for 16 hours at 40°C. To remove nonspecific signals, blots are sequentially washed at room temperature under increasingly stringent conditions up to 0.1x saline sodium citrate and 0.5% sodium dodecyl sulfate. After XOMATAR film (Kodak, Rochester, NY) is exposed to the blots in a Phosphorimager cassette
20 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) for several hours, hybridization patterns are compared visually.

Example 4

Complementary Polynucleotides

Antisense molecules or nucleic acid sequence complementary
25 to the RATL1d6 protein-encoding sequence, or any part thereof, is used to decrease or to inhibit the expression of naturally occurring RATL1d6. Although the use of antisense or complementary oligonucleotides comprising about 15 to 35 base-pairs is described, essentially the same procedure is used with smaller or larger nucleic acid sequence fragments.
30 An oligonucleotide based on the coding sequence of RATL1d6 protein, as

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 106 -

shown in Figures 1A, 1B and 2A, 2B, is used to inhibit expression of naturally occurring RATL1d6. The complementary oligonucleotide is designed from the most unique 5' sequence (Figures 1A, 1B and 2A, 2B), and is used either to inhibit transcription by preventing promoter binding to the coding sequence, or to inhibit translation by preventing the ribosome from binding to the RATL1d6 protein-encoding transcript. Using an appropriate portion of the signal and 5' sequence of SEQ ID NO:1, an effective antisense oligonucleotide includes any of about 15-35 nucleotides to target any portion of the mRNA, preferably, an antisense oligo spans the region which translates into the signal, or the coding sequence of the polypeptide as shown in Figures 1A, 1B and 2A, 2B. Appropriate oligonucleotides are designed using OLIGO 4.06 software and RATL1d6 protein coding sequence.

Example 5

15 Expression of RATL1d6

Expression of RATL1d6 polypeptide is achieved by subcloning the encoding cDNA into appropriate vectors and transforming the vectors into host cells. For this example, the cloning vector, pGEX, is used to express RATL1d6 in DH5 α host cells.

20 By way of this Example, using *E. coli* as the host cell, the cloning vector contains a promoter for β -galactosidase upstream of the cloning site, followed by sequence encoding glutathione S-transferase (GST). Immediately following these residues is a bacteriophage promoter that is useful for transcription and a linker containing a number of unique restriction sites.

25 Induction of an isolated transformed bacterial strain with IPTG using standard methods produces a fusion protein which contains the first eight residues of β -galactosidase, about 5-15 residues of linker, GST and then full-length RATL1d6 protein. The signal residues direct the secretion of

RATL1d6 protein into the bacterial growth medium, which can be used directly in the assays to determine the activity of the protein.

Example 6

Demonstration of RATL1d6 Activity

5 RATL1d6 gene product activity is demonstrated *in vitro* by the formation of multi-ubiquitin conjugates and ubiquitin-RATL1d6 thiol ester linkage from free ubiquitin and E2 ubiquitin carrier protein, which catalyzes multi-ubiquitin chain formation (S. Van Nocker and R. D. Vierstra, 1991, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 88:10297-10301). Briefly, thiol ester adduct
10 formation between ubiquitin and E2 (20kDa), control, and RATL1d6 protein is assayed as described by A.L. Haas et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257:2543-2548. ¹²⁵I-labeled ubiquitin or [Arg⁴⁹] ubiquitin (1 μ M) is incubated in a reaction mixture with RATL1d6 protein (50-500 nM), E1 (ubiquitin activating enzyme), (10 nM), and E2 (20 kDa), (50-500 nM), and Mg ATP (2 mM) in 50
15 mM Tris-HCl, pH 8.0, for 2 minutes at 30°C. To assay for conjugate formation, the same reaction mixture is incubated at 37°C and allowed to proceed for various times. Multi-ubiquitin conjugates and thiol ester linkages due to the activity of RATL1d6 are separated from free ubiquitin by polyacrylamide gel electrophoresis and visualized by autoradiography.

20 **Example 7**

Northern Analysis

Northern analysis is 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 RNA from a particular cell or tissue type has been
25 bound (See, J. Sambrook et al., *supra*). Analogous computer techniques using BLAST (S.F. Altschul, 1993, *J. Mol. Evol.*, 36:290-300 and S.F. Altschul et al., 1990, *J. Mol. Evol.*, 215:403-410) are used to search for identical or related molecules in nucleotide databases, such as GenBank or the LIFESEQ database (Incyte Pharmaceuticals). This analysis is much
30 more rapid and less labor-intensive than performing multiple, membrane-

based hybridizations. In addition, the sensitivity of the computer search can be modified to determine whether any particular match is categorized as being exact (identical) or homologous.

The basis of the search is the product score, which is defined as follows: $(\% \text{ sequence identity} \times \text{maximum BLAST score}) / 100$. The product score takes into account both the degree of similarity between two sequences and the length of the sequence match. For example, with a product score of 40, the match will be exact within a 1-2% error; at 70, the match will be exact. Homologous molecules are usually identified by selecting those which show product scores between 15 and 40, although lower scores may identify related molecules. The results of Northern analysis are reported as a list of libraries in which the transcript encoding RATL1d6 occurs. Abundance and percent abundance are also reported. Abundance directly reflects the number of times that a particular transcript is represented in a cDNA library, and percent abundance is abundance divided by the total number of sequences that are examined in the cDNA library.

Example B

Microarrays

For the production of oligonucleotides for a microarray, SEQ ID NO:1 is examined using a computer algorithm which starts at the 3' end of the nucleotide sequence. The algorithm identifies oligomers of defined length that are unique to the gene, have a GC content within a range that is suitable for hybridization and lack predicted secondary structure that would interfere with hybridization. The algorithm identifies specific oligonucleotides of 20 nucleotides in length, i.e., 20-mers. A matched set of oligonucleotides is created in which one nucleotide in the center of each sequence is altered. This process is repeated for each gene in the microarray, and double sets of 20-mers are synthesized in the presence of fluorescent or radioactive nucleotides and arranged on the surface of a substrate. When the substrate

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 109 -

is a silicon chip, a light-directed chemical process is used for deposition (WO 95/11995, M. Chee et al.).

Alternatively, a chemical coupling procedure and an ink jet device is used to synthesize oligomers on the surface of a substrate. (WO 5 95/25116, J.D. Baldeschweiler et al.). As another alternative, a "gridded" array that is analogous to a dot (or slot) blot is used to arrange and link cDNA fragments or oligonucleotides to the surface of a substrate using, for example, a vacuum system, or thermal, UV, mechanical, or chemical bonding techniques. A typical array may be produced by hand, or by using 10 available materials and equipment, and may contain grids of 8 dots, 24 dots, 96 dots, 384 dots, 1536 dots, or 6144 dots. After hybridization, the microarray is washed to remove any non-hybridized probe, and a detection device is used to determine the levels and patterns of radioactivity or fluorescence. The detection device may be as simple as X-ray film, or as 15 complicated as a light scanning apparatus. Scanned fluorescent images are examined to determine degree of complementarity and the relative abundance / expression level of each oligonucleotide sequence in the microarray.

Example 9

20 **Production of Antibodies Specific for RATL1d6 Polypeptide**

A RATL1d6 peptide conjugated to a carrier, such as BSA or KLH, or the full-length RATL1d6 protein, is used as an immunogen to raise antibodies in a host, such as rabbits or mice. As an alternative, a RATL1d6 fusion protein, i.e., RATL16 fused to GST or 6xHIS is expressed in an 25 appropriate host expression system, such as bacteria, insect or mammalian cells and the resulting fusion product is isolated according to standard practice and used as an immunogen to generate polyclonal or monoclonal antibodies utilizing routine production methods and protocols known to those having skill in the art.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 110 -

As another alternative, RATL1d6 polypeptide that is substantially purified using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), (J. Sambrook, *supra*), or other purification techniques, is used to immunize rabbits and to produce antibodies using standard protocols. The amino acid
5 sequence from SEQ ID NO:2 is analyzed using LASERGENE software (DNASTAR Inc.) to determine regions of high immunogenicity and one or more corresponding oligopeptides is synthesized and used to raise antibodies by means known and used by those having skill in the art. The selection of appropriate epitopes, such as those near the C-terminus, or in
10 hydrophilic regions, is described by F.M. Ausubel et al., *supra*, as well as others.

Typically, the oligopeptides are 15 residues in length, synthesized using an ABI Peptide Synthesizer 431A (PE Biosystems) using fmoc-chemistry, and coupled to KLH (Sigma, St. Louis, MO) by reaction with
15 N-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS; F.M. Ausubel et al., *supra*). Rabbits are immunized with the oligopeptide-KLH complex in Freund's adjuvant. The resulting antisera are tested for anti-peptide activity, for example, by binding the peptide to plastic, blocking with 1% bovine serum albumin (BSA), reacting with the rabbit antisera, washing and
20 reacting with radio-iodinated, or enzyme-labeled (e.g., horse radish peroxidase) goat or mouse anti-rabbit IgG immunoglobulin.

Example 10

Purification of Naturally Occurring RATL1d6 Polypeptide Using Specific Antibodies

25 Naturally occurring or recombinant RATL1d6 polypeptide is substantially purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for RATL1d6 polypeptide. An immunoaffinity column is constructed by covalently coupling anti-RATL1d6 polypeptide antibody to an activated
30 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.

Medium containing RATL1d6 polypeptide is passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of RATL1d6 polypeptide (e.g., high ionic strength buffers in the presence of detergent). The column is eluted under conditions that disrupt antibody/RATL1d6 polypeptide binding (e.g., a buffer of pH 2-3, or a high concentration of a chaotrope, such as urea or thiocyanate ion), and RATL1d6 polypeptide is collected.

10

Example 11

Identification of Molecules That Interact with the RATL1d6 Polypeptide

RATL1d6 polypeptide, or biologically active fragments thereof, are labeled with ¹²⁵I Bolton-Hunter reagent (Bolton et al., 1973, *Biochem. J.*, 133:529). Candidate molecules previously arrayed in wells of a multi-welled plate are incubated with the labeled RATL1d6 polypeptide, washed, and any wells having labeled RATL1d6 polypeptide-candidate molecule complexes are assayed. Data obtained using different concentrations of RATL1d6 polypeptide are used to calculate values for the number, affinity and association of RATL1d6 polypeptide with the candidate molecules.

15

Another method suitable for identifying proteins, peptides or other molecules that interact with the RATL1d6 polypeptide include ligand binding assays such as the yeast-two hybrid system as described above.

20

Example 12

Creating N- and C-terminal Deletion Mutants Corresponding to the RATL1d6 Polypeptide of the Present Invention

25

As described elsewhere herein, the present invention encompasses the creation of N- and C-terminal deletion mutants, in addition to any combination of N- and C-terminal deletions thereof, corresponding to the RATL1d6 polypeptide of the present invention. A number of methods are available to one skilled in the art for creating such mutants. Such

30

methods include a combination of PCR amplification and gene cloning methodology. Although one of skill in the art of molecular biology, through the use of the teachings provided or referenced herein, and/or otherwise known in the art as standard methods, could readily create each deletion

5 mutants of the present invention, exemplary methods are described below.

Briefly, using the isolated cDNA clone encoding the full-length RATL1d6 polypeptide sequence, or splice variant sequences, appropriate primers of about 15-25 nucleotides derived from the desired 5' and 3' positions of SEQ ID NO:1 may be designed to PCR amplify, and

10 subsequently clone, the intended N- and/or C-terminal deletion mutant. Such primers can comprise, for example, an initiation and stop codon for the 5' and 3' primer, respectively. Such primers can also comprise restriction sites to facilitate cloning of the deletion mutant post-amplification. Moreover, the primers can comprise additional sequences, such as, for example, flag-

15 tag sequences, kozac sequences, or other sequences discussed and/or referenced herein.

For example, in the case of the D67 to G422 N-terminal deletion mutant, the following primers presented in Table 1 can be used to amplify a cDNA fragment corresponding to this deletion mutant:

20

Table 1

5' Primer	5'- gcagca <u>gcggccgc</u> gacgagctgagctgogagttctgc -3' (SEQ ID NO:13), where the underlined sequence represents the <i>NotI</i> restriction enzyme site.
3' Primer	5'- gcagca <u>gtcgac</u> gcgctctctttgggggtgtgac -3' (SEQ ID NO:14), where the underlined sequence represents the <i>SalI</i> restriction enzyme site.

In addition, in the case of the M1 to Q359 C-terminal deletion mutant, for example, the following primers presented in Table 2 can be used to amplify a cDNA fragment corresponding to this deletion mutant:

25

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 114 -

DNA ligase, and then used to transform competent *E. coli* cells, using methods provided herein and/or as otherwise known in the art.

The 5' primer sequence for amplifying any additional N-terminal deletion mutants may be determined by reference to the following

5 formula:

(S+(X * 3)) to ((S+(X * 3))+25), wherein 'S' is equal to the nucleotide position of the initiating start codon of the RATL1d6 gene (SEQ ID NO:1), and 'X' is equal to the most N-terminal amino acid of the intended N-terminal deletion mutant. The first term provides the start 5' nucleotide position of the 5' primer, while the second term provides the end 3' nucleotide position of the 5' primer corresponding to the sense strand of SEQ ID NO:1. Once the corresponding nucleotide positions of the primer are determined, the final nucleotide sequence can be created by the addition of applicable restriction site sequences to the 5' end of the sequence, for example. As described herein, the addition of other sequences to the 5' primer may be desired in certain circumstances (e.g., kozac sequences, etc.).

The 3' primer sequence for amplifying any additional N-terminal deletion mutants can be determined by reference to the following

20 formula:

(S+(X * 3)) to ((S+(X * 3))-25), wherein 'S' is equal to the nucleotide position of the initiating start codon of the RATL1d6 gene (SEQ ID NO:1), and 'X' is equal to the most C-terminal amino acid of the intended N-terminal deletion mutant. The first term provides the start 5' nucleotide position of the 3' primer, while the second term provides the end 3' nucleotide position of the 3' primer corresponding to the antisense strand of SEQ ID NO:1. Once the corresponding nucleotide positions of the primer are determined, the final nucleotide sequence can be created by the addition of applicable restriction site sequences to the 5' end of the sequence, for example. As described herein, the addition of other sequences to the 3' primer may be desired in certain circumstances (e.g.,

25

30

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 115 -

stop codon sequences, etc.). The skilled artisan will appreciate that modifications to the above nucleotide positions may be necessary for optimizing PCR amplification.

The same general formulas provided above can be used in
5 identifying the 5' and 3' primer sequences for amplifying any C-terminal deletion mutant of the present invention. Moreover, the same general formulas provided above may be used in identifying the 5' and 3' primer sequences for amplifying any combination of N-terminal and C-terminal deletion mutant of the present invention. The skilled artisan will appreciate
10 that modifications of the above nucleotide positions may be necessary for optimizing PCR amplification.

Preferably, the following N-terminal RATL1d6 deletion polypeptides of SEQ ID NO:2 are encompassed by the present invention:
M1-G422, Q2-G422, Q3-G422, P4-G422, Q5-G422, P6-G422, Q7-G422,
15 G8-G422, Q9-G422, Q10-G422, Q11-G422, P12-G422, G13-G422, P14-G422, G15-G422, Q16-G422, Q17-G422, L18-G422, G19-G422, G20-G422, Q21-G422, G22-G422, A23-G422, A24-G422, P25-G422, G26-G422, A27-G422, G28-G422, G29-G422, G30-G422, P31-G422, G32-G422, G33-G422, G34-G422, P35-G422, G36-G422, P37-G422, G38-G422, P39-G422,
20 C40-G422, L41-G422, R42-G422, R43-G422, E44-G422, L45-G422, K46-G422, L47-G422, L48-G422, E49-G422, S50-G422, I51-G422, F52-G422, H53-G422, R54-G422, G55-G422, H56-G422, E57-G422, R58-G422, F59-G422, R60-G422, I61-G422, A62-G422, S63-G422, A64-G422, C65-G422, L66-G422, D67-G422, E68-G422, L69-G422, S70-G422, C71-G422, E72-G422, F73-G422, L74-G422, L75-G422, A76-G422, G77-G422, A78-G422, G79-G422, G80-G422, A81-G422, G82-G422, A83-G422, G84-G422, A85-G422, A86-G422, P87-G422, G88-G422, P89-G422, H90-G422, L91-G422, P92-G422, P93-G422, R94-G422, G95-G422, S96-G422, V97-G422, P98-G422, G99-G422, D100-G422, P101-G422, V102-G422, R103-G422, I104-G422, H105-G422, C106-G422, N107-G422, I108-G422, T109-G422, E110-G422, S111-G422, Y112-G422, P113-G422, A114-G422, V115-G422,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 116 -

P116-G422, P117-G422, I118-G422, W119-G422, S120-G422, V121-G422,
E122-G422, S123-G422, D124-G422, D125-G422, P126-G422, N127-
G422, L128-G422, A129-G422, A130-G422, V131-G422, L132-G422, E133-
G422, R134-G422, L135-G422, V136-G422, D137-G422, I138-G422, K139-
5 G422, K140-G422, G141-G422, N142-G422, T143-G422, L144-G422,
L145-G422, L146-G422, Q147-G422, H148-G422, L149-G422, K150-G422,
R151-G422, I152-G422, I153-G422, S154-G422, D155-G422, L156-G422,
C157-G422, K158-G422, L159-G422, Y160-G422, N161-G422, L162-G422,
P163-G422, Q164-G422, H165-G422, P166-G422, D167-G422, V168-
10 G422, E169-G422, M170-G422, L171-G422, D172-G422, Q173-G422,
P174-G422, L175-G422, P176-G422, A177-G422, E178-G422, Q179-G422,
C180-G422, T181-G422, Q182-G422, E183-G422, D184-G422, V185-
G422, S186-G422, S187-G422, E188-G422, D189-G422, E190-G422,
D191-G422, E192-G422, E193-G422, M194-G422, P195-G422, E196-
15 G422, D197-G422, T198-G422, E199-G422, D200-G422, L201-G422,
D202-G422, H203-G422, Y204-G422, E205-G422, M206-G422, K207-
G422, E208-G422, E209-G422, E210-G422, P211-G422, A212-G422,
E213-G422, G214-G422, K215-G422, K216-G422, S217-G422, E218-G422,
D219-G422, D220-G422, G221-G422, I222-G422, G223-G422, K224-G422,
20 E225-G422, N226-G422, L227-G422, A228-G422, I229-G422, L230-G422,
E231-G422, K232-G422, I233-G422, K234-G422, K235-G422, N236-G422,
Q237-G422, R238-G422, Q239-G422, D240-G422, Y241-G422, L242-
G422, N243-G422, G244-G422, A245-G422, V246-G422, S247-G422,
G248-G422, S249-G422, V250-G422, Q251-G422, A252-G422, T253-
25 G422, D254-G422, R255-G422, L256-G422, M257-G422, K258-G422,
E259-G422, L260-G422, R261-G422, D262-G422, I263-G422, Y264-G422,
R265-G422, S266-G422, Q267-G422, S268-G422, F269-G422, K270-G422,
G271-G422, G272-G422, N273-G422, Y274-G422, A275-G422, V276-
G422, E277-G422, L278-G422, V279-G422, N280-G422, D281-G422,
30 S282-G422, L283-G422, Y284-G422, D285-G422, W286-G422, N287-
G422, V288-G422, K289-G422, L290-G422, L291-G422, K292-G422, V293-

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 117 -

G422, D294-G422, Q295-G422, D296-G422, S297-G422, A298-G422,
 L299-G422, H300-G422, N301-G422, D302-G422, L303-G422, Q304-G422,
 I305-G422, L306-G422, K307-G422, E308-G422, K309-G422, E310-G422,
 G311-G422, A312-G422, D313-G422, F314-G422, I315-G422, L316-G422,
 5 L317-G422, N318-G422, F319-G422, S320-G422, F321-G422, K322-G422,
 D323-G422, N324-G422, F325-G422, P326-G422, F327-G422, D328-G422,
 P329-G422, P330-G422, F331-G422, V332-G422, R333-G422, V334-G422,
 V335-G422, S336-G422, P337-G422, V338-G422, L339-G422, S340-G422,
 G341-G422, G342-G422, Y343-G422, V344-G422, L345-G422, G346-
 10 G422, G347-G422, G348-G422, A349-G422, I350-G422, C351-G422,
 M352-G422, E353-G422, L354-G422, L355-G422, T356-G422, K357-G422,
 Q358-G422, G359-G422, W360-G422, S361-G422, S362-G422, A363-
 G422, Y364-G422, S365-G422, I366-G422, E367-G422, S368-G422, V369-
 G422, I370-G422, M371-G422, Q372-G422, I373-G422, S374-G422, A375-
 15 G422, T376-G422, L377-G422, V378-G422, K379-G422, G380-G422,
 K381-G422, A382-G422, R383-G422, V384-G422, Q385-G422, F386-G422,
 G387-G422, A388-G422, N389-G422, K390-G422, S391-G422, Q392-
 G422, Y393-G422, S394-G422, L395-G422, T396-G422, R397-G422,
 A398-G422, Q399-G422, Q400-G422, S401-G422, Y402-G422, K403-
 20 G422, S404-G422, L405-G422, V406-G422, Q407-G422, I408-G422, H409-
 G422, E410-G422, K411-G422, N412-G422, G413-G422, W414-G422,
 Y415-G422, and/or T416-G422 (of SEQ ID NO:2). Polynucleotide
 sequences encoding these polypeptides are also provided. One or more of
 these N-terminal RATL1d6 deletion polypeptides can be employed as
 25 immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

Also, preferably, the following C-terminal RATL1d6 deletion
 polypeptides of SEQ ID NO:2 are encompassed by the present invention:

M1-G422, M1-D421, M1-E420, M1-K419, M1-P418, M1-P417, M1-T416,
 M1-Y415, M1-W414, M1-G413, M1-N412, M1-K411, M1-E410, M1-H409,
 30 M1-I408, M1-Q407, M1-V406, M1-L405, M1-S404, M1-K403, M1-Y402, M1-
 S401, M1-Q400, M1-Q399, M1-A398, M1-R397, M1-T396, M1-L395, M1-

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 118 -

S394, M1-Y393, M1-Q392, M1-S391, M1-K390, M1-N389, M1-A388, M1-G387, M1-F386, M1-Q385, M1-V384, M1-R383, M1-A382, M1-K381, M1-G380, M1-K379, M1-V378, M1-L377, M1-T376, M1-A375, M1-S374, M1-I373, M1-Q372, M1-M371, M1-I370, M1-V369, M1-S368, M1-E367, M1-I366, M1-S365, M1-Y364, M1-A363, M1-S362, M1-S361, M1-W360, M1-G359, M1-Q358, M1-K357, M1-T356, M1-L355, M1-L354, M1-E353, M1-M352, M1-C351, M1-I350, M1-A349, M1-G348, M1-G347, M1-G346, M1-L345, M1-V344, M1-Y343, M1-G342, M1-G341, M1-S340, M1-L339, M1-V338, M1-P337, M1-S336, M1-V335, M1-V334, M1-R333, M1-V332, M1-F331, M1-P330, M1-P329, M1-D328, M1-F327, M1-P326, M1-F325, M1-N324, M1-D323, M1-K322, M1-F321, M1-S320, M1-F319, M1-N318, M1-L317, M1-L316, M1-I315, M1-F314, M1-D313, M1-A312, M1-G311, M1-E310, M1-K309, M1-E308, M1-K307, M1-L306, M1-I305, M1-Q304, M1-L303, M1-D302, M1-N301, M1-H300, M1-L299, M1-A298, M1-S297, M1-D296, M1-Q295, M1-D294, M1-V293, M1-K292, M1-L291, M1-L290, M1-K289, M1-V288, M1-N287, M1-W286, M1-D285, M1-Y284, M1-L283, M1-S282, M1-D281, M1-N280, M1-V279, M1-L278, M1-E277, M1-V276, M1-A275, M1-Y274, M1-N273, M1-G272, M1-G271, M1-K270, M1-F269, M1-S268, M1-Q267, M1-S266, M1-R265, M1-Y264, M1-I263, M1-D262, M1-R261, M1-L260, M1-E259, M1-K258, M1-M257, M1-L256, M1-R255, M1-D254, M1-T253, M1-A252, M1-Q251, M1-V250, M1-S249, M1-G248, M1-S247, M1-V246, M1-A245, M1-G244, M1-N243, M1-L242, M1-Y241, M1-D240, M1-Q239, M1-R238, M1-Q237, M1-N236, M1-K235, M1-K234, M1-I233, M1-K232, M1-E231, M1-L230, M1-I229, M1-A228, M1-L227, M1-N226, M1-E225, M1-K224, M1-G223, M1-I222, M1-G221, M1-D220, M1-D219, M1-E218, M1-S217, M1-K216, M1-K215, M1-G214, M1-E213, M1-A212, M1-P211, M1-E210, M1-E209, M1-E208, M1-K207, M1-M206, M1-E205, M1-Y204, M1-H203, M1-D202, M1-L201, M1-D200, M1-E199, M1-T198, M1-D197, M1-E196, M1-P195, M1-M194, M1-E193, M1-E192, M1-D191, M1-E190, M1-D189, M1-E188, M1-S187, M1-S186, M1-V185, M1-D184, M1-E183, M1-Q182, M1-T181, M1-C180, M1-Q179, M1-E178, M1-

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 119 -

A177, M1-P176, M1-L175, M1-P174, M1-Q173, M1-D172, M1-L171, M1-M170, M1-E169, M1-V168, M1-D167, M1-P166, M1-H165, M1-Q164, M1-P163, M1-L162, M1-N161, M1-Y160, M1-L159, M1-K158, M1-C157, M1-L156, M1-D155, M1-S154, M1-I153, M1-I152, M1-R151, M1-K150, M1-L149, M1-H148, M1-Q147, M1-L146, M1-L145, M1-L144, M1-T143, M1-N142, M1-G141, M1-K140, M1-K139, M1-I138, M1-D137, M1-V136, M1-L135, M1-R134, M1-E133, M1-L132, M1-V131, M1-A130, M1-A129, M1-L128, M1-N127, M1-P126, M1-D125, M1-D124, M1-S123, M1-E122, M1-V121, M1-S120, M1-W119, M1-I118, M1-P117, M1-P116, M1-V115, M1-N107, M1-C106, M1-H105, M1-I104, M1-R103, M1-V102, M1-P101, M1-D100, M1-G99, M1-P98, M1-V97, M1-S96, M1-G95, M1-R94, M1-P93, M1-P92, M1-L91, M1-H90, M1-P89, M1-G88, M1-P87, M1-A86, M1-A85, M1-G84, M1-A83, M1-G82, M1-A81, M1-G80, M1-G79, M1-A78, M1-G77, M1-A76, M1-L75, M1-L74, M1-F73, M1-E72, M1-C71, M1-S70, M1-L69, M1-E68, M1-D67, M1-L66, M1-C65, M1-A64, M1-S63, M1-A62, M1-I61, M1-R60, M1-F59, M1-R58, M1-E57, M1-H56, M1-G55, M1-R54, M1-H53, M1-F52, M1-I51, M1-S50, M1-E49, M1-L48, M1-L47, M1-K46, M1-L45, M1-E44, M1-R43, M1-R42, M1-L41, M1-C40, M1-P39, M1-G38, M1-P37, M1-G36, M1-P35, M1-G34, M1-G33, M1-G32, M1-P31, M1-G30, M1-G29, M1-G28, M1-A27, M1-G26, M1-P25, M1-A24, M1-A23, M1-G22, M1-Q21, M1-G20, M1-G19, M1-L18, M1-Q17, M1-Q16, M1-G15, M1-P14, M1-G13, M1-P12, M1-Q11, M1-Q10, M1-Q9, M1-G8, and/or M1-Q7 (of SEQ ID NO:2).

Polynucleotide sequences encoding these polypeptides are also provided.

25 One or more of these C-terminal RATL1d6 deletion polypeptides can be used as immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

Alternatively, preferred polypeptides/peptides of the present invention comprise polypeptide/peptide sequences corresponding to, for example, internal regions of the RATL1d6 polypeptide (e.g., any combination of both N- and C-terminal RATL1d6 polypeptide deletions) of

SEQ ID NO:2. For example, internal regions can be defined by the equation: amino acid "NX" to amino acid "CX", where "NX" refers to any N-terminal deletion polypeptide amino acid of RATL1d6 (SEQ ID NO:2), and where "CX" refers to any C-terminal deletion polypeptide amino acid of RATL1d6 (SEQ ID NO:2). Polynucleotides encoding these polypeptides are also provided. The present invention also encompasses the use of these polypeptides as an immunogenic and/or antigenic epitope as described elsewhere herein.

Example 13

10 Expression Profiling of the Human RATL1D6 Polypeptide

The following PCR primer pair was used to measure the steady state levels of RATL1d6 mRNA by quantitative PCR:

Sense: 5'- aggatcatctccgacctgtg -3' (SEQ ID NO:48)

Antisense: 5'- caagggttgatccagcatct -3' (SEQ ID NO:49)

15 Briefly, first strand cDNA was produced from commercially available mRNA (Clontech, Palo Alto, CA), i.e., the mRNA obtained from the 15 tissues analyzed in the expression profile of Fig. 6. The relative amount of cDNA used in each assay was determined by performing a parallel experiment using a primer pair for a gene expressed in equal amounts in all 20 tissues, i.e., cyclophilin. The cyclophilin primer pair detected small variations in the amount of cDNA in each sample and these data were used for normalization of the data obtained with the primer pair for the RATL1d6 gene.

The PCR data were converted into a relative assessment of 25 the differences in transcript abundance among the tissues tested, as presented in Fig. 6. Transcripts corresponding to the ubiquitin conjugating enzyme, RATL1D6, were expressed at high levels in many tissues: predominately in testis, spleen, and spinal cord; significantly in thymus, small intestine, and to a lesser extent in prostate, lung, bone marrow, 30 kidney, brain, liver, heart, lymph node, pituitary, and pancreas tissues. The

ubiquitous expression of the RATL1d6 polypeptide is consistent with its important role as a ubiquitin conjugating enzyme, and affirms its function as an essential enzyme in a variety of cellular processes.

Example 14

5 **Functional Studies of RATL1d6 involving *Drosophila* ortholog EG:25E8.2 in an LPS-inducible luciferase reporter system**

A stable S2 cell line was generated with an LPS-responsive AttacinD promoter fused to a luciferase reporter (modified as described below from Tauszig, S. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:10520-10525). S2 cells were purchased from Invitrogen and maintained at 25° C in complete 1 x Schneider's *Drosophila* medium (Cat. No. 11720-034, Invitrogen, former GIBCO BRL) supplemented to contain 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Cat. No. 10100-147, Invitrogen, former GIBCO BRL), 100 units/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin (100 X stock of Penicillin-Streptomycin, Cat. No. 15140-148, from Invitrogen, former GIBCO BRL) and 20 mM L-Glutamine (100 x L-Glutamine, Cat. No. 25030-148, from Invitrogen, former GIBCO BRL).

A 1.6 Kb promoter region of the attacinD AMP gene was isolated from S2 genomic DNA by PCR using the primer pair:
20 5' - atgaggctggatcagcttt - 3' (SEQ ID NO:50), (forward, 157904-157923bp of AE003718 *Drosophila* Genome project) and
5' - cctgaagcctgacattccat - 3' (SEQ ID NO:51), (reversed, 159547-159566bp of AE003718). Primers were obtained from GIBCOBRL. PCR
25 conditions were as follows: 96°C, 4min; 94°C, 2 min; 55°C, 45 seconds; 72°C, 2min; PCR 35 cycles. The 1.6kb attacinD PCR fragment was subcloned into a pCR2.1-TOPO vector (TOPO TA Cloning Kits, Cat. No. K4500-01, Invitrogen). The attacinD promoter was subcloned from pCR2.1-TOPO vector into the pGL3-Enhancer luciferase vector with restriction
30 enzymes SacI and XhoI (pGL3-Enhancer luciferase reporter vector, Cat. No. E1771, Promega). A similar region was shown to be LPS responsive in a

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 122 -

reporter assay (Tauszig, S. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:10520-10525).

A final transfection construct, pGL3-enhancer-attacinD, was co-transfected using known calcium phosphate method with pCoHYGRO plasmid providing the hygromycin-B resistant gene as a stable selection. This construct was used to transfect S2 cells (Inducible DES Kit, Cat. No. K4120-01, Drosophila Expression System Instruction Manual, Invitrogen).

Briefly 19 µg of pGL3-enhancer-attacinD DNA was mixed with 1 µg of pCoHYGRO DNA and transfection buffer and the mixture was used to transfect 6-12 x 10⁶ cells/3 ml/well in a 6-well Falcon tissue culture plate. Stable cells were selected and maintained in complete Schneider's medium containing 300 µg/ml Hygromycin-B (Cat. No. R220-05, Invitrogen). Stable lines were tested for responsiveness to LPS (Han, Z.S. and Ip, Y.T., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274:21355-21361). Cells were treated with 20 µg/ml LPS (Cat. No. L-2654, Sigma) for 5 hours. Luciferase expression was assayed with Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Cat. No. E2620, Promega) and the luminescence signal was detected by a 1450 MICROBETA Wallac Jet Liquid Scintillation & Luminescence Counter (Perkin Elmer Life Sciences). Two stable AttD-luc reporter cell lines (E4-1 and E4-9) were obtained after three rounds of limiting dilution and used for further studies.

RNAi constructs were made for EG:25E8.2 and control genes as follows: Complementary DNA (cDNA) clones for *Drosophila* genes were obtained from Research Genetics, Inc (St. Louis, MO). These included the cDNAs from Rellish (EST GH01881), IKKB (EST LD21354), Cactus (LD18620), and EG:25E8.2 (LD09991) (Rubin, G.M. et al., 2000, *Science*, 287:2222-2224). Double-stranded RNAi was generated following a modified protocol of (Hammond, S.M. et al., 2000, *Nature*, 404:293-0296). Briefly, dsRNA was synthesized from a template amplified by PCR with T7 promoter sequences flanking the cDNA insert using the MEGAscript™ T7 High Yield Transcription Kit (Cat. No. 1334, Ambion). GH0881 and LD 21354 were used in the pOT2 vector,

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 123 -

- (forward primer: 5' - actgcagccgattcattaatg - 3', (SEQ ID NO:52), (reverse primer: 5' -- gaattaatacgaactactatagggagatatacacatacagatttag -- 3'), (SEQ ID NO:53); and LD18620 and CG 2924 were used in a pBS vector
- 5 (forward primer: 5' -- gaattaatacgaactactatagggagacatgattacgccaagctcgaa -- 3'), (SEQ ID NO:54);
(reverse primer: 5' - tgiataaacgacggccagtgaa - 3'), (SEQ ID NO:55).
Double stranded RNA (dsRNA) was diluted at 1:5 and denatured prior to addition to E4-1 and E4-9 cells.
- 10 Transfection of dsRNA into S2 cells was performed by adding dsRNA directly into S2 cells in serum free medium (Clemens, J.C. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:6499-6503). Prior to transfection, the cells were passaged about 24 hours before transfection at 1×10^6 cells/ml in complete 1x Schneider medium. Immediately preceding the transfection,
- 15 the cells were washed twice with serum free DES Expression Medium (Cat. No. Q500-01, Invitrogen) and resuspended in serum-free DES medium at 7×10^6 cells/ml.
 $100 \mu\text{l}$ of cells were added to each well in 96-well tissue culture plates (Falcon). Thereafter, $5 \mu\text{l}$ of dsRNA/well were added, followed by
- 20 vigorous shaking for 45 minutes to 1 hour. Finally, $150 \mu\text{l}$ complete 1x Schneider medium/well was added. The 96-well plates were covered with Saran Wrap before incubating at 25°C . After 3 days of incubation, each of the dsRNA treated cells were split into duplicates for the luciferase assay, and into triplicates for the proliferation assay.
- 25 $5-15 \mu\text{l}$ of cells in $100 \mu\text{l}$ total volume for were used for the luciferase assay, and $30-35 \mu\text{l}$ of cells in $100 \mu\text{l}$ total volume were used for the proliferation assay. Luciferase assay plates were incubated for 5 hours after adding LPS at $20 \mu\text{g/ml}$. Proliferation assay plates were incubated for 2-3 hours before reading at 490nm Optical Density. (CellTiter 96 Aqueous
- 30 One Solution Cell Proliferation Assay from Promega, Cat. No. G3580).

The results presented in Table 3 represent the results of one experiment with E4-1 cells averaged in duplicate relative to control samples. Changes are relative to 1.00, with 1.00 representing the Control sample's relative luciferase activity after normalization with cell number obtained in the proliferation assay, as averaged from several experiments. Similar results were obtained in multiple, repeat experiments and with the E4-9 stable cell line. In Table 3, NS signified non-stimulated and LPS denotes the LPS treatment as described above.

Table 3

10

	NS	LPS
Control	1.2	0.8
EG:25E8.2 (<i>Drosophila</i> ortholog)	4.65	6.9
IκK-B	0.33	0.2
Relish	0.12	0.04
Cactus	6.9	9.65

The results from these analyses and presented in Table 3 indicate that EG:25E8.2 serves as a negative regulator in an innate immunity model in *Drosophila* cells, with a similar profile as cactus (IκB). RNAi experiments of positive regulators of this signaling pathway were found to have low luciferase activity as demonstrated with IκKB and Relish (Silverman, N. et al., 2000, *Genes Dev.*, 14:2461-2471). These results demonstrate that EG:25E8.2 does regulate the LPS-response pathway. Similarly, RATL1d6, due to its similarity to EG:25E8.2, is expected to have a similar role in mammalian immunity pathways.

20

Example 15**Site Directed/Site-Specific Mutagenesis**

in vitro site-directed mutagenesis is an invaluable technique for studying protein structure-function relationships and gene expression, for example, as well as for vector modification. Approaches utilizing single stranded DNA (ssDNA) as the template have been reported (e.g., T.A. Kunkel et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*), 82:488-492; M.A. Vandeyar et al., 1988, *Gene*, 85(1):129-133; M. Sugimoto et al., 1989, *Anal. Biochem.*, 179(2):309-311; and J.W. Taylor et al., 1985, *Nuc. Acids. Res.*, 13(24):8765-8785).

The use of PCR in site-directed mutagenesis accomplishes strand separation by using a denaturing step to separate the complementary strands and to allow efficient polymerization of the PCR primers. PCR site-directed mutagenesis methods thus permit site specific mutations to be incorporated in virtually any double stranded plasmid, thus eliminating the need for re-subcloning into M13-based bacteriophage vectors or single-stranded rescue. (M.P. Weiner et al., 1995, *Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends*, Eds. A.M. Griffin and H.G. Griffin, Horizon Scientific Press, Norfolk, UK; and C. Papworth et al., 1996, *Strategies*, 9(3):3-4).

A protocol for performing site-directed mutagenesis, particularly employing the QuikChange™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA; U.S. Patent Nos. 5,789,166 and 5,923,419) is provided for making point mutations, to switch or substitute amino acids, and to delete or insert single or multiple amino acids in the RATL1d6 amino acid sequence of this invention.

Primer Design

For primer design using this protocol, the mutagenic oligonucleotide primers are designed individually according to the desired mutation. The following considerations should be made for designing mutagenic primers: 1) Both of the mutagenic primers must contain the

desired mutation and anneal to the same sequence on opposite strands of the plasmid; 2) Primers should be between 25 and 45 bases in length, and the melting temperature (T_m) of the primers should be greater than, or equal to, 78°C. The following formula is commonly used for estimating the T_m of primers: $T = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N - \%mismatch$. For calculating T_m , N is the primer length in bases; and values for %GC and % mismatch are whole numbers. For calculating T_m for primers intended to introduce insertions or deletions, a modified version of the above formula is employed: $T = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N$, where N does not include the bases which are being inserted or deleted; 3) The desired mutation (deletion or insertion) should be in the middle of the primer with approximately 10-15 bases of correct sequence on both sides; 4) The primers optimally should have a minimum GC content of 40%, and should terminate in one or more C or G bases; 5) Primers need not be 5'-phosphorylated, but must be purified either by fast polynucleotide liquid chromatography (FPLC) or by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Failure to purify the primers results in a significant decrease in mutation efficiency; and 6) It is important that primer concentration is in excess. It is suggested to vary the amount of template while keeping the concentration of the primers constantly in excess (QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA).

Protocol for Setting Up the Reactions

Using the above-described primer design, two complimentary oligonucleotides containing the desired mutation, flanked by unmodified nucleic acid sequence, are synthesized. The resulting oligonucleotide primers are purified.

A control reaction is prepared using 5 μ l 10x reaction buffer (100mM KCl; 100mM $(NH_4)_2SO_4$; 200mM Tris-HCl, pH 8.8; 20mM $MgSO_4$; 1% Triton® X-100; 1 mg/ml nuclease-free bovine serum albumin, BSA); 2 μ l (10ng) of pWhitescript™, 4.5-kb control plasmid (5 ng/ μ l); 1.25 μ l (125 ng) of oligonucleotide control primer #1 (34-mer, 100 ng/ μ l); 1.25 μ l (125 ng) of oligonucleotide control primer #2 (34-mer, 100 ng/ μ l); 1 μ l of dNTP mix;

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 127 -

double distilled H₂O; to a final volume of 50 μ l. Thereafter, 1 μ l of DNA polymerase (*PfuTurbo*[®] DNA Polymerase, Stratagene), (2.5U/ μ l) is added. *PfuTurbo*[®] DNA Polymerase is stated to have 6-fold higher fidelity in DNA synthesis than does *Taq* polymerase. To maximize temperature cycling performance, use of thin-walled test tubes is suggested to ensure optimum contact with the heating blocks of the temperature cycler.

The sample reaction is prepared by combining 5 μ l of 10x reaction buffer; x μ l (5-50 ng) of dsDNA template; x μ l (125 ng) of oligonucleotide primer #1; x μ l (5-50 ng) of dsDNA template; x μ l (125 ng) of oligonucleotide primer #2; 1 μ l of dNTP mix; and ddH₂O to a final volume of 50 μ l. Thereafter, 1 μ l of DNA polymerase (*PfuTurbo* DNA Polymerase, Stratagene), (2.5U/ μ l) is added.

It is suggested that if the thermal cycler does not have a hot-top assembly, each reaction should be overlaid with approximately 30 μ l of mineral oil.

Cycling the Reactions

Each reaction is cycled using the following cycling parameters:

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	30 seconds
2	12-18	95°C	30 seconds
		55°C	1 minute
		68°C	2 minutes/kb of plasmid length

For the control reaction, a 12-minute extension time is used and the reaction is run for 12 cycles. Segment 2 of the above cycling parameters is adjusted in accordance with the type of mutation desired. For example, for point mutations, 12 cycles are used; for single amino acid changes, 16 cycles are used; and for multiple amino acid deletions or insertions, 18 cycles are used. Following the temperature cycling, the reaction is placed on ice for 2 minutes to cool the reaction to $\leq 37^\circ\text{C}$.

Digesting the Products and Transforming Competent Cells

One μ l of the *DpnI* restriction enzyme (10U/ μ l) is added directly (below mineral oil overlay) to each amplification reaction using a small, pointed pipette tip. The reaction mixture is gently and thoroughly mixed by pipetting the solution up and down several times. The reaction mixture is then centrifuged for 1 minute in a microcentrifuge. Immediately thereafter, each reaction is incubated at 37°C for 1 hour to digest the parental (i.e., the non-mutated) supercoiled dsDNA.

Competent cells (i.e., XL1-Blue supercompetent cells, Stratagene) are thawed gently on ice. For each control and sample reaction to be transformed, 50 μ l of the supercompetent cells are aliquotted to a prechilled test tube (Falcon 2059 polypropylene). Next, 1 μ l of the *DpnI*-digested DNA is transferred from the control and the sample reactions to separate aliquots of the supercompetent cells. The transformation reactions are gently swirled to mix and incubated for 30 minutes on ice. Thereafter, the transformation reactions are heat-pulsed for 45 seconds at 42°C for 2 minutes.

0.5 ml of NZY+ broth, preheated to 42°C is added to the transformation reactions which are then incubated at 37°C for 1 hour with shaking at 225-250 rpm. An aliquot of each transformation reaction is plated on agar plates containing the appropriate antibiotic for the vector. For the mutagenesis and transformation controls, cells are spread on LB-ampicillin agar plates containing 80 μ g/ml of X-gal and 20mM MIPTG. Transformation plates are incubated for >16 hours at 37°C.

Table 4
Sequence Listing Description

SEQ ID NO:	Description
SEQ ID NO:1	RATL1d6 nucleic acid sequence (FIG. 1)
SEQ ID NO:2	RATL1d6 polypeptide sequence (FIG. 3)
SEQ ID NO:3	<i>C. elegans</i> ortholog F2H2.8 (FIG. 4)
SEQ ID NO:4	<i>Drosophila</i> ortholog EG:25E8.2 (FIG. 4)
SEQ ID NO:5	E2 UBC P52483/mouse UB6B (FIG. 4)
SEQ ID NO:6	P27924/human UBC1/Huntingtin interacting protein (HIP) (FIG. 4)
SEQ ID NO:7	CAA72184/ <i>Drosophila</i> UBCE4 (FIG. 4)
SEQ ID NO:8	P14682/yeast UBC3/CDC34 (FIG. 4)
SEQ ID NO:9	PCR primer PY508, 5'-tgcagtcctggctcgggc-3'
SEQ ID NO:10	PCR primer PY509, 5'-ctgatctcatgactcctgac-3'
SEQ ID NO:11	oligonucleotide PY495 5'- tcactgcaacatcacggagtcataccctg -3'
SEQ ID NO:12	oligonucleotide PY496 5'- atgcagtcgaactcgtgaatgacagctctgt- 3'
SEQ ID NO:13	5' primer, N-terminal deletion (Example 12)
SEQ ID NO:14	3' primer, N-terminal deletion (Example 12)
SEQ ID NO:15	5' primer, C-terminal deletion (Example 12)
SEQ ID NO:16	3' primer, C-terminal deletion (Example 12)
SEQ ID NO:17	RATL1d6 polypeptide transmembrane domain
SEQ ID NO:18	PKC phosphorylation site polypeptide, GSVQATDRIMKEL
SEQ ID NO:19	PKC phosphorylation site polypeptide, IYRSQSFKGGNYA

SEQ ID NO:20	PKC phosphorylation site polypeptide, ILLNFSFKDNFFP
SEQ ID NO:21	PKC phosphorylation site polypeptide, TRAQSYKSLVQI
SEQ ID NO:22	Casein kinase II phosphorylation site polypeptide, PAEQCTQEDVSSSE
SEQ ID NO:23	Casein kinase II phosphorylation site polypeptide, TQEDVSSSEDEEM
SEQ ID NO:24	Casein kinase II phosphorylation site polypeptide, QEDVSSSEDEEMP
SEQ ID NO:25	Casein kinase II phosphorylation site polypeptide, AEGKKSIEDDGIGKE
SEQ ID NO:26	Casein kinase II phosphorylation site polypeptide, ELVNDSLYDWNVNL
SEQ ID NO:27	Casein kinase II phosphorylation site polypeptide, ILLNFSFKDNFFPD
SEQ ID NO:28	Asparagine glycosylation site polypeptide, VRIHCNITESYPAY
SEQ ID NO:29	Asparagine glycosylation site polypeptide, AVELVNDSLYDWNV
SEQ ID NO:30	Asparagine glycosylation site polypeptide, DFILLNFSFKDNFP
SEQ ID NO:31	Asparagine glycosylation site polypeptide, VQFGANKSQYSLTR
SEQ ID NO:32	N-myristylation site polypeptide, QQPGPGQLGGQGAAP
SEQ ID NO:33	N-myristylation site polypeptide, FQQQLGGQGAAPGAGG
SEQ ID NO:34	N-myristylation site polypeptide, QLGGQGAAPGAGGGPG
SEQ ID NO:35	N-myristylation site polypeptide, AAPGAGGGPGGGPGPG
SEQ ID NO:36	N-myristylation site polypeptide, APGAGGGPGGGPGPGP
SEQ ID NO:37	N-myristylation site polypeptide, EFLLAGAGGAGAGAAP
SEQ ID NO:38	N-myristylation site polypeptide, LLAGAGGAGAGAAPGF

SEQ ID NO:39	N-myristylation site polypeptide, LAGAGGAGAGAAGPH
SEQ ID NO:40	N-myristylation site polypeptide, HLPPRGSVPCDPVRIH
SEQ ID NO:41	N-myristylation site polypeptide, QDYLNQAVSGSVQATD
SEQ ID NO:42	N-myristylation site polypeptide, NGAVSGSVQATDRLMK
SEQ ID NO:43	N-myristylation site polypeptide, SQSFKGGNYAVELVND
SEQ ID NO:44	N-myristylation site polypeptide, GYVLGGGAICMELLTK
SEQ ID NO:45	N-myristylation site polypeptide, ARVQFGANKSQYSLTR
SEQ ID NO:46	Amidation site polypeptide, EEEEPAECKKSEDDG
SEQ ID NO:47	UBC Domain of RATL1d6
SEQ ID NO:48	RATL1d6 sense primer -- expression profiling, 5'- aggatcatctcgcactctg -3' (Example 13)
SEQ ID NO:49	RATL1d6 antisense primer -- expression profiling, 5'- caagggtgatccagcatct -3' (Example 13)
SEQ ID NO:50	Promoter region of attacinD AMP forward primer (Example 14), 5' - atgagctctggatcagcttt - 3'
SEQ ID NO:51	Promoter region of attacinD AMP reversed primer (Example 14), 5' -- cctgagcctgacatccat - 3'
SEQ ID NO:52	Forward primer -- dsDNA, 5' - actgcagcggattcaatg -3' (Example 14)
SEQ ID NO:53	Reverse primer -- dsDNA, 5' - gaattaatcagcactcactataggagatat catacacatcagattag - 3' (Example 14)
SEQ ID NO:54	Forward primer -- dsDNA, 5' - gaattaatcagcactcactataggagacat gattacgccaagctcga - 3' (Example 14)
SEQ ID NO:55	Reverse primer -- dsDNA, 5' - tgtaaacgacggccagtga - 3' (Example 14)

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 132 -

The contents of all patents, patent applications, published PCT applications and articles, books, references, reference manuals and abstracts cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety
5 to more fully describe the state of the art to which the invention pertains.

As various changes can be made in the above-described subject matter without departing from the scope and spirit of the present invention, it is intended that all subject matter contained in the above
10 description, or defined in the appended claims, be interpreted as descriptive and illustrative of the present invention. Many modifications and variations of the present invention are possible in light of the above teachings.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of:
 - (a) an isolated polynucleotide encoding a ubiquitin conjugating enzyme homologue comprising the amino acid sequence as set forth in
5 SEQ ID NO:2, or a fragment thereof;
 - (b) an isolated polynucleotide comprising SEQ ID NO:1;
 - (c) an isolated polynucleotide, or fragment thereof, encoding a ubiquitin conjugating enzyme amino acid sequence having at least 80% sequence identity with the sequence of SEQ ID NO:2;
 - 10 (d) an isolated polynucleotide having the nucleic acid sequence of ATCC Accession No. PTA-3745;
 - (e) an isolated polynucleotide having the nucleic acid sequence according to nucleotides 517 to 1782 of SEQ ID NO:1, wherein said nucleotides encode a polypeptide of SEQ ID NO:2 minus the start codon;
 - 15 (f) an isolated polynucleotide having the nucleic acid sequence according to nucleotides 520 to 1782 of SEQ ID NO:1, wherein said nucleotides encode a polypeptide of SEQ ID NO:2 including the start codon;
 - (g) an isolated polynucleotide which is fully complementary to the polynucleotide according to (a) through (f).
- 20 2. A hybridization probe comprising the polynucleotide according to claim 1.
3. A composition comprising the isolated polynucleotide according to claim 1.
4. An expression vector containing the polynucleotide according to claim
25 1.
5. A host cell containing the expression vector according to claim 4.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 134 -

6. A substantially purified ubiquitin conjugating (UBC) enzyme polypeptide selected from the group consisting of:
- (a) a ubiquitin conjugating enzyme polypeptide having the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2;
 - 5 (b) a ubiquitin conjugating enzyme polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 80% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:2;
 - (c) a polypeptide according to (a), wherein the amino acid sequence differs from SEQ ID NO:2 only by conservative substitutions;
 - 10 (d) a polypeptide according to (a), wherein the amino acid sequence has at least 90% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:2;
 - (e) an isolated ubiquitin conjugating enzyme polypeptide encoded by the nucleic acid sequence of ATCC Accession No. PTA-3745;
 - 15 (f) an isolated polypeptide having the amino acid sequence according to amino acids 2 to 422 of SEQ ID NO:2, wherein said amino acid encode a polypeptide of SEQ ID NO:2 minus the start methionine;
 - (g) an isolated polypeptide having the amino acid sequence according to amino acids 1 to 422 of SEQ ID NO:2, wherein said amino acid
20 encode a polypeptide of SEQ ID NO:2 including the start methionine;
 - (h) an isolated polypeptide having the transmembrane domain region set forth in SEQ ID NO:17; and
 - (i) a substantially purified fragment of the ubiquitin conjugating enzyme polypeptide according to any one of (a) to (h).
- 25 7. A substantially purified ubiquitin conjugating enzyme fusion protein comprising an amino acid sequence having at least 80% sequence identity to the sequence as set forth in SEQ ID NO:2 and an amino acid sequence of an Fc portion of a human immunoglobulin protein.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 135 -

8. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide according to claim 6, or a functional portion thereof, and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, or excipient.
9. A pharmaceutical composition comprising the fusion protein according to claim 7, and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, or excipient.
10. A purified antibody which binds specifically to the polypeptide according to claim 6, or an antigenic epitope thereof.
11. A method of screening for candidate compounds capable of binding to and/or modulating activity of a ubiquitin conjugating enzyme, comprising:
- (a) contacting a test compound with a substantially or partially purified polypeptide according to claim 6; and
- (b) selecting as candidate compounds those test compounds that bind to and/or modulate activity of the polypeptide.
12. The method according to claim 11, wherein the candidate compounds are small molecules, therapeutics, biological agents, or drugs.
13. A method of treating a cancer or tumor, comprising administering an antagonist or inhibitor of the ubiquitin conjugating enzyme polypeptide according to claim 6 in an amount effective to block ubiquitination of a tumor suppressor gene in cancer or tumor cells.
14. A method of suppressing the immune response in a subject requiring said suppression, comprising administering a modulator of the ubiquitin conjugating enzyme polypeptide according to claim 6 in an amount effective to cause immunosuppression.
15. A method of treating an immune or neuronal disorder in a mammal comprising administering the ubiquitin conjugating enzyme polypeptide

WO 02/36741

PCT/US01/46559

- 136 -

according to claim 6 in an amount effective to treat the immune or neuronal disorder.

16. A method of treating a cancer or tumor, an immune disorder, a lymphoproliferative disorder, or a neurodegenerative disorder, comprising:
- 5 administering to an individual in need of treatment or therapy an antagonist or inhibitor of the ubiquitin conjugating enzyme polypeptide according to claim 6 in an amount effective to treat the disease or disorder by blocking ubiquitination of a tumor suppressor gene in a cancer or tumor cell, a lymphoid cell, or a cell of the nervous system.
- 10 17. A method of treating cancers or tumors, immune disorders, lymphoproliferative disorders, or neurodegenerative disorders, comprising:
- administering to an individual in need of treatment or therapy an agonist of the ubiquitin conjugating enzyme polypeptide according to claim 6 in an amount effective to treat the disorder.
- 15 18. A kit for hybridization comprising the isolated polynucleotide according to claim 1, and instructions for use.

WO 02/36741

PCT/US01/46559

1/9

FIG. 1A

ctogctccctcctcctacttggataaactgtggttaattctagagctaaatacatgocgacgggc 60
gctgacccctctcgccggggggatgctgctcatttatcagatcaagaccaaccocggctcagc 120
cctctccggcccccggccggggggcgggcgcggcgctttggtagactctagataaactc 180
ggcccgatcgcacgccccccgtggcggcgaagccattcgaaagtctgacctatacaact 240
ttcgatggtagctcggcgtgcctaccatggtgaccacgggtgaacggggaatcaggggtoga 300
ttccggagaggggagcctgagaaacggctaccacatccaaggaaggcagcagggcggcaaa 360
ttaccactcccgagggtggcggcggcgcctcttgggaaggggggatcaggaagtgcg 420
gaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 480
ccggcccgccggcccccggagcggagcggagcggagcggagcggagcggagcggagcggagcgg 540
cagcagcagccggggccggggccagcagctggggggccaggggcggcggcggggcggcggg 600
ggcggcccgggggggcccccggcggggccctgcctgagggcagagctgaagctgctc 660
gagtcacatctccaccggggccacgagccttcgccttggcagcgcctgctggagcag 720
ctgagctgcgagttcctgctggctggggccggaggggccggggcggggcggcggcggcgg 780
ccgcatctccccccacgggggtcggtycctggggatcctgtccgcacccaactgcaacatc 840
accgagtcataacctgctgtgcctcccatctggctgggtggagctctgatgacctaacctg 900
gctgctgtcttggagaggctgggtggacataaagaagggaataactctgctattgcagcat 960
ctgaagaggatcactctcgacctgtgtaaacctataaacctccctcagatccagatgtg 1020
gagatgctggatcaaaccttgcagcagagcagtgcaacacaggaagcgtgtcttcagaa 1080
gatgaagatgaggagatgctgaggaacacagaagcttagatcaactgaaatgaaagag 1140
gaagagccagctgagggcaagaaatctgagatgatggcattggaagaagaacttggcc 1200
atcctagagaaatbaaaagaaccagaggcaagatcaactaaatggtgcagtgctcggc 1260
tcggctgcagccactgaccggctgatgaaggagctcagggatataaacgatccacagat 1320
ctcaaggcggaaactatgcagctgaaactcgtgaatgacagctgtatgatctggatgtc 1380
aaactcctcaaaagtggaccaggacagcggcttggcacaacgatctccagatcctcaagag 1440

WO 02/36741

PCT/US01/46559

2/9

FIG. 1B

```
aaagaaggagcgaacttattctacttaacttttctttaaagataactttccctttgac 1500
ccaccatttgcagggttggtctccagtcctctctggagggtatgtttctggggagggg 1560
gccatctgcabtggaacttctccaaaacagggtctggagcagtgccatctccatagagtca 1620
gtgatcatgcagatcagtcgccacctggtgaagggaagcagcagtgccagtttgagacc 1680
aacaaatctcaatacagctcagcaagagcaccagcagtcctacaagtccttggtgcagatc 1740
cacgaasaaaaaggctgtacacacccccaaaaagacggctaaccctggagtatcacc 1800
cttccctccctcccaggcaacctggaccaattaaccttgaatgctgatttggatctca 1860
cgctgctctgtggttccctccctcattttctctggcgtgatagctctgctattgag 1920
gacaatgatggctattctaaacgctaaggaaaaaaacaacacagaactgtttcaagta 1980
ctcaagatgacttacagaccaaccaacccttctggaacctctgctageaggcattc 2040
ttataaaagaactttcgagcctccttatattgctggaaactcagctgctccagacta 2100
gagcctccttacctatgctatggattttcaattttttctctatttcaatgtacactgc 2160
ttttttggttacagtgatgatggatgctgatgaaaaaatgtatctttgggaaaceaa 2220
ttacagtttgaatttgaaaaaaacacacacacacacacacacacacacacacacacac 2280
```

(SEQ ID NO:1)

4/9

FIG. 2B

NACMAATCTCAATACAGTCTGACAGAGACACAGCAGTCTACAGTCCCTTGGTGCAGATC
N K S Q Y S L T R A Q Q S Y K S L V Q I
CAGGAAAAAAGCGCTGGTACACACCCCAAAAGAGAGCGGTAAACCTGGAGTATCACC
H E K N G W Y T P P K B D G *
CTTCTCCCTCCCTCCACCCCTGGACCAATFACCTTTGATGCTGTATTTGGATCTCA
CGCTGCTCTGTGCTTCCCTCCCTCAATTTTCTGGACTGATGCTTTGGCTATGGCAG
GCATATGATGCTATTTCAAAGCTAAGGAAAAAACAACAGAGACTTCTTCACTA
CTCAAGACTGACTACAGACCACTCAACCACTTCTGGAACCTTGTAGCAGGCTTC
TTATAAAGAACTTTCGAGCCCTCTTATATGCTGGAACCTCAGCTGTGCTCAGACTA
GAGCTCTCTTACCTTGTCTATGGATTTTAAATTTATTTCTCTTATTGATGACACTGC
TTTTTTGGTACAGTGTATGATGGATGCTATGAAAAAATGTATCTTTGGAAAAACA
TTACAGTTTCTTATTTGAAAAAATAAAAAA

WO 02/36741

PCT/US01/46559

5/9
FIG. 3

```
MQQPQFQGGQ QFGFGQLGG QGAAPGAGGG PGGGPGGPGC 40
LRRELKLLLS IFHRGHERFR IASACLDLDS CEFLLAGRGG 80
AGAGAAPGPH LPPRGSVFGD PVRIHCNITE SYPAVPPHWS 120
VRSDDPNLAA VLERLVDIKK GNTLLQLHLK RIISDLCKLY 160
NLFQHPDVEM LDQPLPAEQC TQEDVSEDE DERMPEDTED 200
LDHYEMKEEB PABGKSEDD GIGKENLATL EKIKKQROD 240
YLMGAVSGSV QATDRMKEL RDIYRSQSFK GONYAVELVN 280
DSLIDWNVKL LKVDQDSALH NDLQILKEKE GADFILNFS 320
FKDNFFPDPP FVRVVSFVLS GGYVLGGAI CMELLTRQGW 360
SSAYSIRSVI MQISATLVKG KARVQFGANK SQYSLTRAQQ 400
SYKSLVQIHR KNGWYTPPKE DG 422
(SEQ ID NO:2)
```

WO 02/36741

PCT/US01/46559

6/9
FIG. 4

```

RATL1d6 (1) MCQPPQPPQQQQPPGPGQGLGGGQGAAPQMGSGGGGPGCPQPTRRRIKILDSIHREPEWELASAC 65
T21349_F25H2.8_Ce1 (1) -----MACLRITKEDIQVPELLKSNRNRGQALSAE
AAF45767_EG:25E8_Dr (1) -----MACLRITKQRIKIDKELIPKNSRSGQKNSSE

RATL1d6 (66) LSELSCEFLLAGAGGAGAGAAAPCPHLPFRGSPVFGDPEVRIHQITPESLTPAVPHIWSVSSODPNLAA 130
T21349_F25H2.8_Ce1 (32) VDELKMGKINAMN-----KG-----IIVTANZQENPFCPPITPFSRSDVFPVIG
AAF45767_EG:25E8_Dr (32) VDELKMGKIDXNG-----KR-----YDIHAKITPESLTPAVPHIWSVSSODVPTN

RATL1d6 (131) VLERINDVKKGNLMLLQHLKGIISDCKLYLFLQHPDVEMLDCL----- 195
T21349_F25H2.8_Ce1 (76) MSLQRLTETPEEETINLHQVHKLVSDGCFRQLQMPCELPQIARVIND-----IDSGRGGDI
AAF45767_EG:25E8_Dr (76) AVQILSNTRGRDNRHVIVQVGLLREELCRLEHVPGLPDDINDIALQLTFFPSASPLRCEQRPGGGG

RATL1d6 (176) -----RAGCTQRFVSSRDSSEMPEDTEDLRYEMKBESEFABQKKEBDDGIGRNDALDEKIK 260
T21349_F25H2.8_Ce1 (133) SUTTSREIQQDMAGDQGEVDIDPEEEDDEADDDITIVMAREDDPFSQHDVGVSRGQDMYDWS
AAF45767_EG:25E8_Dr (141) AGGGGGGKGNSETDSDGERTHPIGRSRQSRGQDMLPLMDQVRSYSKDDMEGKATLQMLR
P52483_UB6B_MOUSE (1) -----MSSDRQRSDDBSPSTSGGSPADQGRDP

RATL1d6 (235) KNGRQDYVAVVSGGVAATDRLAKKEDNINRSQFQENAVSLAVN-DGIDVNNVILKVVQDSM 326
T21349_F25H2.8_Ce1 (198) KINRQRDQGVGSGITVTRLKKERDIDHSEHFFNDIITHEEREMLQWIKIKAVYEDSP
AAF45767_EG:25E8_Dr (206) QSCQKDLVSSVSGGQVMDRLLKKTIDTIDQDAITKMGQITLVN-SSIPENRILKRSVDPSP
P52483_UB6B_MOUSE (28) AAKRPESEKKEKPSVQKRNKGLSSITAKLSTSAKRIQGLABITLIDPPNRCAGPQKQNYE
P27924_UBC1_HUMAN (1) -----KATLVGQVLRSEGVLAESSTSGGQVLDVQ
CAA72164_UBCD4_Dr (1) -----MAMVSELRKESVYVSEIVQCSILKLVN-----ENET-
P14682_UBC3_YEAST (1) -----MSRSTSGELIDQVEMITDPKKAIDSPHISGDD-----SHTPTV

RATL1d6 (299) -----LQILKKEKA-LDILNFGKRNPFDPFVAVVSEPLSGCGVILGCGNLCPELITKQK 390
T21349_F25H2.8_Ce1 (283) LFBKMKGRKDNQ-DHLSFSTIKKQPCDLPFVAVVAVKINQSVVGGALCVELLTKQK
AAF45767_EG:25E8_Dr (270) HSLDQVKEKQK-DRIITLTKRITYPFPPFVAVVAVKINQSVVGGALCVELLTKQK
P52483_UB6B_MOUSE (93) WSTLQCLPESVVEGQVPLDILHSSDYVPEPPQVGRTRVIGKINQSVVGGALCVELLTKQK
P27924_UBC1_HUMAN (39) CRGSLGPPPTTVEGGVYQERITETYPPEPPVRETRERHNNISVVAICLDLTKQK
CAA72164_UBCD4_Dr (39) CRGSLGPPPTTVEGGVYQERITETYPPEPPVRETRERHNNISVVAICLDLTKQK
P14682_UBC3_YEAST (43) NLSVWVNLGSLVGGESGQMPFEDPESLQFRTPAVTRNIVYD-SRLTSLKQSGDM

RATL1d6 (360) -----WSSAVSSESVLQSGATLVKQKQVQK-SANK-----SIVSQRAGQSGVSLQK 455
T21349_F25H2.8_Ce1 (324) -----WSSAVSSESLIQHATLVKQKRAIISLPAKHT-----SIVSQRAGQSGVSLQK
AAF45767_EG:25E8_Dr (331) -----WSSAVSSEVAVVQHATLVKQKRAIISLPAKHT-----SIVSQRAGQSGVSLQK
P52483_UB6B_MOUSE (153) -----WSPVITGVWLSLQGLVTCQKSGDILVQSGIAT-----VGLTNLGRHDIRIAQWT
P27924_UBC1_HUMAN (100) -----WAAVDELITLLSLQGLVAAAEQDQVAVVSN-----VGLTNLGRHDIRIAQWT
CAA72164_UBCD4_Dr (100) -----WAAVDELITLLSLQGLVAAAEQDQVAVVSN-----VGLTNLGRHDIRIAQWT
P14682_UBC3_YEAST (107) TDEPDABTVEVAVVVEVITVETVSLSDPNTINSVAVVAVNVTYRKNPEVYQVAVKMEVSEKDT

RATL1d6 (409) -----RERKSNVTPPKKNG 456
T21349_F25H2.8_Ce1 (374) -----RASECTFLQVPSHPFALHLVFFLGGDDFFKNGELKSRTPFTEPKLSFQGYLSSGLVLYSEKRL
AAF45767_EG:25E8_Dr (384) -----RERKSNVTPPKKNG
P52483_UB6B_MOUSE (203) -----KRLQAT
P27924_UBC1_HUMAN (150) -----RIVVAGAVSSSPKTEKIKCAWGPDRNAVIVALSSKSDVDTATRIKLSM
CAA72164_UBCD4_Dr (150) -----NAVAGCHTFPDCSFKIQPRDMGIDRHSARAVLSKRWNLKATRGLES
P14682_UBC3_YEAST (172) -----KNGFIMVISESAYLQKGLDSEPSKLMADNPFYDSDLDDKNGSVLQDDDYDDGNHIFPDD

RATL1d6 (439) ----- 579
T21349_F25H2.8_Ce1 (439) -----HHPFFTEFLIPQPPHIFPOLIPPLMRKIV
P14682_UBC3_YEAST (237) -----DVYVYVNDNDDDRIRHSDDDDDSDSINDSVMDRQKPHKABRSEGVEDVVRVSKKI

```


WO 02/36741

PCT/US01/46559

8/9

FIG. 5B

RAP1d6 BLAST results/alignment w/ c. elegans protein

>GCGPROT:O93571 F25H2.8 PROTEIN.

Length = 471

Score = 317 bits (805), Expect = 6e-86

Identities = 178/397 (44%), Positives = 247/397 (61%), Gaps = 49/397 (12%)

Query: 41 LRREKLLLESIPHRGHERPRIASACLDRLGCSPLLAGAGAGAGAGAAFGPHLPFRGSSVFGD 100

L+ +++++LE +P + H RF+I SR +DELS +P+ A G

Sbjct: 7 LKEDIQVLEKLFPRKHNRFQILSASVDSLSMKRFLNAENK----- 46

Query: 101 PVRIHCNITESYPA PINSVESDD-PNLAAVLERLVDIKKGNLTLQLHDKRIISDLCKL 159

+ + NI E+YP PPIIN ESDD P + L+RL + ++ +T +L + R++SDLC

Sbjct: 47 -IIVTANIQENYPRQPPINFSBESDDVPVIGMSIQRLITRES-SINILHGVHRLVSDLCSP 104

Query: 160 YNL-----POHDDVE-----MLDQPLPAGQCTQBDVSSDEDEEMVEDTE 199

YNL P D++ +P+ + +W +DE+EE ED +

Sbjct: 105 YNLQMFCELPQIAPPVREDIDEGRSDDISDTSRPIDDMDAGDSVDDDDDEBESDEEDAD 164

Query: 200 -DLDHYEMKSEEPAGKKSDDDGIGKENLAILEKIKKQKQDYLNAGVSGSVQATRLMK 258

D++ EM ES+P D G+ KE L +L+K+ K RQ +L+G V GS+ ATDRLMK

Sbjct: 165 GDIEIVEMAEEDPFS---QHDVGVSKEGLDMLDKVSKINRQQLDGRVQGSITATDRLMK 221

Query: 259 ELRDIYRSQSPKGNVAVELWND-SLYDNRVVKLVVDGDSALHNDLQIKKXKROADPIL 317

E+RDI+RS+ PK G Y EL + +LY W +KL KVD+DS L D+ LK+ D +D

Sbjct: 223 EIRDHRSEHPKNGIYTFELKKEENLYQWIKLHKVDESDLPEDMKLKKDHNQDRLEF 261

Query: 318 NPSFRDNFPFDPFVRVVS PVLGGGYVLGGGAIOMELDTKQWSSAYSIESVIMQISATL 377

+P+ + FF DPFVRV+P ++ G+VLGGGAIOMELDTKQWSSAYSIES I+QI+ATL

Sbjct: 262 SPTFNKFPDPPFVRVVAHPINQGFVLLGGGAIOMELDTKQWSSAYSIESCILQIAATL 341

Query: 378 VKGKARVQFGA-NKSQVSLTRAQCSYKSLVQIHSKNG 413

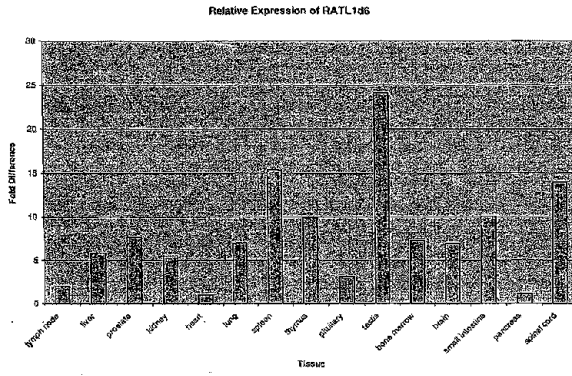
VKG+AR+ P A + S YS+ RAQCS+KSL QIK K+G

Sbjct: 342 VKGRARISPDAKHTITYSMAKQCSFKSLQCIHAKSG 378

WO 02/36741

PCT/US01/46559

9/9
FIG. 6



WO 02/36741

PCT/US01/46559

1/22

SEQUENCE LISTING

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

<120> POLYNUCLEOTIDE ENCODING AN ACTIVATED HUMAN T-LYMPHOCYTE-DERIVED PROTEIN RELATED TO UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME

<130> D0034PC

<140>

<141>

<150> 60/308,706

<151> 2001-07-30

<150> 60/244,688

<151> 2000-10-30

<160> 55

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2254

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (517)..(1782)

<400> 1

```

ctcgcctctc tcctacttgg ataactgtgg taattctaga gctaatacat gccgacgggc 60
gctgaccccc ttccgggggg ggatgcgtgc atttatcaga tcaagaccaa ccgggtcagc 120
ccctctccgg ccccggccgg gggcgggcgg ccggcggctt tggtagctct agataacctc 180
ggcgcgatcg cagcgcgcgc gtggcgccga cgaaccattc gaacgtctgc cctataaact 240
ttcgatggta gtgcgcgtgc ctaccatggt gaccacgggt gacggggaat cagggttcca 300
ttccggagag ggagcctgag aaacggctac cacatccaag gaaggcagca ggccgcgaaa 360
ttaccacctc ccggaggtgg cggcggcgcc atcttggcga aggggggata aggaagtgcg 420
gaccgcggcg scggcgggcg cggcggcgcc ggcggagccc ggagcgcagg ccggaggtcc 480
ccggcccgcc ggcccgggag cggagcggag cggagg atg cag cag ccg cag ccg 534
Met. Gln Gln Pro Gln Pro
1 5

```

WO 02/36741

PCT/US01/46559

2/22

cag ggg cag cag cag cgg ggg cgg ggg cag cag ctg ggg ggc cag ggg 582
 Gln Gly Gln Gln Gln Pro Gly Pro Gly Gln Gln Leu Gly Gly Gln Gly
 10 15 20

gcg gcg cgg ggg gcc ggg ggc ggc cca ggg ggg ggc ccg ggg ccg ggg 630
 Ala Ala Pro Gly Ala Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Pro Gly Pro Gly
 25 30 35

ccc tgc ctg agg cga gag ctg aag ctg ctg gag tcc atc ttc cac cgc 678
 Pro Cys Leu Arg Arg Glu Leu Lys Leu Leu Glu Ser Ile Phe His Arg
 40 45 50

ggc cac gag cgc ttc cgc att gcc agc gcc tgc ctg gac gag ctg agc 726
 Gly His Glu Arg Phe Arg Ile Ala Ser Ala Cys Leu Asp Glu Leu Ser
 55 60 65 70

tgc gag ttc ctg ctg gct ggg gcc gga ggg gcc ggg gcg ggg gcc cgc 774
 Cys Glu Phe Leu Leu Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala
 75 80 85

ccc gga cgg cat ctc ccc cca cgg ggg tgg gtg cct ggg gat cct gtc 822
 Pro Gly Pro His Leu Pro Pro Arg Gly Ser Val Pro Gly Asp Pro Val
 90 95 100

cgc atc cac tgc aac atc acg gag tca tac cct gct gtg ccc ccc atc 870
 Arg Ile His Cys Asn Ile Thr Glu Ser Tyr Pro Ala Val Pro Pro Ile
 105 110 115

tgg tgg gtg gag tct gat gac cct aac ttg gct gct gtc ttg gag agg 918
 Trp Ser Val Glu Ser Asp Asp Pro Asn Leu Ala Ala Val Leu Glu Arg
 120 125 130

ctg gtg gac ata aag aaa ggg aat act ctg cta ttg cag cat ctg aag 966
 Leu Val Asp Ile Lys Lys Gly Asn Thr Leu Leu Leu Gln His Leu Lys
 135 140 145

agg atc atc tcc gac ctg tgt aaa ctg tat aac ctg cct cag cat cca 1014
 Arg Ile Ile Ser Asp Leu Cys Lys Leu Tyr Asn Leu Pro Gln His Pro
 155 160 165

gat gtg gag atg ctg gat caa ccc ttg cca gca gag cag tgc aca cag 1062
 Asp Val Glu Met Leu Asp Gln Pro Leu Pro Ala Glu Gln Cys Thr Gln
 170 175 180

gaa gac gtg tct tca gaa gat gaa gat gag gag atg cct gag gac aca 1110
 Glu Asp Val Ser Ser Glu Asp Glu Asp Glu Glu Met Pro Glu Asp Thr
 185 190 195

gaa gac tta gat cac tat gaa atg aaa gag gaa gag cca gct gag ggc 1158
 Glu Asp Leu Asp His Tyr Glu Met Lys Glu Glu Glu Pro Ala Glu Gly
 200 205 210

aag aaa tct gaa gat gat ggc att gga aaa gaa aac ttg gcc atc cta 1206
 Lys Lys Ser Glu Asp Asp Gly Ile Gly Lys Glu Asn Leu Ala Ile Leu
 215 220 225 230

WO 02/36741

PCT/US01/46559

3/22

gag aaa att aaa aag aac cag agg caa gat tac tta aat ggt gca gtg 1254
 Glu Lys Ile Lys Lys Asn Gln Arg Gln Asp Tyr Leu Asn Gly Ala Val
 235 240 245

tct ggc tgg gtg cag gcc act gac cgg ctg atg aag gag ctc agg gat 1302
 Ser Gly Ser Val Gln Ala Thr Asp Arg Leu Met Lys Glu Leu Arg Asp
 250 255 260

ata tac cga tca cag agt ttc aaa ggc gga aac tat gca gtc gaa ctc 1350
 Ile Tyr Arg Ser Gln Ser Phe Lys Gly Gly Asn Tyr Ala Val Glu Leu
 265 270 275

gtg aat gac agt ctg tat gat tgg aat gtc aaa ctc ctc aaa gtt gac 1398
 Val Asn Asp Ser Leu Tyr Asp Trp Val Ser Val Lys Leu Leu Lys Val Asp
 280 285 290

cag gac agc gct ttg cac aac gat ctc cag atc ctc aaa gag aaa gaa 1446
 Gln Asp Ser Ala Leu His Asn Asp Leu Gln Ile Leu Lys Glu Lys Glu
 295 300 305 310

gga gcc gac ttc att cta ctt aac ttt tcc ttt aaa gat aac ttt ccc 1494
 Gly Ala Asp Phe Ile Leu Leu Asn Phe Ser Phe Lys Asp Asn Phe Pro
 315 320 325

ttt gac cca cca ttt gtc agg gtt gtg tct cca gtc ctc tct gga ggg 1542
 Phe Asp Pro Phe Val Arg Val Val Ser Pro Val Leu Ser Gly Gly
 330 335 340

tat gtt ctg ggc gga ggg gcc atc tgc atg gaa ctt ctc acc aaa cag 1590
 Tyr Val Leu Gly Gly Ala Ile Cys Met Glu Leu Leu Thr Lys Gln
 345 350 355

ggc tgg agc agt gcc tac tcc ata gag tca gtc atc atg cag atc agt 1638
 Gly Trp Ser Ser Ala Tyr Ser Ile Glu Ser Val Ile Met Gln Ile Ser
 360 365 370

gcc aca ctg gtg aag ggg aaa gca cga gtg cag ttt gga gcc aac aaa 1686
 Ala Thr Leu Val Lys Gly Lys Ala Arg Val Gln Phe Gly Ala Asn Lys
 375 380 385 390

tct caa tac agt ctg aca aga gca cag cag tcc tac aag tcc ttg gtg 1734
 Ser Gln Tyr Ser Leu Thr Arg Ala Gln Gln Ser Tyr Lys Ser Leu Val
 395 400 405

cag atc cac gaa aaa aac ggc tgg tac aca ccc cca aaa gaa gac ggc 1782
 Gln Ile His Glu Lys Asn Gly Trp Tyr Thr Pro Pro Lys Glu Asp Gly
 410 415 420

taaccttgga gtatcaccct tctcctctcc ccaggcacca ctggaccaat tacctttgaa 1842

tgcgtatatt ggatctcaag ctgctctgt ggttccctcc ctcatctttc ctggacgtga 1902

tagctctgcc tattgagga caatgatgac tattotaaac gctaaggaaa aaaaacaac 1962

acagaactgt tccaagtact caagactgac ttacagacca accaaccaco ttgctggaac 2022

ccttgotagc aggcattctt ataaaagaaa ctlttagacc tccttatatt gctggaact 2082

WO 02/36741

PCT/US01/46559

4/22

cagcgtgget ccagactaga gccctccttac ctatgctatg gatttttaaat ttattttctc 2142
 ttatttcatg tacactgott tttttgggta cagtgatga tggatgtgta tgaaaaaaat 2202
 gtatctttgg gaaacaatt acagtttggtt aattgaaaa aaaaaaaaaa aa 2254

<210> 2
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Gln Gln Pro Gln Pro Gln Gly Gln Gln Gln Pro Gly Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Gln Leu Gly Gly Gln Gly Ala Ala Pro Gly Ala Gly Gly Gly Pro Gly
 20 25 30
 Gly Gly Pro Gly Pro Gly Pro Cys Leu Arg Arg Glu Leu Lys Leu Leu
 35 40 45
 Glu Ser Ile Phe His Arg Gly His Glu Arg Phe Arg Ile Ala Ser Ala
 50 55 60
 Cys Leu Asp Glu Leu Ser Cys Glu Phe Leu Leu Ala Gly Ala Gly Gly
 65 70 75 80
 Ala Gly Ala Gly Ala Ala Pro Gly Pro His Leu Pro Pro Arg Gly Ser
 85 90 95
 Val Pro Gly Asp Pro Val Arg Ile His Cys Asn Ile Thr Glu Ser Tyr
 100 105 110
 Pro Ala Val Pro Pro Ile Trp Ser Val Glu Ser Asp Asp Pro Asn Leu
 115 120 125
 Ala Ala Val Leu Glu Arg Leu Val Asp Ile Lys Lys Gly Asn Thr Leu
 130 135 140
 Leu Leu Gln His Leu Lys Arg Ile Ile Ser Asp Leu Cys Lys Leu Tyr
 145 150 155 160
 Asn Leu Pro Gln His Pro Asp Val Glu Met Leu Asp Gln Pro Leu Pro
 165 170 175
 Ala Glu Gln Cys Thr Gln Glu Asp Val Ser Ser Glu Asp Glu Asp Glu
 180 185 190
 Glu Met Pro Glu Asp Thr Glu Asp Leu Asp His Tyr Glu Met Lys Glu
 195 200 205
 Glu Glu Pro Ala Glu Gly Lys Lys Ser Glu Asp Asp Gly Ile Gly Lys
 210 215 220
 Glu Asn Leu Ala Ile Leu Glu Lys Ile Lys Lys Asn Gln Arg Gln Asp
 225 230 235 240

WO 02/36741

PCT/US01/46559

5/22

Tyr Leu Asn Gly Ala Val Ser Gly Ser Val Gln Ala Thr Asp Arg Leu
 245 250 255
 Met Lys Glu Leu Arg Asp Ile Tyr Arg Ser Gln Ser Phe Lys Gly Gly
 260 270
 Asn Tyr Ala Val Glu Leu Val Asn Asp Ser Leu Tyr Asp Trp Asn Val
 275 280 285
 Lys Leu Leu Lys Val Asp Gln Asp Ser Ala Leu His Asn Asp Leu Gln
 290 300
 Ile Leu Lys Glu Lys Glu Gly Ala Asp Phe Ile Leu Leu Asn Phe Ser
 305 310 315 320
 Phe Lys Asp Asn Phe Pro Phe Asp Pro Pro Phe Val Arg Val Val Ser
 325 330 335
 Pro Val Leu Ser Gly Gly Tyr Val Leu Gly Gly Gly Ala Ile Cys Met
 340 345 350
 Glu Leu Leu Thr Lys Gln Gly Trp Ser Ser Ala Tyr Ser Ile Glu Ser
 355 360 365
 Val Ile Met Gln Ile Ser Ala Thr Leu Val Lys Gly Lys Ala Arg Val
 370 375 380
 Gln Phe Gly Ala Asn Lys Ser Gln Tyr Ser Leu Thr Arg Ala Gln Gln
 385 390 395 400
 Ser Tyr Lys Ser Leu Val Gln Ile His Glu Lys Asn Gly Trp Tyr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Lys Glu Asp Gly
 420

<210> 3

<211> 471

<212> PRT

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 3

Met Ala Cys Leu Arg Lys Leu Lys Glu Asp Ile Gln Val Leu Glu Lys
 1 5 10 15
 Leu Phe Pro Lys Asn His Asn Arg Phe Gln Ile Leu Ser Ala Ser Val
 20 25 30
 Asp Glu Leu Ser Met Lys Phe Ile Asn Ala Glu Asn Lys Gly Ile Ile
 35 40 45
 Val Thr Ala Asn Ile Gln Glu Asn Tyr Pro Arg Gln Pro Pro Ile Trp
 50 55 60
 Phe Ser Glu Ser Asp Asp Val Pro Val Ile Gly Met Ser Leu Gln Arg
 65 70 75 80

WO 02/36741

PCT/US01/46559

6/22

Leu Thr Glu Thr Glu Glu Ser Thr Asn Ile Leu His Gln Val His Arg
 85 90 95
 Leu Val Ser Asp Leu Cys Ser Phe Tyr Asn Leu Gln Met Pro Cys Glu
 100 105 110
 Leu Pro Gln Ile Ala Pro Pro Val Arg Asp Asp Ile Asp Glu Gly Arg
 115 120 125
 Gly Ser Asp Ile Ser Asp Thr Thr Ser Glu Pro Ile Asp Asp Asp Met
 130 135 140
 Ala Gly Asp Gly Glu Val Asp Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Asp Asp
 145 150 155 160
 Glu Asp Ala Asp Gly Asp Ile Glu Ile Val Glu Met Ala Glu Glu Asp
 165 170 175
 Pro Thr Ser Gln His Asp Val Gly Val Ser Lys Glu Gly Leu Asp Met
 180 185 190
 Leu Asp Lys Val Ser Lys Ile Asn Arg Gln Gln His Leu Asp Gly Lys
 195 200 205
 Val Gln Gly Ser Ile Thr Ala Thr Asp Arg Leu Met Lys Glu Ile Arg
 210 215 220
 Asp Ile His Arg Ser Glu His Phe Lys Asn Gly Ile Tyr Thr Phe Glu
 225 230 235 240
 Leu Glu Lys Glu Glu Asn Leu Tyr Gln Trp Trp Ile Lys Leu His Lys
 245 250 255
 Val Asp Glu Asp Ser Pro Leu Phe Glu Asp Met Lys Lys Leu Lys Lys
 260 265 270
 Asp His Asn Gln Asp His Leu Leu Phe Ser Phe Thr Phe Asn Glu Lys
 275 280 285
 Phe Pro Cys Asp Pro Pro Phe Val Arg Val Val Ala Pro His Ile Asn
 290 295 300
 Gln Gly Phe Val Leu Gly Gly Ala Ile Cys Met Glu Leu Leu Thr
 305 310 315 320
 Lys Gln Gly Trp Ser Ser Ala Tyr Ser Ile Glu Ser Cys Ile Leu Gln
 325 330 335
 Ile Ala Ala Thr Leu Val Lys Gly Arg Ala Arg Ile Ser Phe Asp Ala
 340 345 350
 Lys His Thr Ser Thr Tyr Ser Met Ala Arg Ala Gln Gln Ser Phe Lys
 355 360 365
 Ser Leu Gln Gln Ile His Ala Lys Ser Gly Cys Thr Phe Leu Cys Ser
 370 375 380

WO 02/36741

PCT/US01/46559

7/22

Thr Pro Ser Ser His Phe Phe Ala Leu His Leu Val Phe Phe Leu His
 385 390 395 400
 Ser Asp Asp Phe Phe Phe Asn Gly Phe Leu Lys Ser Glu Thr Phe Thr
 405 410 415
 Phe Phe Lys Leu Ser Phe Arg Gly Tyr Ile Ser Ser Leu Val Leu Tyr
 420 425 430
 Ser Phe Ser Arg His Leu His His Pro Phe Phe Thr Arg Phe Leu Ile
 435 440 445
 Pro Gln Leu Gln Pro Pro Pro Ile Pro Phe Gln Leu Ile Pro Pro Phe
 450 455 460
 Leu Asn Arg Thr Lys His Val
 465 470
 <210> 4
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> *Drosophila melanogaster*
 <400> 4
 Met Ala Cys Leu Asn Thr Leu Lys Gln Glu Ile Lys Thr Leu Glu Lys
 1 5 10 15
 Ile Phe Pro Lys Asn His Glu Arg Phe Gln Ile Leu Asn Ser Ser Val
 20 25 30
 Asp Glu Leu Leu Cys Arg Phe Ile Asp Lys Asn Gly Lys Arg Tyr Asp
 35 40 45
 Ile His Ala Asn Ile Thr Glu Thr Tyr Pro Ser Ser Pro Pro Val Trp
 50 55 60
 Phe Ala Glu Ser Glu Glu Thr Ser Val Thr Asn Ala Val Gln Ile Leu
 65 70 75 80
 Ser Asn Thr Asn Gly Arg Asp Asn His Val Ile Asn Gln Val Gly Ile
 85 90 95
 Leu Leu Arg Glu Leu Cys Arg Leu His Asn Val Pro Leu Pro Pro Asp
 100 105 110
 Ile Asp Asn Leu Ala Leu Pro Leu Gln Thr Pro Pro Pro Ser Ala Ser
 115 120 125
 Pro Leu Arg Cys Glu Gln Arg Pro Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Pro His Gly Asn Glu Glu Thr Asp Ser Asp Gln Glu Ile
 145 150 155 160
 Glu Asp Pro Ile Gly Glu Ser Glu Gln Glu Ser Glu Gly Asp Glu Asp
 165 170 175

WO 02/36741

PCT/US01/46559

8/22

Leu Pro Leu Glu Met Asp Asp Val Arg Ser Thr Ser Lys Lys Asp Asp
 180 185 190
 Met Glu Val Glu His Leu Ala Thr Leu Glu Lys Leu Arg Gln Ser Cln
 195 200 205
 Arg Gln Asp Tyr Leu Lys Gly Ser Val Ser Gly Ser Val Gln Ala Thr
 210 215 220
 Asp Arg Leu Met Lys Glu Leu Arg Asp Ile Tyr Arg Ser Asp Ala Phe
 225 230 235 240
 Lys Lys Asn Met Tyr Ser Ile Glu Leu Val Asn Glu Ser Ile Tyr Glu
 245 250 255
 Trp Asn Ile Arg Leu Lys Ser Val Asp Pro Asp Ser Pro Leu His Ser
 260 265 270
 Asp Leu Gln Met Leu Lys Glu Lys Glu Gly Lys Asp Ser Ile Leu Leu
 275 280 285
 Asn Ile Leu Phe Lys Glu Thr Tyr Pro Phe Glu Pro Pro Phe Val Arg
 290 295 300
 Val Val His Pro Ile Ile Ser Gly Gly Tyr Val Leu Ile Gly Gly Ala
 305 310 315 320
 Ile Cys Met Glu Leu Leu Thr Lys Gln Gly Trp Ser Ser Ala Tyr Thr
 325 330 335
 Val Glu Ala Val Ile Met Gln Ile Ala Ala Thr Leu Val Lys Gly Lys
 340 345 350
 Ala Arg Ile Gln Phe Gly Ala Thr Lys Ala Leu Thr Gln Gly Gln Tyr
 355 360 365
 Ser Leu Ala Arg Ala Gln Gln Ser Phe Lys Ser Leu Val Gln Ile His
 370 375 380
 Glu Lys Asn Gly Trp Phe Thr Pro Pro Lys Glu Asp Gly
 385 390 395
 <210> 5
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 5
 Met Ser Ser Asp Arg Gln Arg Ser Asp Asp Glu Ser Pro Ser Thr Ser
 1 5 10 15
 Ser Gly Ser Ser Asp Ala Asp Gln Arg Asp Pro Ala Ala Pro Lys Pro
 20 25 30
 Glu Glu Gln Glu Glu Arg Lys Pro Ser Ala Thr Gln Gln Lys Lys Asn
 35 40 45

WO 02/36741

PCT/US01/46559

9/22

Thr Lys Leu Ser Ser Lys Thr Thr Ala Lys Leu Ser Thr Ser Ala Lys
50 55 60

Arg Ile Gln Lys Glu Leu Ala Glu Ile Thr Leu Asp Pro Pro Pro Asn
65 70 75 80

Cys Ser Ala Gly Pro Lys Gly Asp Asn Ile Tyr Glu Trp Arg Ser Thr
85 90 95

Ile Leu Gly Pro Pro Gly Ser Val Tyr Glu Gly Val Phe Phe Leu
100 105 110

Asp Ile Thr Phe Ser Ser Asp Tyr Pro Phe Lys Pro Pro Lys Val Thr
115 120 125

Phe Arg Thr Arg Ile Tyr His Cys Asn Ile Asn Ser Gln Gly Val Ile
130 135 140

Cys Leu Asp Ile Leu Lys Asp Asn Trp Ser Pro Ala Leu Thr Ile Ser
145 150 155 160

Lys Val Leu Leu Ser Ile Cys Ser Leu Leu Thr Asp Cys Asn Pro Ala
165 170 175

Asp Pro Leu Val Gly Ser Ile Ala Thr Gln Tyr Leu Thr Asn Arg Ala
180 185 190

Gln His Asp Arg Ile Ala Arg Gln Trp Thr Lys Arg Tyr Ala Thr
195 200 205

<210> 6
<211> 200
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Ala Asn Ile Ala Val Gln Arg Ile Lys Arg Glu Phe Lys Glu Val
1 5 10 15

Leu Lys Ser Glu Glu Thr Ser Lys Asn Gln Ile Lys Val Asp Leu Val
20 25 30

Asp Glu Asn Phe Thr Glu Leu Arg Gly Glu Ile Ala Gly Pro Pro Asp
35 40 45

Thr Pro Tyr Glu Gly Gly Arg Tyr Gln Leu Glu Ile Lys Ile Pro Glu
50 55 60

Thr Tyr Pro Phe Asn Pro Pro Lys Val Arg Phe Ile Thr Lys Ile Trp
65 70 75 80

His Pro Asn Ile Ser Ser Val Thr Gly Ala Ile Cys Leu Asp Ile Leu
85 90 95

Lys Asp Gln Trp Ala Ala Ala Met Thr Leu Arg Thr Val Leu Leu Ser
100 105 110

WO 02/36741

PCT/US01/46559

10/22

Leu Gln Ala Leu Leu Ala Ala Ala Glu Pro Asp Asp Pro Gln Asp Ala
 115 120 125
 Val Val Ala Asn Gln Tyr Lys Gln Asn Pro Glu Met Phe Lys Gln Thr
 130 135 140
 Ala Arg Leu Trp Ala His Val Tyr Ala Gly Ala Pro Val Ser Ser Pro
 145 150 155 160
 Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu Asn Leu Cys Ala Met Gly Phe Asp Arg
 165 170 175
 Asn Ala Val Ile Val Ala Leu Ser Ser Lys Ser Trp Asp Val Glu Thr
 180 185 190
 Ala Thr Glu Leu Leu Leu Ser Asn
 195 200

<210> 7
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> *Drosophila melanogaster*

<400> 7
 Met Ala Asn Met Ala Val Ser Arg Ile Lys Arg Glu Phe Lys Glu Val
 1 5 10 15
 Met Arg Ser Glu Glu Ile Val Gln Cys Ser Ile Lys Ile Glu Leu Val
 20 25 30
 Asn Asp Ser Trp Thr Glu Leu Arg Gly Glu Ile Ala Gly Pro Pro Asp
 35 40 45
 Thr Pro Tyr Glu Gly Gly Lys Phe Val Leu Glu Ile Lys Val Pro Glu
 50 55 60
 Thr Tyr Pro Phe Asn Pro Pro Lys Val Arg Phe Ile Thr Arg Ile Trp
 65 70 75 80
 His Pro Asn Ile Ser Ser Val Thr Gly Ala Ile Cys Leu Asp Ile Leu
 85 90 95
 Lys Asp Asn Trp Ala Ala Ala Met Thr Leu Arg Thr Val Leu Leu Ser
 100 105 110
 Leu Gln Ala Leu Leu Ala Ala Ala Glu Pro Asp Asp Pro Gln Asp Ala
 115 120 125
 Val Val Ala Tyr Gln Phe Lys Asp Lys Tyr Asp Leu Phe Leu Leu Thr
 130 135 140
 Ala Lys His Trp Thr Asn Ala Tyr Ala Gly Gly Pro His Thr Phe Pro
 145 150 155 160
 Asp Cys Asp Ser Lys Ile Gln Arg Leu Arg Asp Met Gly Ile Asp Glu
 165 170 175

WO 02/36741

PCT/US01/46559

11/22

His Glu Ala Arg Ala Val Leu Ser Lys Glu Asn Trp Asn Leu Glu Lys
 180 185 190

Ala Thr Glu Gly Leu Phe Ser
 195

<210> 8

<211> 295

<212> PPT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 8

Met Ser Ser Arg Lys Ser Thr Ala Ser Ser Leu Leu Leu Arg Gln Tyr
 1 5 10 15

Arg Glu Leu Thr Asp Pro Lys Lys Ala Ile Pro Ser Phe His Ile Glu
 20 25 30

Leu Glu Asp Asp Ser Asn Ile Phe Thr Trp Asn Ile Gly Val Met Val
 35 40 45

Leu Asn Glu Asp Ser Ile Tyr His Gly Gly Phe Phe Lys Ala Gln Met
 50 55 60

Arg Phe Pro Glu Asp Phe Pro Phe Ser Pro Pro Gln Phe Arg Phe Thr
 65 70 75 80

Pro Ala Ile Tyr His Pro Asn Val Tyr Arg Asp Gly Arg Leu Cys Ile
 85 90 95

Ser Ile Leu His Gln Ser Gly Asp Pro Met Thr Asp Glu Pro Asp Ala
 100 105 110

Glu Thr Trp Ser Pro Val Gln Thr Val Glu Ser Val Leu Ile Ser Ile
 115 120 125

Val Ser Leu Leu Gln Asp Pro Asn Ile Asn Ser Pro Ala Asn Val Asp
 130 135 140

Ala Ala Val Asp Tyr Arg Lys Asn Pro Glu Gln Tyr Lys Gln Arg Val
 145 150 155 160

Lys Met Glu Val Glu Arg Ser Lys Gln Asp Ile Pro Lys Gly Phe Ile
 165 170 175

Met Pro Thr Ser Glu Ser Ala Tyr Ile Ser Gln Ser Lys Leu Asp Glu
 180 185 190

Pro Glu Ser Asn Lys Asp Met Ala Asp Asn Phe Trp Tyr Asp Ser Asp
 195 200 205

Leu Asp Asp Asp Glu Asn Gly Ser Val Ile Leu Gln Asp Asp Asp Tyr
 210 215 220

Asp Asp Gly Asn Asn His Ile Pro Phe Glu Asp Asp Asp Val Tyr Asn
 225 230 235 240

WO 02/36741

PCT/US01/46559

12/22

Tyr Asn Asp Asn Asp Asp Asp Asp Glu Arg Ile Glu Phe Glu Asp Asp
 245 250 255

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ile Asp Asn Asp Ser Val Met Asp Arg
 260 265 270

Lys Gln Pro His Lys Ala Glu Asp Glu Ser Glu Asp Val Glu Asp Val
 275 280 285

Glu Arg Val Ser Lys Lys Ile
 290 295

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 9

tgcagtgctc ggctcgggtgc

20

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 10

ctgatctgca tgatcaactga c

21

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 11

tccaactgaaa catcacggag tcaataccctg

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

WO 02/36741

PCT/US01/46559

13/22

<400> 12
atgcagtcga actcgtgaat gacagctctgt 30

<210> 13
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 13
gcagcagcgg ccgcgacgag ctgagctgcy agttctctgc 39

<210> 14
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 14
gcagcagtcg acgcctgttt cttttggggg tctgtac 37

<210> 15
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 15
gcagcagcgg ccgcatgcag cagccgcagc cgcaggggc 39

<210> 16
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 16
gcagcagtcg acgcctgttt tggtagaag ttccatg 37

<210> 17
<211> 245
<212> FRT
<213> Homo sapiens

WO 02/36741

PCT/US01/46559

14/22

<400> 17
 Pro His Leu Pro Pro Arg Gly Ser Val Pro Gly Asp Pro Val Arg Ile
 1 5 10 15
 His Cys Asn Ile Thr Glu Ser Tyr Pro Ala Val Pro Pro Ile Trp Ser
 20 25 30
 Val Glu Ser Asp Asp Pro Asn Leu Ala Ala Val Leu Glu Arg Leu Val
 35 40 45
 Asp Ile Lys Lys Gly Asn Thr Leu Leu Leu Gln His Leu Lys Arg Ile
 50 55 60
 Ile Ser Asp Leu Cys Lys Leu Tyr Asn Leu Pro Gln His Pro Asp Val
 65 70 75 80
 Glu Met Leu Asp Gln Pro Leu Pro Ala Glu Gln Cys Thr Gln Glu Asp
 85 90 95
 Val Ser Ser Glu Asp Glu Asp Glu Glu Met Pro Glu Asp Thr Glu Asp
 100 105 110
 Leu Asp His Tyr Glu Met Lys Glu Glu Glu Pro Ala Glu Gly Lys Lys
 115 120 125
 Ser Glu Asp Asp Gly Ile Gly Lys Glu Asn Leu Ala Ile Leu Glu Lys
 130 135 140
 Ile Lys Lys Asn Gln Arg Gln Asp Tyr Leu Asn Gly Ala Val Ser Gly
 145 150 155 160
 Ser Val Gln Ala Thr Asp Arg Leu Met Lys Glu Leu Arg Asp Ile Tyr
 165 170 175
 Arg Ser Gln Ser Phe Lys Gly Gly Asn Tyr Ala Val Glu Leu Val Asn
 180 185 190
 Asp Ser Leu Tyr Asp Trp Asn Val Lys Leu Leu Lys Val Asp Gln Asp
 195 200 205
 Ser Ala Leu His Asn Asp Leu Gln Ile Leu Lys Glu Lys Glu Gly Ala
 210 215 220
 Asp Phe Ile Leu Leu Asn Phe Ser Phe Lys Asp Asn Phe Pro Phe Asp
 225 230 235 240
 Pro Pro Phe Val Arg
 245

<210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Gly Ser Val Gln Ala Thr Asp Arg Leu Met Lys Glu Leu
 1 5 10

WO 02/36741

PCT/US01/46559

15/22

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Ile Tyr Arg Ser Gln Ser Phe Lys Gly Gly Asn Tyr Ala
1 5 10

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Ile Leu Leu Asn Phe Ser Phe Lys Asp Asn Phe Pro Phe
1 5 10

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Thr Arg Ala Gln Gln Ser Tyr Lys Ser Leu Val Gln Ile
1 5 10

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Pro Ala Glu Gln Cys Thr Gln Glu Asp Val Ser Ser Glu Asp
1 5 10

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Thr Gln Glu Asp Val Ser Ser Glu Asp Glu Asp Glu Glu Met
1 5 10

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

WO 02/36741

PCT/US01/46559

16/22

<400> 24
Gln Glu Asp Val Ser Ser Glu Asp Glu Asp Glu Glu Met Pro
1 5 10

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Ala Glu Gly Lys Lys Ser Glu Asp Asp Gly Ile Gly Lys Glu
1 5 10

<210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Glu Leu Val Asn Asp Ser Leu Tyr Asp Trp Asn Val Lys Leu
1 5 10

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Ile Leu Leu Asn Phe Ser Phe Lys Asp Asn Phe Pro Phe Asp
1 5 10

<210> 28
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Val Arg Ile His Cys Asn Ile Thr Glu Ser Tyr Pro Ala Val
1 5 10

<210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Ala Val Glu Leu Val Asn Asp Ser Leu Tyr Asp Trp Asn Val
1 5 10

<210> 30
<211> 14

WO 02/36741

PCT/US01/46559

17/22

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Asp Phe Ile Leu Leu Asn Phe Ser Phe Lys Asp Asn Phe Pro
 1 5 10

<210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Val Gln Phe Gly Ala Asn Lys Ser Gln Tyr Ser Leu Thr Arg
 1 5 10

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Gln Gln Pro Gly Pro Gly Gln Gln Leu Gly Gly Gln Gly Ala Ala Pro
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Pro Gly Gln Gln Leu Gly Gly Gln Gly Ala Ala Pro Gly Ala Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Gln Leu Gly Gly Gln Gly Ala Ala Pro Gly Ala Gly Gly Gly Pro Gly
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 Ala Ala Pro Gly Ala Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Pro Gly Pro Gly
 1 5 10 15

WO 02/36741

PCT/US01/46559

18/22

<210> 36
<211> 16
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Ala Pro Gly Ala Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Pro Gly Pro Gly Pro
1 5 10 15

<210> 37
<211> 16
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Glu Phe Leu Leu Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Pro
1 5 10 15

<210> 38
<211> 16
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Leu Leu Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Pro Gly Pro
1 5 10 15

<210> 39
<211> 16
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 39
Leu Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Pro Gly Pro His
1 5 10 15

<210> 40
<211> 16
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 40
His Leu Pro Pro Arg Gly Ser Val Pro Gly Asp Pro Val Arg Ile His
1 5 10 15

<210> 41
<211> 16
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Gln Asp Tyr Leu Asn Gly Ala Val Ser Gly Ser Val Gln Ala Thr Asp
1 5 10 15

WO 02/36741

PCT/US01/46559

19/22

<210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 Asn Gly Ala Val Ser Gly Ser Val Glu Ala Thr Asp Arg Leu Met Lys
 1 5 10 15

<210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 Ser Gln Ser Phe Lys Gly Gly Asn Tyr Ala Val Glu Leu Val Asn Asp
 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 Gly Tyr Val Leu Gly Gly Gly Ala Ile Cys Met Glu Leu Leu Thr Lys
 1 5 10 15

<210> 45
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 Ala Arg Val Gln Phe Gly Ala Asn Lys Ser Gln Tyr Ser Leu Thr Arg
 1 5 10 15

<210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Glu Glu Glu Pro Ala Glu Gly Lys Lys Ser Glu Asp Asp Gly
 1 5 10

<210> 47
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

WO 02/36741

PCT/US01/46559

20/22

<400> 47
 Gly Ser Val Gln Ala Thr Asp Arg Leu Met Lys Glu Leu Arg Asp Ile
 1 5 10 15
 Tyr Arg Ser Gln Ser Phe Lys Gly Gly Asn Tyr Ala Val Glu Leu Val
 20 25 30
 Asn Asp Ser Leu Tyr Asp Trp Asn Val Lys Leu Leu Lys Val Asp Gln
 35 40 45
 Asp Ser Ala Leu His Asn Asp Leu Gln Ile Leu Lys Glu Lys Glu Gly
 50 55 60
 Ala Asp Phe Ile Leu Leu Asn Phe Ser Phe Lys Asp Asn Phe Pro Phe
 65 70 75 80
 Asp Pro Pro Phe Val Arg Val Val Ser Pro Val Leu Ser Gly Gly Tyr
 85 90 95
 Val Leu Gly Gly Ala Ile Cys Met Glu Leu Leu Thr Lys Gln Gly
 100 105 110
 Trp Ser Ser Ala Tyr Ser Ile Glu Ser Val Ile Met Gln Ile Ser Ala
 115 120 125
 Thr Leu Val Lys Gly Lys Ala Arg Val Gln Phe Gly Ala Asn Lys Ser
 130 135 140
 Gln Tyr Ser Leu Thr Arg Ala Gln Gln Ser Tyr Lys Ser Leu Val Gln
 145 150 155 160
 Ile His Glu Lys

 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 48
 aggatcatct ccgacotgtg 20

 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 49
 ccagggttga tccagcatct 20

WO 02/36741

PCT/US01/46559

21/22

<210> 50
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 50
atgaggcttg gatcagcttt 20

<210> 51
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 51
cctgaagcct gacattccat 20

<210> 52
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 52
actgcagcgg attcattaat g 21

<210> 53
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 53
gaattaatac gactcactat agggagatat catacacata cgatttag 48

<210> 54
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 54
gaattaatac gactcactat agggagatat gattacgcoa agctcgaa 48

WO 02/36741

PCT/US01/46559

22/22

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 55
tgtaaaacga cggccagtgga a

21

【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
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/036741 A3

- (51) International Patent Classification²: C07H 21/02, 21/04, C12N 1/21, 15/63
- (21) International Application Number: PCT/US01/46559
- (22) International Filing Date: 29 October 2001 (29.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/244,688 30 October 2000 (30.10.2000) US
60/308,706 30 July 2001 (30.07.2001) US
- (71) Applicant: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US], P.O. Box 4000, Lawrenceville-Provincetown Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).
- (72) Inventors: BOWEN, Michael, A., 7812 Follara Place, Rockville, MD 20855 (US); WU, Yuh, 3 Susanna Way, Newton, MA 02460 (US); YANG, Wei-Ping, 25 Rutgers Lane, Princeton, NJ 08540 (US); FINGER, Joshua, N., Apartment 254, 22 Woodland Parkway, San Marcos, CA 92069 (US).
- (74) Agents: KLEIN, Christopher, A., et al., Bristol Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Lawrenceville-Provincetown Road, Princeton, NJ 08543-4000 (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, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HK, HU, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NC, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, ST, 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, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 23 January 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "List of Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/036741 A3

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE ENCODING AN ACTIVATED HUMAN T-LYMPHOCYTE-DERIVED PROTEIN RELATED TO UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME

(57) Abstract: The present invention describes a newly discovered ubiquitin conjugating enzyme homologue, called RATL1d6 herein, and its encoding polynucleotide, isolated and identified from activated T lymphocytes. Also described are expression vectors, host cells, agonists, antagonists, antisense molecules, and antibodies associated with the activity and use of the newly-discovered polynucleotide and/or polypeptide of the present invention. Methods for treating, diagnosing, preventing and screening for disorders related to the expression of the RATL1d6 ubiquitin conjugating enzyme polypeptide are described.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/46559
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07H 21/02, 21/04; C12N 1/21, 15/63 UIS Cl. : 536/23.1, 23.5, 24.31, 24.33; 435/252.3, 320.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.1, 23.5, 24.31, 24.33; 435/252.3, 320.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/46375 A (METAGEN GESELLSCHAFT FUR GENOMFORSCHUNG MBH) 16 September 1999, see SEQ ID NO: 217 and page 38.	1-5 and 18
X	WO 00/58473 A (CURAGEN CORPORATION) 03 October 2000, pages 1-90 and 2293-2294, especially pages 2293-2294.	1-5 and 18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 "Z" document number of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 August 2002 (20.08.2002)		Date of mailing of the international search report 20 SEP 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Carla Myers Telephone No. (703)305-1156

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/46559
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: 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:
3.	<input type="checkbox"/>	Claim 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: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	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.	<input checked="" type="checkbox"/>	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.: 1-5 and 18
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US01/46559

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-5 and 18, drawn to nucleic acids.

Group II, claims 6-9, drawn to proteins.

Group III, claim 10, drawn to an antibody.

Group IV, claims 11 and 12, drawn to a method of screening for a modulator.

Group V, claims 13, 14, 16 and 17, drawn to methods of treatment with an agonist or antagonist.

Group VI, claim 15, drawn to methods of treatment with a protein. The inventions listed as Groups 1-6 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of group I is considered to be isolated nucleic acids which consist of a specific nucleotide sequence. The special technical feature of group II is considered to be proteins which consist of a specific amino acid sequence and which have a specific 3-dimensional structure. The special technical feature of group III is considered to be antibodies which consist of a specific amino acid sequence and which also have a specific 3-dimensional structure. Groups I-III represent molecules which consist of unique chemical structures, have different functions and are utilized in different types of methods. Therefore these groups do not share a special technical feature, as is necessary to fulfill the requirements for unity of invention. The special technical feature of group IV is considered to be a method for identifying modulators of binding activity or modulators of ubiquitin conjugating enzyme activity. The special technical feature of group V is considered to be methods of treatment with an agonist or antagonist. The special technical feature of group VI is considered to be a method of treatment for a neuronal or immune disorder wherein the method comprises administering a protein. It is noted that Applicant is entitled to an examination of the first product, method of making said first product and method of using said first product. However, as the claims do not include methods of using or making the first product claimed (i.e., nucleic acids), the methods of groups IV-VI constitute additional and distinct methods. Furthermore, the methods of groups IV-VI require the use of different reagents, involve performing different method steps and have distinct objectives. Accordingly, there is no special technical feature linking the recited groups.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

GENBANK, EMBL, GENBSEQ and EST Databases
search terms: SEQ ID NO: 1, nucleic acids encoding SEQ ID NO: 2

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/18	4 C 0 8 5
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 3/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/06	
A 6 1 P 19/06	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 16/40	C 0 7 K 16/40	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/00	
C 1 2 N 9/00	C 1 2 Q 1/25	
C 1 2 Q 1/25	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/566

C 1 2 N 5/00

A

A 6 1 K 37/48

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 マイケル・エイ・ボーウェン
アメリカ合衆国 2 0 8 5 5 メリーランド州ロックビル、ボララ・プレイス 7 8 1 2 番

(72)発明者 ユリ・ウ
アメリカ合衆国 1 8 9 4 0 ペンシルベニア州ニュータウン、スザンナ・ウェイ 3 番

(72)発明者 ウェン - ピン・ヤン
アメリカ合衆国 0 8 5 4 0 ニュージャージー州プリンストン、ラトガーズ・レイン 2 5 番

(72)発明者 ジョシュア・エヌ・フィンガー
アメリカ合衆国 9 2 0 6 9 カリフォルニア州サン・マルコス、ウッドランド・パークウェイ 2 2 番
、アパートメント 2 5 4

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
FB03
4B024 AA01 AA11 BA07 CA03 CA04 CA07 CA09 CA12 CA20 DA06
EA04 GA11 HA03 HA11 HA13 HA14
4B050 CC01 CC05 DD11 EE01 FF14E LL01 LL03 LL05
4B063 QA01 QA05 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ43 QQ53 QQ61 QQ89
QQ95 QR01 QR32 QR35 QR40 QR42 QR48 QR50 QR56 QS16
QS34 QS36 QX02 QX07
4B065 AA26X AA58X AA72X AA87X AA90Y AA93Y AB01 AC14 BA02 CA27
CA43 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA17 BA01 BA02 BA35 BA44 CA53
CA59 DC01 MA01 MA17 MA22 MA23 MA28 MA31 MA35 MA37
MA41 MA43 MA52 MA56 MA59 MA60 MA63 MA65 MA66 NA14
ZA022 ZA062 ZA122 ZA152 ZA162 ZA182 ZA202 ZA222 ZA452 ZA552
ZA592 ZA602 ZA612 ZA662 ZA682 ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962
ZA972 ZB022 ZB072 ZB082 ZB112 ZB132 ZB152 ZB212 ZB262 ZB322
ZB372 ZC192 ZC202 ZC352
4C085 AA13 AA14 AA16 AA34 BB11 BB41 BB43 CC02 DD63 DD86
DD88 EE01 FF03 FF20 GG02 GG04 GG06 GG08
4H045 AA11 CA40 DA75 EA20 EA50 FA71

专利名称(译)	编码遍在蛋白缀合的酶相关激活的人T淋巴细胞衍生蛋白的多核苷酸		
公开(公告)号	JP2004512836A	公开(公告)日	2004-04-30
申请号	JP2002539487	申请日	2001-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	百时美施贵宝公司		
申请(专利权)人(译)	布里斯托尔 - 迈尔斯宝公司		
[标]发明人	マイケルエイポーウエン ユリウ ウエンピンヤン ジョシユアエヌフィンガー		
发明人	マイケル・エイ・ポーウエン ユリウ ウエン・ピン・ヤン ジョシユア・エヌ・フィンガー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/43 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/06 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12N15/09 C12Q1/25 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/06 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K2319/00 C12N9/93 C12Y603/02019		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.Y A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/06 A61P9/10.101 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12Q1/25 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/48		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B050/CC01 4B050/CC05 4B050/DD11 4B050/EE01 4B050/FF14E 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QQ95 4B063/QR01 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR56 4B063/QS16 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA27 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA35 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/CA59 4C084/DC01 4C084/MA01 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA062 4C084/ZA122 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA202 4C084/ZA222 4C084/ZA452		

4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA602 4C084/ZA612 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA752
 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB022 4C084/ZB072
 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB322
 4C084/ZB372 4C084/ZC192 4C084/ZC202 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16
 4C085/AA34 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/DD63 4C085/DD86 4C085
 /DD88 4C085/EE01 4C085/FF03 4C085/FF20 4C085/GG02 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08
 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71

代理人(译) 田中，三夫
 上田俊夫
 品川EiSatoshi

優先権 60/244688 2000-10-30 US
 60/308706 2001-07-30 US

外部链接 Espacenet

摘要(译)

本发明描述了新发现的泛素结合酶同源物，在本文中称为RATL1d6，及其编码的多核苷酸，其是从活化的T淋巴细胞中分离和鉴定的。还描述了与本发明的新发现的多核苷酸和/或多肽的活性和用途有关的表达载体，宿主细胞，激动剂，拮抗剂，反义分子和抗体。描述了用于治疗，诊断，预防和筛选与RATL1d6泛素缀合酶多肽表达有关的疾病的方法。

【0298】

さらに、M1-Q359 C末端欠失突然変異体の場合、例えば、表2に示すプライマーを用いてこの欠失突然変異体に対応するcDNA断片を増幅すること

【0299】

表2

5'プライマー	5'-gcagca <u>ggggccgc</u> atgcagcagcgcagccgcaggggc-3' (配列番号15)、 ここで、下線を付した配列は NotI 制限酵素部位を表す。
3'プライマー	5'-gcagca <u>gtcgac</u> gccctgtttggtgagaagttccatg-3' (配列番号16)、 ここで、下線を付した配列は Sall 制限酵素部位を表す。