

(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2004-536603

(P2004-536603A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 108 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-514955 (P2003-514955)	(71) 出願人	597011463
(86) (22) 出願日	平成14年7月15日 (2002. 7. 15)		ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月15日 (2004. 1. 15)		スイス国、4056 バーゼル、リヒトシ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/007847		ユトラーセ 35
(87) 国際公開番号	W02003/008640	(71) 出願人	504018057
(87) 国際公開日	平成15年1月30日 (2003. 1. 30)		ウェイク・フォレスト・ユニバーシティ・
(31) 優先権主張番号	60/305, 649		ヘルス・サイエンスーズ
(32) 優先日	平成13年7月16日 (2001. 7. 16)		Wake Forest University Health Sciences
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国27157ノースカロライ
			ナ州ウィンストン・セイレム、メディカル
			・センター・ブルバード
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 喘息関連遺伝子

(57) 【要約】

本発明は患者集団の診断的および予後のスクリーニングにおけるAAGAと呼ばれる喘息関連遺伝子、AAGAによってコードされるタンパク質分子および関連分子の使用、AAGAの多型、およびAAGAまたはその変異体によってコードされるタンパク質の治療標的としての使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験者が気管支過敏症を特徴とする疾病に罹患しているか、または発症する危険があるかどうかを調べる方法であって、被験者由来の細胞サンプルにおいて、(i) 配列番号1もしくは配列番号2もしくは配列番号3もしくは配列番号4もしくは配列番号5もしくは配列番号6のヌクレオチド配列またはストリンジェントな条件下でそれとハイブリダイズする配列を含んでなるポリヌクレオチド(A)の発現レベル、またはアミノ酸配列配列番号7もしくは配列番号8またはそれらの機能的に同等な変異体を含んでなるポリペプチド(B)の発現レベル、または前記ポリペプチド(B)の生理活性レベルを調べ、(A)もしくは(B)の発現レベルまたは(B)の生理活性レベルを健常な被験者における(A)もしくは(B)それぞれの発現レベルまたは生理活性レベルと比較すること、あるいは(ii) 気管支過敏症と関連している前記ポリヌクレオチド(A)もしくは前記ポリペプチド(B)の変異体の存在を調べることを含んでなる方法。

10

【請求項2】

気管支過敏症と関連しているポリヌクレオチド(A)の変異体が、コードされるポリペプチドにおいてアミノ酸配列を変更するかまたはコードされるポリペプチドの発現レベルを変更するかまたは転写物の安定性を変更するかまたは転写物がプロセッシングされる方法を変更する変更を含む変異体である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

変異体が(i) ポリヌクレオチド(A)からの1個以上のヌクレオチドの欠失、(ii) ポリヌクレオチド(A)への1個以上のヌクレオチドの付加、(iii) ポリヌクレオチド(A)の1個以上のヌクレオチドの置換、(iv) ポリヌクレオチド(A)の全染色体再構成、(v) ポリヌクレオチド(A)のメッセンジャーRNA転写物レベルの全変更、(vi) ゲノムDNAのメチル化パターンなどのポリヌクレオチド(A)の異常な修飾、(vii) ポリヌクレオチド(A)のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、(viii) ポリペプチド(B)の非野生型レベル、(ix) ポリヌクレオチド(A)の対立遺伝子の欠損、および(x) ポリペプチド(B)の不適切な翻訳後修飾のうち少なくとも1つに關与する変更を含む、請求項2に記載の方法。

20

【請求項4】

ポリヌクレオチド(A)の変異体を、被験者由来のDNAサンプルをプローブが相補ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズする条件下でポリヌクレオチド(A)の少なくとも5個の連続するヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチドプローブとともにインキュベートして第1の反応生成物を得、第1の反応生成物をプローブおよび健常な被験者由来のDNAから得られる対照反応生成物と比較することによって検出する、請求項1、2または3に記載の方法。

30

【請求項5】

ポリヌクレオチド(A)の変異体の存在を調べることがポリヌクレオチド(A)の多型の対立遺伝子または対立遺伝子変異体の同一性を調べ、それによって被験者が気管支過敏症と関連している多型の特定の対立遺伝子変異体を有するかどうかを調べることを含んでなる、請求項1、2または3に記載の方法。

40

【請求項6】

細胞サンプルにおいて気管支過敏症と関連している請求項1に定義のポリヌクレオチド(A)の変異体の存在を検出する方法であって、前記サンプルにおいてポリヌクレオチド(A)の多型の対立遺伝子または対立遺伝子変異体の同一性を調べることを含んでなる方法。

【請求項7】

多型に重なる、5~30個のヌクレオチドを含むプローブを用いる対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションを含んでなる、請求項5または6に記載の方法。

【請求項8】

ポリヌクレオチド(A)の変異体が単一ヌクレオチド多型を含んでなり、かつ、DNAサンプルを配列決定することによって対立遺伝子変異体を同定する、請求項5または6に記載の方

50

法。

【請求項 9】

多型が配列番号1の6377および7390位に相当する位置の一方または両方のものである、請求項5～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ポリヌクレオチド(A)の変異体の存在を調べるのが被験者由来の細胞サンプルにおいて、配列番号1の6377および7390位に相当する位置の一方または双方で塩基の同一性を調べることを含んでなる、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項 11】

前記6377位に相当する位置のTおよび/または前記7390位に相当する位置のCが気管支過敏症と関連している前記ポリヌクレオチド(A)の変異体を示す、請求項9または10に記載の方法。 10

【請求項 12】

配列番号1を含んでなる核酸またはヌクレオチド6377および/またはヌクレオチド7390を含んでなるその一部を前記サンプルから単離し、単離した核酸または一部を配列決定する、請求項5、6および9～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 13】

細胞サンプル由来のDNA断片を、配列番号1の6377および7390位のうちの1箇所以上でのポリヌクレオチド(A)の多型を検出することができる対立遺伝子特異的プライマーの存在下でPCRによって増幅する、請求項5または6に記載の方法。 20

【請求項 14】

配列番号1の6377または7390位での請求項1に定義のポリヌクレオチド(A)の多型を検出することができる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 15】

15～30個のヌクレオチドを含み、かつ、前記6377または7390位に重なる、請求項14に記載のプローブ。

【請求項 16】

配列番号1の6377または7390位での請求項1に定義のポリヌクレオチド(A)の多型を検出することができる対立遺伝子特異的プライマー。

【請求項 17】

気管支過敏症と関連している、請求項1に定義のポリヌクレオチド(A)の変異体である単離されたポリヌクレオチド。 30

【請求項 18】

配列番号1の6377位および/または7390位での単一ヌクレオチド多型の特異的対立遺伝子変異体を含むポリヌクレオチド(A)の変異体である、請求項17に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 19】

請求項17または18に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドである、気管支過敏症と関連している単離された変異ポリペプチドまたは気管支過敏症と関連している請求項1に定義のポリペプチド(B)の変異体。 40

【請求項 20】

個体のAAGA遺伝子プロフィールを調べて個体のAAGA遺伝子プロフィールをAAGA遺伝子集団プロフィールと比較し、それによって個体に投与する治療を選択することを含んでなる、喘息を罹患している個体に投与する治療を薬理ゲノミクスによって選択する方法。

【請求項 21】

被験者由来の投与前DNAサンプルにおいておよび被験者由来の投与後DNAサンプルにおいて請求項1に定義のポリヌクレオチド(A)またはポリペプチド(B)の発現または活性レベルを調べ、投与前サンプルおよび投与後サンプルにおけるそれぞれの発現または活性レベルを比較し、必要であれば、被験者への医薬の投与をそれに応じて変更することを含んでなる、被験者の医薬での治療の有効性をモニターする方法。 50

【請求項 2 2】

気管支過敏症を特徴とする疾病を治療する方法であって、それを必要とする被験者に有効量の請求項1に定義のポリヌクレオチド(A)または請求項1に定義のポリペプチド(B)または前記ポリペプチド(B)に関して免疫応答性である抗体(C)もしくは該疾病と関連しているその変異体、または前記ポリヌクレオチド(A)のものと相補的なヌクレオチド配列を含んでなるアンチセンスオリゴヌクレオチド(D)もしくは該疾病と関連しているその変異体を投与することを含んでなる方法。

【請求項 2 3】

疾病が喘息である、請求項1~13および22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 4】

請求項1に定義のポリペプチド(B)または気管支過敏症と関連しているその変異体の活性を調節する物質を同定する方法であって、候補物質を前記ポリペプチド(B)または前記変異体と混合して前記活性に対する候補物質の作用を測定することを含んでなる方法。

【請求項 2 5】

請求項1に定義のポリペプチド(B)またはその変異体と結合する物質を同定する方法であって、候補物質を前記ポリペプチド(B)または前記変異体と混合して結合が生じたかどうかを調べることを含んでなる方法。

【請求項 2 6】

請求項17または18に定義のポリヌクレオチド(A)の変異体によってコードされるポリペプチドと結合するか、その活性を調節する物質を同定する方法であって、候補物質を前記ポリペプチドと混合して(i)結合が生じたかどうかを調べ、かつ/または(ii)前記活性に対する前記物質の作用を測定することを含んでなる方法。

【請求項 2 7】

気管支過敏症を特徴とする疾病の診断または予後用薬剤の製造のための、請求項1に定義のポリヌクレオチド(A)の少なくとも5個の連続するヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチドプローブの使用。

【請求項 2 8】

気管支過敏症を特徴とする疾病の診断または予後用薬剤の製造のための、請求項1に定義のポリヌクレオチド(A)または配列番号1のヌクレオチド6377および/またはヌクレオチド7390を含んでなるその一部の使用。

【請求項 2 9】

気管支過敏症を特徴とする疾病の治療薬の製造のための、請求項22に定義の、ポリヌクレオチド(A)、ポリペプチド(B)、抗体(C)またはオリゴヌクレオチド(D)の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は患者集団の診断および予後スクリーニングにおけるAAGAと示される喘息関連遺伝子、AAGAによってコードされるタンパク質分子および関連分子の使用およびAAGAの多型、およびAAGAによってコードされるタンパク質またはその変異体の治療標的としての使用に関する。

【0002】

喘息とは以下の特徴を有する極めて一般的な肺疾病である：

気道閉塞 - 通常これは可逆的であるが、進行性であることも多い

慢性気管支炎症 - 炎症細胞浸潤および活性化、生化学的媒介物質の放出および構造変化(気道リモデリング)を特徴とする症状

気管支過敏症(BHR) - 種々の免疫性、生化学的および物理的刺激に対する過度の気管支収縮性応答。

【0003】

喘息は臨床的には喘鳴音、咳嗽および息切れを伴う慢性の、断続的な気道閉塞を特徴とする。喘息は典型的には可逆性である閉塞障害を伴うが、この所見も何らかのその他の単一の試験または測定も喘息を診断するのに十分ではない[Guideline for diagnosis and de

10

20

30

40

50

velopment of asthma, 1997, NIH Publication 97号 - 4051]。多くの疾病がこのパターンの異常と関連している。喘息という診断を確立するには、患者の症状パターン（患者の病歴からのその他の情報に加えて）およびその他の可能性ある診断の除外も必要とされる。喘息について評価を行うには臨床上の判断が必要である。喘息の患者は不均一であり患者ごとに、ならびに一人の患者についても時が経つにつれて極めて広範な兆候および症状を示す。

【0004】

気道平滑筋、炎症の役割、気道の神経支配および媒介物質が関係する機構に関する問題をはじめ、喘息の病態生理を説明するために多くの仮説が掲げられてきた。これらの因子のすべてが重要であり得るが、どれが一次的な（すなわち、原因である）欠陥であり、どれが二次的な欠陥であるのかは明らかではない。しかしながら、環境および遺伝的性質の双方が重要であるということは一般に認められている。喘息の多因子性を考えると、基礎的な機構を同定するための1つのアプローチは、個体に喘息を発症させる素因となる喘息罹患性遺伝子を発見することがある。

10

【0005】

喘息罹患性遺伝子を同定するために使用できる1つの方法としてはポジショナルクローニングがある。この方法では、DNAマーカーを用いて家系を通して遺伝子の遺伝をたどることによって罹患性遺伝子をヒト染色体の特定の領域に局在化する。DNAマーカーは染色体上で所定の物理的位置を占め、その遺伝をモニターできるDNAの断片である。DNAマーカーが罹患性遺伝子に近いほど、マーカーおよび罹患性遺伝子が親から子へともに渡される可能性が大きい。この現象は遺伝子連鎖と呼ばれている。ひと度、特定の染色体領域の連鎖が得られれば、領域が配列決定するのに十分なほど小さくなり、罹患性遺伝子を同定できるまで、物理的および遺伝子マッピングの組み合わせを用いてその領域の大きさを狭める。罹患性遺伝子を同定した後、この遺伝子のあらゆる多型を調べることができ、これらの変異が非喘息患者と比べ喘息患者により大きな優勢を生じるかどうかを確認する解析を実施することができる。ポジショナルクローニングの主要な利点は疾病を引き起こす根底にある因子が未知であっても新規遺伝子を同定でき、かつ、同定された遺伝子は、それらが保因者を直接発症しやすくするので直接的に病理学的関連がある（すなわち、一次的な原因となる欠陥）ということである。

20

【0006】

近年、いくつかの学術研究グループがヒト5番染色体上の喘息およびアレルギー性応答の調節に重要な遺伝子の存在についての証拠を明らかにした。特に、92のオランダの喘息家系の遺伝子連鎖解析からサブ領域5q31 - 5q33における5番染色体上のBHRおよび血清IgEレベルの上昇に関する罹患性遺伝子の存在についての証拠が得られた [Meyersら, Genomics 23 : p.464 - 470 ; Postmaら, New England Journal Medicine 333 : p.894 - 900およびBleeckerら, Clinical and Experimental Allergy 25 : p.84 - 88]。マーカーD5S436、全血清IgEレベル [Meyersら, Genomics 23 : p.464 - 470 ; Postmaら, New England Journal Medicine 333 : p.894 - 900およびBleeckerら, Clinical and Experimental Allergy 25 : p.84 - 88] およびBHR [Postmaら, New England Journal Medicine 333 : p.894 - 900およびBleeckerら, Clinical and Experimental Allergy 25 : p.84 - 88] 間の遺伝子連鎖に関する強力な証拠がオランダの家系において認められた。

30

40

【0007】

喘息罹患性遺伝子はまだ同定されていないので、当技術分野ではこのような遺伝子の同定が必要とされている。喘息罹患性遺伝子の同定により疾病プロセスの基礎的な理解が提供され、そこから多数の臨床上重要な応用が生じるであろう。同定された罹患性遺伝子は遺伝子または遺伝子のタンパク質産物を直接標的とする治療薬（小分子薬、アンチセンス分子、抗体分子）の開発をもたらすか、あるいはこのような薬剤の開発が遺伝子またはそのタンパク質産物を直接標的とするよりもより容易である場合には、タンパク質産物が上流または下流位置の一部である生化学的経路を標的としてもよい。

【0008】

50

遺伝子を含んでなるポリヌクレオチド配列、その配列変異体およびそれらのタンパク質産物を喘息のおよび喘息発症のハイリスク個体の同定のための臨床診断試験を開発するために用いてもよい。このような試験の結果はまた予後的価値を有する場合もあり、また薬剤治療に应答する患者および应答しないものを予測するために用いてもよい。最後に、喘息罹患性遺伝子のDNA配列およびこれらの遺伝子によってコードされるアミノ酸配列についての情報によって組換え技術によるタンパク質の大規模生産およびタンパク質を天然に産生する組織/細胞の同定が容易となる。また、このような配列情報により抗体物質または罹患性遺伝子によってコードされるタンパク質と特異的に反応し、タンパク質が関与し得る天然リガンド/抗リガンド結合反応の調節におよび診断目的のために使用できるその他の新規の結合分子の調製も可能となる。

10

【0009】

本明細書において用いた用語は以下の意味を有する：

「単離された」とはその本来の環境から取り出された物質を指す。

「ハイブリダイゼーション」または「ハイブリダイズする」とはポリヌクレオチド鎖が塩基対形成を介して相補的な鎖と結合するあらゆるプロセスを指す。

「ストリンジェントな条件」とは20%までの塩基対ミスマッチを許容する実験条件、典型的には65 °Cでの0.1×SSC(15mMのNaCl、1.5mMのクエン酸ナトリウム、pH7.0)での2回の15分の洗浄を指す。

「相同性」または「相同な」とはヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の類似度を指し、これは部分的なものである場合もあるし、配列が同一である場合には完全であり得る。

20

「発現ベクター」とは、その転写を提供するさらなるセグメントと機能しうる形で連結された注目するポリペプチドをコードするセグメントを含んでなる直線状または環状DNA分子を指す。

「アンチセンス」とは、オリゴまたはポリヌクレオチドの、標的タンパク質のメッセンジャーRNA(mRNA)中のその相補的な配列とのハイブリダイゼーションによるタンパク質合成の選択的阻害を指す。アンチセンス概念はZamecnikおよびStephensonによって(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 75:p.280-284; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 75:p.285-288)最初に提唱され、その後実験ツールとしておよび推定上の治療分子を作製する手段の双方としての広範な適用が認められるようになった(Alama, A., Pharmacological Research 36:p.171-178; Dean, N.M., Biochemical Society Transactions 24:p.623-629; Bennet, C.F., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 280:p.988-1000; Crooke, S.T., Antisense Research and Applications, Springer)。

30

【0010】

今では、AAGA、すなわち配列番号7または配列番号8のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなり、そのヌクレオチド配列がmRNA配列およびプロトカドヘリン-42遺伝子に相当するESTと100%の相同性を有する5番染色体上の遺伝子が気管支過敏症と関連しているということが遺伝子連鎖解析およびバイオインフォマティクス解析によって分かっている。プロトカドヘリン-42はカドヘリンスーパーファミリーのメンバーである。このスーパーファミリーのタンパク質は、in vivoでの広範な事象において重要な役割を果たし、かつ組織完全性の維持に重要である細胞-細胞(細胞間)接着に関与している。M. Takeichi, Annual Review Biochemistry (1990), 58, p.237-52 参照。AAGAはヒト気管支上皮細胞において高レベルで発現されると認められている。また、AAGAの多型は非喘息患者において生じるよりも喘息患者でより優勢であることが分かっている。

40

【0011】

従って、1つの態様では、本発明は被験者が気管支過敏症を特徴とする疾病に罹患しているか、または発症する危険があるかどうか調べる方法を提供し、これは被験者由来の細胞サンプルにおいて、(i)配列番号1もしくは配列番号2もしくは配列番号3もしくは配列番

50

号4もしくは配列番号5もしくは配列番号6のヌクレオチド配列またはストリンジェントな条件下でそれとハイブリダイズする配列を含んでなるポリヌクレオチド(A)の発現レベル(以下、ポリヌクレオチド(A)は代わりにAAGA遺伝子と呼ぶ)、またはアミノ酸配列配列番号7もしくは配列番号8もしくはその機能的に同等な変異体を含んでなるポリペプチド(B)の発現レベル、または上記ポリペプチド(B)の生理活性レベルを調べ、(A)もしくは(B)の発現レベルまたは(B)の生理活性レベルを健常な被験者における(A)もしくは(B)それぞれの発現レベルまたは生理活性と比較するか、あるいは(ii)気管支過敏症と関連している上記ポリヌクレオチド(A)もしくは上記ポリペプチド(B)の変異体の存在を調べることを含んでなる。

【0012】

本明細書において「変異体」とは、アミノ酸配列に関して、1個以上のアミノ酸が変更されているアミノ酸配列を意味する。その変化はアミノ酸置換、欠失または挿入を含んでいてもよい。ヌクレオチド配列に関しては、本明細書において「変異体」とは、1個以上のヌクレオチドが変更されているヌクレオチド配列を意味し、その変化はヌクレオチド置換、欠失または挿入を含んでいてもよい。アミノ酸配列配列番号7または配列番号8の好ましい機能的に同等な変異体には配列番号7または配列番号8と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、特に95%よりも高いアミノ酸配列同一性を有するものがある。このような好ましい機能的に同等な変異体では、通常、細胞外ドメインに相当する配列番号7または配列番号8の領域は実質的に保存されている。

【0013】

配列番号7または配列番号8などの参照配列とx%の同一性を有するアミノ酸配列とは、参照配列のアミノ酸各100個の当たり100-x個までのアミノ酸変更を含み得るということを除いては参照配列と同一である配列を意味する。例えば、参照配列と少なくとも80%の同一性を有する被験アミノ酸配列では、参照配列中の20%までのアミノ酸残基が別のアミノ酸残基で置換、欠失または挿入されていてもよい。アミノ酸配列間のパーセンテージ同一性は、便宜には、既知のコンピュータープログラム、例えば、Brutlagら、(Computer Applications in the Biosciences (1990) 6: p.237 - 245)のアルゴリズムを基にしたFAST DBプログラムを用いて求めることができる。

【0014】

上記で定義されたポリヌクレオチド(A)または上記で定義されたポリペプチド(B)の発現レベルは、例えば、ノーザンブロット分析、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、in situハイブリダイゼーション、免疫沈降、ウェスタンブロットハイブリダイゼーションまたは免疫組織化学によって求めることができる。被験者由来の細胞において上記の技術のうちの1種によって測定した(A)、例えば、mRNAとしてのまたはポリペプチド(B)のレベルを健常な被験者の(A)または(B)それぞれのレベルと比較すればよい。ポリヌクレオチド(A)またはポリペプチド(B)の異常なレベルは気管支過敏症と関連している異常なAAGA活性を示唆するものである可能性がある。

【0015】

ポリペプチド(B)の生理活性レベルは、例えば、Sanoら、EMBO Journal 12: p.2249 - 2256によって記載されたように、例えば、L細胞においてホモタイプCa²⁺依存性凝集および接着を促進することによって、例えば、カルシウム依存性細胞-細胞接着を測定することによって測定すればよい。被験者由来の細胞において測定された活性を健常な被験者由来の細胞において測定された活性と比較することで被験者が気管支過敏症と関連している異常なAAGA活性を有しているかどうかを示される。

【0016】

気管支過敏症と関連しているポリヌクレオチド(A)の変異体はコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変更するか、またはコードされるポリペプチドの発現レベル、転写物の安定性、もしくは転写物がプロセッシングされる方法を変更する変更を含む変異体であり得る。このような変更は以下のうちの少なくとも1つを含む場合がある：(i)ポリヌクレオチド(A)からの1個以上のヌクレオチドの欠失、(ii)ポリヌクレオチド(A)への1個

10

20

30

40

50

以上のヌクレオチドの付加、(iii) ポリヌクレオチド(A)の1個以上のヌクレオチドの置換、(iv) ポリヌクレオチド(A)の全染色体再構築、(v) ポリヌクレオチド(A)のメッセンジャーRNA転写物レベルの全変更、(vi) ゲノムDNAのメチル化パターンなどの、ポリヌクレオチド(A)の異常な修飾、(vii) ポリヌクレオチド(A)のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、(viii) ポリペプチド(B)の非野生型レベル、(ix) ポリヌクレオチド(A)の対立遺伝子欠失および/または(x) ポリペプチド(B)の不適切な翻訳後修飾。AAGA遺伝子(ポリヌクレオチド(A))の変更を検出するためには種々のアッセイ技術を用いてもよい。これらの方法としては、限定されるものではないが、配列解析、サザンブロットハイブリダイゼーション、コンホメーション感受性ゲル電気泳動(CSGE)、制限酵素部位マッピングに関する方法、および分析される核酸とプローブ間でヌクレオチド対を形成しないことの検出に関する方法が挙げられる。

10

【0017】

従って、1つの実施形態では、被験者における気管支過敏症と関連しているポリヌクレオチド(A)の変異体、すなわち、遺伝子の異常を被験者由来のDNAサンプルをプローブが相補的なポリヌクレオチド配列とハイブリダイズする条件下で上記で定義されたポリヌクレオチド(A)の少なくとも5個、例えば、少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチドプローブとともにインキュベートして第1の反応産物を得、第1の反応産物を、プローブと健全な被験者由来のDNAから得た対照反応産物と比較することによって検出する。第1の反応産物と対照反応産物の間に、例えば喘息における気管支過敏症と相関のある相違があれば、その相違は気管支過敏症を特徴とする疾病の発症に対する素因を示す。一般に、プローブは15~50個のヌクレオチドを含む合成オリゴヌクレオチドであり、検出可能なシグナルを提供するよう、例えば、フルオロフォアまたは放射性ヌクレオチドで標識してもよい。

20

【0018】

特に、喘息またはBHRを特徴とするその他の炎症性もしくは閉塞性気道疾病の発症を引き起こすかまたは寄与する可能性があるAAGA変異にはAAGAの正常な(野生型の)機能、特に、ホモタイプ会合、ひいては細胞-細胞接着に参与する細胞外ドメインおよび構造タンパク質またはシグナル伝達分子と相互作用する細胞内ドメインに負の影響を及ぼす変異がある。このような変異の例としては、i) 産生される転写物レベルに影響を及ぼす変異；ii) 細胞内、膜貫通または細胞外ドメイン内に生じるミスセンス変異；および転写物がプロセシングされる方法に影響を及ぼす変異が挙げられる。

30

【0019】

特定の疾病または疾患、例えば、遺伝的疾患または失病は特定の遺伝子の多型領域の特定の対立遺伝子変異体と関連があるが、これは必ずしも変異タンパク質をコードしているわけではない。従って、被験者における単一ヌクレオチド多型(「SNP」)などの遺伝子の多型領域の特定の対立遺伝子変異体の存在が被験者に特定の疾病または疾患を発症する感受性を付与し得る。遺伝子、例えば、AAGA遺伝子の多型領域は個体集団の遺伝子のヌクレオチド配列を調べることによって同定すればよい。多型領域、例えば、SNPまたはハプロタイプ、すなわち、SNPの組み合わせを同定すれば、特定の個体、例えば喘息などの特定の疾病を発生した個体の集団を研究することによって特定の疾病との関連を調べることができる。多型領域は遺伝子のいずれの領域にも、例えば、エキソン(エキソンのコードまたは非コード領域)、イントロンおよびプロモーター領域に位置し得る。

40

【0020】

AAGA遺伝子はその特定の対立遺伝子が特に喘息患者における気管支過敏症と関連している多型領域を含んでなるということが分かっている。従って、上記で定義されたポリヌクレオチド(A)の変異体の存在を調べることは被験者においてポリヌクレオチド(A)の多型の対立遺伝子または対立遺伝子変異体の同一性を調べ、それによって被験者が気管支過敏症と関連している多型の特定の対立遺伝子変異体を有しているかどうかを調べることを含んでなる。

【0021】

50

喘息患者由来のDNAサンプルにおいて同定された配列番号1中の多数のSNPを実施例3に示す。これらのうち、配列番号1の6377位（CからTへの変化）および7390位（GからTへの変化）での多型が気管支過敏症と関連していると示されている。従って、好ましい実施形態では、上記に定義のポリヌクレオチド（A）の変異体の存在を調べることは被験者由来の細胞サンプルにおいて、配列番号1の6377および7390位に相当する位置の一方または双方で塩基の同一性を調べることを含んでなる。上記6377位に相当する位置でのTおよび/または上記7390位に相当する位置でのCの存在が気管支過敏症と関連しているポリヌクレオチド（A）の変異体を示す。ハプロタイプ、すなわち、SNPの組み合わせの存在を調べることが望まれる場合には、6377および7390位双方に相当する位置で塩基の同一性を調べてもよいし、またはこれらの位置の一方または双方での塩基の同一性および配列番号1の589、1001、1060、2033、2193、2561、5667、5804および7531位、ならびに配列番号2の1212、1216、1964および2330位に相当する位置の1箇所以上での塩基の同一性を調べてもよい。特に好ましい実施形態では、配列番号1を含んでなる核酸、またはヌクレオチド6377および/またはヌクレオチド7390を含んでなるその一部を細胞サンプルから単離して配列決定する。

10

20

30

40

50

【0022】

例示的な実施形態では、被験者由来のサンプル細胞のDNAをハイブリダイゼーションに利用できるようにしてAAGA遺伝子（ポリヌクレオチド（A））またはその天然変異体、例えば、配列番号1の6377位および/または7390位を含む領域などの遺伝子の多型領域、またはAAGA遺伝子と天然に関連している5'もしくは3'フランキング配列またはその天然変異体のセンスまたはアンチセンス配列とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列の領域を含む核酸プローブと接触させてプローブのサンプルDNAとのハイブリダイゼーションを検出する。このような技術は欠失、置換などをはじめとする、ゲノムまたはmRNAレベルのいずれかでの変更または対立遺伝子変異体を検出するために、ならびにmRNA転写物レベルを調べるために用いてもよい。

【0023】

多型領域の対立遺伝子または対立遺伝子変異体を同定する別の方法は、変異または多型部位に重なり、かつ、約5~30、例えば、5、10、20、25または30個のヌクレオチドを含むプローブを用いる対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションである。好ましい実施形態では、単一ヌクレオチド多型などの対立遺伝子変異体と特異的にハイブリダイズし得るいくつかのプローブを固相支持体、例えば、「チップ」に付着させる。リソグラフィーをはじめとする種々のプロセスによってオリゴヌクレオチドを固体支持体に結合させてもよい。例えば、チップは約250,000個までのオリゴヌクレオチドを保持し得る。「DNAプローブアレイ」とも呼ばれるオリゴヌクレオチドを含んでなるこれらのチップを用いる変異検出分析は、例えば、Croninら（1996）Human Mutation 7: p.244に記載されている。1つの実施形態では、チップはある遺伝子の少なくとも1つの多型領域のすべての対立遺伝子変異体を含んでなる。次いで、固相支持体を試験核酸と接触させて特異的プローブとのハイブリダイゼーションを検出する。従って、患者由来のDNAサンプル中の1以上の遺伝子の多数の対立遺伝子変異体の同一性を単純なハイブリダイゼーション実験で同定することができる。

【0024】

従って、別の態様では、本発明は配列番号1の6377および7390位のうちの1箇所以上での上記に記載のポリヌクレオチド（A）の多型を検出することができる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブを提供する。一般に、対立遺伝子特異的プローブは約15~50個のヌクレオチド、より通常は約15~30個のヌクレオチドを含み、上記6377または7390位に重なる。便宜には、プローブの中心位置が上記6377または7390位とアラインしている。このようなプローブのヌクレオチド配列は一般にポリヌクレオチド（A）の多型領域中の相当する配列に対して100%相補的である。プローブは、例えば、便宜には、検出可能なシグナルを提供するために、例えば、フルオロフォアまたは放射性標識で標識することもできる。

【0025】

特定の実施形態では、変更の検出はアンカーPCRまたはRACE PCRなどのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)において(例えば、米国特許第4,683,195号および同4,683,202号参照)、あるいは、リガーゼ連鎖反応(LCR)において(例えば、Landegranら(1988) Science 241: p.1077 - 1080およびNakazawaら(1994) PNAS 91: p.360 - 364参照)プローブ/プライマーを利用することを含んでなり、この後者はAAGA遺伝子の点変異を検出するのに特に有用であり得る(Abravayaら(1995) Nucleic Acidis Research 23: p.675 - 682参照)。単に例示的な実施形態では、この方法は(i)患者から細胞のサンプルを採取し、(ii)サンプルの細胞から核酸(例えば、ゲノムの、mRNAのまたはその双方)を単離し、(iii)核酸サンプルを、AAGA遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅が(存在すれば)生じるような条件下でAAGA遺伝子と特異的にハイブリダイズする1種以上のプライマーと接触させ、そして(iv)増幅産物の有無を検出するか、または増幅産物の大きさを検出して対照サンプルの長さと比較するというステップを含む。PCR、LCRまたはいずれかのその他の増幅手順(例えば、自己持続性配列複製(Guatelli, J.C.ら, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87: p.1874 - 1878)、転写増幅系(Kwoh, D.Y.ら, 1989, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: p.1173 - 1177)またはQ-レプリカーゼ(Lizardi, P.M.ら, 1988, Bio/Technology 6: p.1197)を予備ステップとして用いてサンプル量を増加させてもよく、それで本明細書に記載された変異を検出する技術のいずれかを実施してもよいということは予測される。

10

20

【0026】

上記で定義されたポリヌクレオチド(A)の、単一ヌクレオチド多型を含んでなる変異体の存在を調べる好ましい方法は被験者由来のDNAサンプルを配列決定することによって対立遺伝子変異体を調べることを含んでなる。多型の対立遺伝子変異体を同定する別の方法では、細胞サンプル由来のDNA断片を、特に配列番号1の6377および7390位のうちの1箇所以上でポリヌクレオチド(A)の多型を検出することができる対立遺伝子特異的プライマーの存在下でPCRで増幅する。喘息患者由来のDNAサンプルで同定された多数のSNPを実施例2に示す。これらのうち、配列番号1の6377および7390位の多型は特定の集団において気管支過敏症と関連していると示されている。

【0027】

本発明はまた、例えば、配列番号1の6377および7390位のうちの1箇所以上での上記で定義されたポリヌクレオチド(A)の多型を検出することができる、増幅ステップを含む多型検出手順に用いられる対立遺伝子特異的プライマーを提供する。一般に、このプライマーは約15~50個のヌクレオチド、より通常は約15~30個のヌクレオチドを含む。プライマーのヌクレオチド配列は検出される対立遺伝子のものと対応するが、検出される対立遺伝子のものと対応するプライマーの3'末端の約5~10のヌクレオチドを含む部分的に対応する配列を用いてもよい。

30

【0028】

プライマーはその検出を補助するよう、例えば、フルオロフォアまたは放射性標識で標識してもよい。

40

【0029】

本発明は上記の対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブまたは上記の対立遺伝子特異的プライマーを、所望により標識試薬(検出可能な標識をハイブリダイズされた産物に組み込むための)、バッファーおよびTaqポリメラーゼなどのDNAポリメラーゼなどのその他の試薬とともに含んでなる診断用または予後用キットをさらに提供する。

【0030】

従って、別の態様では、本発明は配列番号1の6377および/または7390位での単一ヌクレオチド多型、特に、上記6377位でのTおよび/または上記7390位でのCなどの、気管支過敏症と関連している上記で定義されたポリヌクレオチド(A)の変異体、特に、気管支過敏症と関連している単一ヌクレオチド多型の特定の対立遺伝子変異体を含むポリヌクレオチ

50

ド(A)の変異体である単離されたポリヌクレオチドを提供する。相応して、さらなる態様では、本発明は上記の気管支過敏症と関連しているポリヌクレオチド(A)のポリヌクレオチド変異体によってコードされている、気管支過敏症と関連している単離された変異ポリペプチド、または気管支過敏症と関連している上記のポリペプチド(B)の変異体である単離されたポリペプチドを提供する。

【0031】

本明細書に記載の診断アッセイを用いて得られた情報は(単独で、または同一の疾病に寄与する別の遺伝子欠損に関する情報と併せて)症候性被験者が特定の疾病または疾患を引き起こすかまたは寄与する遺伝子欠損(例えば、AAGA遺伝子における、またはAAGA遺伝子の発現を調節する遺伝子における)を有することを予知、診断または確認するのに有用である。あるいは、この情報は(単独で、または同一の疾病に寄与する別の遺伝子欠損に関する情報と併せて)非症候性被験者が被験者における異常なAAGA活性またはタンパク質レベルによって引き起こされるかまたは寄与される疾病または症状を発症する可能性があるかどうかを予測するために予後的に用いてもよい。特に、アッセイによりAAGAの、またはそれと関連している、単一ヌクレオチド多型(SNP)などの多型である変異と関連している気管支過敏症を発症する個体の傾向を確認することが可能となる。予後情報を基に、医師は療法、例えば、個体において喘息の発症を防ぐか、または遅延させるのに有用な治療プロトコルを推奨することができる。

10

【0032】

個体における欠陥のある、または欠損したAAGA遺伝子またはタンパク質をもたらす特定の単一または複数の変更(AAGAプロフィール)についての知識は単独で、または同一の疾病に寄与する他の遺伝子欠損に関する情報(特定の疾病の遺伝子プロフィール)と併せて、個体の遺伝子プロフィール、「薬理ゲノミクス」の目標に向けた特定の疾病の治療のカスタマイズを可能にする。例えば、AAGA遺伝子の特定の対立遺伝子を有する被験者は特定の疾病の症状を示す場合もあるしそうでない場合もあり、または特定の疾病の症状を発症しやすい場合もあるしそうでない場合もある。さらに、それらの被験者が症候性である場合には、特定の薬剤、例えば、特定のAAGA治療薬に応答する場合もあり、応答しない場合もあるが、別のものに応答する場合もある。従って、欠陥および/または欠損AAGA遺伝子および/またはタンパク質によって引き起こされるかまたは寄与される疾病または症状について症候性である被験者集団からのAAGA遺伝子プロフィールの作製(例えば、喘息の発症と関連しているAAGA遺伝子の変更の分類)(AAGA遺伝子集団プロフィール)および個体のAAGAプロフィールの集団プロフィールとの比較により、特定の患者または患者集団(すなわち、同一の遺伝子変更を有する患者群)にとって安全であり、かつ、有効であると予想される薬剤の選択または設計が可能となる。

20

30

【0033】

従って、別の態様では、本発明は喘息を罹患している個体に施す治療を薬理ゲノミクスにより選択する方法を提供し、これは個体のAAGA遺伝子プロフィールを調べて個体のAAGA遺伝子プロフィールをAAGA遺伝子集団プロフィールと比較し、それによって個体に施す治療を選択することを含んでなる。

【0034】

例えば、AAGA集団プロフィールは欠陥または欠損AAGA遺伝子によって引き起こされるかまたは寄与される疾病を罹患している患者集団においてAAGAプロフィール、例えば、AAGA遺伝子の同一性を調べることによって実施することができる。所望により、AAGA集団プロフィールには1) AAGA関連疾病と関連している症状の重篤度、2) AAGA遺伝子発現レベル、3) AAGAmRNA レベルおよび/または4) AAGAタンパク質レベルをモニターすること、ならびに(iii) そのAAGA遺伝子またはAAGA経路遺伝子に存在する特定の遺伝子の単一または複数の変更を基にして集団を分割するまたは分類することをはじめとする種々の方法のいずれかを用いてAAGA治療薬に対する集団の応答に関する情報をさらに含めてもよい。AAGA遺伝子集団プロフィールはまた、場合によっては特定の治療薬に対して患者が応答性が非応答性のいずれかである特定の変更を示し得る。従って、この情報または集団プロフィー

40

50

ルはその個体のAAGAプロフィールに基づいて特定の薬剤に対してその個体が応答するはずであるかを予測するのに有用である。

【0035】

好ましい実施形態では、AAGAプロフィールは転写または発現レベルプロフィールであり、ステップ(i)はAAGAタンパク質の発現レベルを、単独で、または同一の疾病に寄与すると知られている他の遺伝子の発現レベルと併せて調べることを含んでなる。AAGAプロフィールは疾病の種々の段階の多数の患者で調べてもよい。

【0036】

薬理ゲノミクス研究はまたトランスジェニック動物を用いて実施してもよい。例えば、AAGA遺伝子の特定の対立遺伝子変異体を含むトランスジェニックマウスを、例えばヒトAAGA遺伝子の対立遺伝子を用いてその野生型AAGA遺伝子を複製することによって作製してもよい。次いで、特定のAAGA治療薬に対するこれらのマウスの応答を調べればよい。

【0037】

AAGA治療薬での個体の治療はAAGAタンパク質レベルまたは活性、AAGA mRNAレベル、および/またはAAGA転写レベルなどのAAGA特性を調べることによってモニターすればよい。これらの測定値は治療が有効であるかどうか、または調整、または最適化するべきかどうかを示す。従って、AAGAを臨床試験の際の薬剤の有効性のマーカーとして用いてもよい。

【0038】

好ましい実施形態では、本発明は被験者由来の投与前DNAサンプルにおいて、および被験者由来の投与後DNAサンプルにおいてポリヌクレオチド(A)(例えば、mRNAまたはゲノムDNA)もしくはポリペプチド(B)の発現レベルまたは上記ポリヌクレオチド(A)もしくはポリヌクレオチド(B)の活性レベルを調べて、投与前サンプルおよび投与後サンプルにおけるそれぞれの発現または活性レベルを比較して、所望によりそれに応じて被験者への医薬の投与を変更するというステップを含んでなる、被験者の医薬(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティック、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子または上記のスクリーニングアッセイによって同定されたその他の薬剤候補)での治療の有効性をモニターする方法を提供する。例えば、AAGAの発現または活性を検出されたものよりもより高レベルに高めるために、すなわち、薬剤の有効性を高めるために薬剤の投与の増加が望ましい場合もある。あるいは、AAGAの発現または活性を検出されたものよりもより低レベルに低下させるために、すなわち、薬剤の有効性を低下させるために薬剤の投与の減少が望ましい場合もある。

【0039】

また、被験者の細胞をAAGA治療薬の投与前後に採取してAAGA以外の遺伝子の発現レベルを検出してAAGA治療薬がこのような遺伝子の発現の有害な増加または減少を引き起こしていないことを確認してもよい。これは例えば、転写プロファイリング法を用いることによって実施すればよい。従って、*in vivo*でAAGA治療薬に曝された細胞由来のmRNAとAAGA治療薬に曝されなかった同種の細胞由来のmRNAを逆転写させて多数の遺伝子由来のDNAを含有するチップとハイブリダイズさせ、それによってAAGA治療薬で処理されたおよび処理されていない細胞における遺伝子の発現を比較すればよい。例えば、AAGA治療薬が個体においてプロトオンコジンの発現をオンにする場合には、この特定のAAGA治療薬の使用は望ましくない。

【0040】

個体のAAGA遺伝子プロフィールまたは喘息の遺伝子プロフィールは、1)喘息の分子的機序に対応する薬剤のより有効な処方;および2)特定の薬剤の適切な投与量のよりよい決定を可能にし得る。AAGAまたは喘息遺伝子プロフィールに基づいて、最も高い臨床上的利点を示すと予想される集団を標的にする能力により、1)期待はずれの市場結果の市販薬の再配置;2)患者部分群に特異的である安全性または有効性の限界の結果として臨床上的開発が中断されている薬剤候補の救済;ならびに、3)薬剤候補およびより最適な薬剤標識の急速、かつ、費用のかからない開発(例えば、AAGAのマーカーとしての使用が有効用量を最適化するのに有用であるため)が可能となり得る。

10

20

30

40

50

【0041】

別の態様では、本発明はそれを必要とする被験者に有効量の上記のポリヌクレオチド(A)または上記のポリペプチド(B)または上記ポリペプチド(B)もしくは疾病と関連しているその変異体に対して免疫応答性である抗体(C)または上記ポリヌクレオチド(A)もしくは疾病と関連しているその変異体のものに相補的なヌクレオチド配列を含んでなるアンチセンスオリゴヌクレオチド(D)を投与することを含んでなる気管支過敏症を特徴とする疾病を治療する方法を提供する。

【0042】

ポリヌクレオチド(A)は配列番号4または配列番号5または配列番号6のヌクレオチド配列を含んでなるcDNA、配列番号1または配列番号2または配列番号3のヌクレオチド配列を含んでなるゲノムDNA、あるいはストリンジェントな条件下で配列番号1または配列番号2または配列番号3または配列番号4または配列番号5または配列番号6とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んでなるDNAであってもよい。

10

【0043】

本発明の別の態様では、ポリヌクレオチド(A)は配列番号1または配列番号2または配列番号3または配列番号4または配列番号5または配列番号6由来の少なくとも20個の、例えば少なくとも50個の、例えば少なくとも100個の、例えば少なくとも200個の連続する塩基を含む一部を含んでなる。さらなる態様では、ポリヌクレオチド(A)は配列番号7または配列番号8由来の少なくとも10個の、例えば、少なくとも50個の、例えば少なくとも100個の、例えば少なくとも200個の連続するアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を含んでなる。

20

【0044】

ポリヌクレオチド(A)はDNA配列のバイオインフォマティクス解析によって酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)および/またはP1人工染色体(PAC)の配列決定によって求められた5番染色体上のサブ領域5q31-5q33から、選択された遺伝子の予想されるエキソンと95%より高い同一性を有する配列を検索しその配列を用いて設計したプライマーを用いるPCRによってヒト肺cDNAライブラリーからcDNAを同定することで単離してサブ領域内の遺伝子を同定してもよい。

【0045】

例えば、配列番号1または配列番号2または配列番号3または配列番号4または配列番号5または配列番号6の配列を含むポリヌクレオチド(A)は既知の手順および装置を用いる化学合成、例えば、自動固相合成によって、それを含むヌクレオチドから調製してもよい。

30

【0046】

本発明の別の態様では、ポリペプチド(B)は配列番号7または配列番号8の少なくとも10個、例えば、少なくとも50個、例えば少なくとも100個、例えば少なくとも200個の連続するアミノ酸を含む一部を含んでなる。

【0047】

上記のポリペプチド(B)または変異ポリペプチドは上記のポリヌクレオチド配列またはその変異体をプロモーターおよび転写のためのその他の適当な調節エレメントを含有する発現ベクターにクローニングし、細菌、植物、昆虫、酵母、動物またはヒト細胞などの原核生物のまたは真核生物の宿主細胞に導入し、組換え発現ベクターを含有する宿主細胞を好適な条件下で培養することによって生産してもよい。このようなポリペプチドの組換え発現のための技術は十分に公知であり、例えば、J.Sambrookら、Molecular Cloning 第2版、Cold Spring Harbor Press、1990に記載されている。

40

【0048】

上記のポリペプチド(B)または変異ポリペプチドは、例えば、精製を容易にするために1種以上の異種ポリペプチドとの組換え融合タンパク質として発現させてもよい。例えば、本発明のポリヌクレオチド配列と異種ポリペプチド配列の間に位置する切断部位を含み、その結果、十分に公知の技術を用いて、配列番号7または配列番号8のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドまたは気管支過敏症と関連しているその変異体が異種部分から切断さ

50

れて精製され得る、ポリヒスチジンなどの異種ポリペプチドとの組換え融合タンパク質として発現させてもよい。

【0049】

上記のポリペプチド(B)または変異ポリペプチドはまた、全体または一部を、十分に公知の化学法、例えば、自動固相技術を用いてそれを含むアミノ酸から合成してもよい。

【0050】

上記のポリペプチド(B)または変異ポリペプチドは十分に公知の標準的な手順によって精製すればよい。

【0051】

抗体(C)はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。このような抗体は従来の手順を用いて調製すればよい。精製された抗原に対するポリクローナル抗体の作製方法は十分に確立されている(Current Protocols in Molecular Biology、Ausubelら編、John Wiley and Sons Inc、11章のCooperおよびPaterson参照)。典型的には、ウサギまたはマウスなどの宿主動物を抗原として精製された本発明のポリペプチドまたはその免疫原性部分で免疫化し、適当な時間間隔の後、宿主の血清を回収してポリペプチドに対して特異的な抗体について調べる。精製された抗原に対するモノクローナル抗体の作製方法は十分に確立されている(11章、Current Protocols in Molecular Biology、Ausubelら編、John Wiley and Sons Inc参照)。ポリクローナル抗体の作製には血清を飽和硫酸アンモニウムまたはDEAEセファデックスで処理してもよい。モノクローナル抗体の作製には免疫化された動物の脾臓またはリンパ球を回収して公知の方法によって不活化するかまたはハイブリドーマを作製するのに用いる。不活化された細胞によって分泌された抗体を、例えば、ウェスタンブロット解析を用いてスクリーニングして所望の特異性の抗体を分泌するクローンを決定する。ヒト化抗体は従来手順によって調製することができる。

10

20

30

40

50

【0052】

アンチセンスオリゴヌクレオチド(D)はAAGAのmRNAのものに相補的なヌクレオチド配列、特に、配列番号1もしくは配列番号2もしくは配列番号3もしくは配列番号4もしくは配列番号5もしくは配列番号6に相補的な、または疾病、例えば、喘息と相関のある多型を有するポリペプチド(B)の変異体をコードするポリヌクレオチドのものに相補的なヌクレオチド配列、特に、配列番号1もしくは配列番号2もしくは配列番号3もしくは配列番号4もしくは配列番号5もしくは配列番号6のこのような多型変異体に相補的なヌクレオチド配列を含んでなる。アンチセンスオリゴヌクレオチドはDNA、DNAのホスホロチオエートまたはメチルホスホメート類似体などのDNAの類似体、RNA、RNAの類似体またはペプチド核酸(PNA)であってもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは従来法によって、例えば、自動固相技術を用いて合成してもよい。

【0053】

喘息および気管支過敏症を特徴とするその他の閉塞性または炎症性気道疾病におけるポリペプチド(B)の役割は気管支過敏症の従来のアレルゲンによって誘発された動物モデル、例えば、以下に記載されるオポアルブミン誘導性BHRマウスモデル(Tsuyukiら、Journal of Clinical Investigation、96:p.2924-2931)またはモルモットモデルを用いて調べることができる。

【0054】

上記のあるいは以下まとめて本発明の薬剤と呼ばれる、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体またはアンチセンスオリゴヌクレオチドは炎症性または閉塞性気道疾病の治療(予防的または対症的)に用いてもよい。例えば、ポリペプチド(B)は、そのポリペプチドに欠陥のある、またはそれを必要とする哺乳類、特に、ヒトを治療するために用いてもよく；ポリヌクレオチド(A)はAAGA活性を高めることが望まれる場合に、例えば、被験者が変異したAAGA遺伝子を有するかAAGA遺伝子を失っている場合に遺伝子治療に用いてもよく；アンチセンスオリゴヌクレオチド(D)はAAGA活性または疾病、例えば、喘息と相関のある多型を有するAAGA遺伝子の変異体の活性を、これが望まれる場合に、阻害するため

に用いてもよく；抗体（C）はAAGAポリペプチドのリガンド／抗リガンド結合活性を阻害するために用いてもよい。

【0055】

「遺伝子治療」とは遺伝物質を個体の体細胞に導入することに基づいた、ヒト疾病を治療するためのアプローチを指す。遺伝子導入は遺伝子を保持するウイルスまたは非ウイルスベクターを血液または組織へ投与することによって *in vivo* で直接的に、または実験室において操作した細胞へ遺伝物質を導入し、次いで、遺伝子を含有する細胞を個体に戻すことによって *ex vivo* で間接的に達成してもよい。細胞内の遺伝物質を変更することによって、遺伝子治療は根底にある疾病病態生理を正し得る。動物において特定の組織および器官系へ遺伝子送達するのに好適なベクターおよび手順は Dracopoli, N.C.ら, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley and Sons Inc., 12章および13章にそれぞれ記載されている。上記のポリヌクレオチド（A）に関しては、遺伝子治療は好適な制御エレメント下にAAGA遺伝子の発現カセットを含有するウイルスまたは非ウイルス遺伝子治療ベクターを疾病個体（例えば、喘息患者の）の肺へ送達し、その結果根底にある疾病病態生理を正すかまたは寛解させることを含み得る。

【0056】

気道の過反応性を阻害するか、または回復させる本発明の薬剤の有効性はモルモット試験モデルで証明され得る。予め形成した免疫複合体の急性注入によりモルモットをヒスタミンに対して反応性亢進にする。免疫複合体の投与に先立つわずかな程度の気管支収縮のみを引き起こすヒスタミンの用量がその後かなり強力な効果を引き起こす。モルモット（ダンキン - ハートレー、雄、400~600g）をフェノバルビタール（100mg/kg、腹腔内）およびペントバルビタール（30mg/kg、腹腔内）で麻酔してガラミン（10mg/kg筋内）で麻痺させ、空気と酸素の混合物（45:55、v/v）を用いて人工呼吸した。動物は気管カニューレによって人工呼吸した（8ml/kg、1Hz）。人工呼吸はフロートランスデューサーによってモニターした。フローの測定を行う際には、胸郭における同時発生的圧力変化を胸腔内外套針によって直接モニターし、これによって気管に関連した圧力の差を示すことが可能となる。この情報から、各吸息での抵抗およびコンプライアンスを算出する。アレルギー反応は予め形成した免疫複合体（0.05mlのモルモット抗ウシ グロブリン抗血清に0.05mlの生理食塩水中の30 μ gのウシ グロブリンを添加することによって調製した）を10分間隔で3回静脈内注射することによって開始する。免疫複合体の最後の暴露の前後に、ヒスタミン（10分間隔での1.0~3.2 μ g/kg）の静脈内注射を用いて気道の感受性を規定する。気道の過反応性は免疫複合体の反復注射の前後のヒスタミンに応答する肺抵抗の最大値の対差として現れる。本発明の薬剤はトラガカント中の溶液または懸濁液のいずれかとして気管内投与する。気道の反応性亢進の回復についてのED₅₀値は用量応答曲線から図によって求め、気道の過反応性の50%減少をもたらす用量を表す。

【0057】

本発明を適用できる、気管支過敏症を特徴とする疾病としては炎症性または閉塞性気道疾病、特に、内因性（非アレルギー性）喘息および外因性（アレルギー性）喘息、軽度の喘息、中程度の喘息、重症の喘息、気管支喘息、運動誘導性喘息、職業性喘息および細菌感染後に誘導された喘息をはじめとするいかなる種類または起源の喘息も挙げられる。喘息の治療はまた、例えば、喘鳴症状を示し、かつ、主要な医学的懸念についての確立された患者カテゴリーであり、今では初発性または初相喘息と同定されることが多い「喘鳴のある幼児」と診断されたかまたは診断可能である、4または5歳未満という年齢の被験者の治療を包含すると理解されるべきである。（便宜上、この特定の喘息症状は「喘鳴幼児症候群」と呼ばれる。）

【0058】

喘息の治療の予防効率は、例えば、急性喘息の症候性の発作または気管支収縮発作の頻度または重篤度の軽減、肺機能の改善または気道の過反応性の軽減によって明らかとなる。その他の対症療法、すなわち症候性の発作をそれが生じる時に、例えば、抗炎症的に（例えば、副腎皮質ステロイド）または気管支拡張によって制限するか、中断する療法の必要

性の減少によってさらに明らかとなり得る。喘息の予防利点は特に「モーニング・ディップ (morning dipping)」への被験者の傾向性において明らかとなり得る。「モーニング・ディップ (morning dipping)」は相当なパーセンテージの喘息患者に共通であり、かつ、例えば、約午前4時～6時という時間の間、すなわち、通常それまでに施された喘息対症療法 of いずれとも実質的に離れている時間の喘息発作を特徴とする、認識された喘息症状である。

【0059】

本発明を適用できるその他の炎症性または閉塞性気道疾病および症状としては、成人急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)、それに関連している慢性の気管支炎または呼吸困難を含む慢性閉塞性肺 (pulmonary)、気道または肺 (lung) 疾患 (COPD、COAD、COLD)、肺気腫、ならびに、その他の薬剤治療、特にその他の吸入薬治療の結果としての気道の過反応性の悪化が挙げられる。本発明はまた、例えば、急性、アラキディック (arachidic)、カタル性、クループ性、慢性または結核性 (phthinoic) 気管支炎をはじめとするいかなる種類または起源の気管支炎の治療にも適用できる。本発明を適用できるさらなる炎症性または閉塞性気道疾病としてはいかなる種類または起源の塵肺 (粉塵の吸入の反復によって引き起こされる、慢性であるか急性であるかに関わらず気道閉塞を伴うことが多い、炎症性で、通常職業性の肺の疾病) も挙げられ、例えば、アルミニウム肺症、炭症、石綿沈着症、石肺症、プチロシス (ptilosis)、鉄沈着症、ケイ肺症、タバコシス (tabacosis) および綿肺症が挙げられる。

10

【0060】

その抗炎症活性を考慮して、特に、好酸球活性化の阻害に関連して、本発明の薬剤はまた、それが気道および/または肺、ならびに、例えば、レフラー症候群、好酸球性肺炎、寄生虫 (特に後生動物) 感染 (熱帯性好酸球増加症をはじめとする)、気管支肺アスペルギルス症、結節性多発性動脈炎 (チャグ・ストラウス症候群をはじめとする)、好酸球性肉芽腫の結果として起こるか、またはこれに付随する気道の好酸球関連疾患および薬剤応答によってもたらされた気道に影響を及ぼす好酸球関連疾患に作用するので、好酸球関連疾患、例えば、過好酸球増加症をはじめとする好酸球増加症、特に、気道の好酸球関連疾患 (例えば、肺組織の病的な好酸球の浸潤をはじめとする) の治療にも有用である。

20

【0061】

本発明の薬剤はいずれのか適当な経路、例えば、経口的に、例えば、錠剤またはカプセル剤の形態で；非経口的に、例えば、静脈内に；局所的に、例えば、軟膏またはクリームで；経皮的に、例えば、パッチで、吸入によって；または鼻腔内に投与すればよい。

30

【0062】

本発明の薬剤を含有する医薬組成物は従来の希釈剤または肺形剤および生薬の技術分野で公知の技術を用いて製造すればよい。従って、経口投与形としては錠剤およびカプセル剤が挙げられ、吸入用組成物はエアロゾルまたはその他の微粒化可能な製剤または乾燥粉末製剤を含んでなってもよい。

【0063】

本発明は (A) 吸入可能な形態の、例えば、エアロゾルまたはその他の微粒化可能な組成物の、または吸入可能な微粒子、例えば、微粉化した形態の本発明の薬剤、(B) 吸入可能な形態の本発明の薬剤を含んでなる吸入可能な医薬；(C) このような吸入可能な形態の本発明の薬剤を吸入装置と関連して含んでなる医薬製剤；および (D) 吸入可能な形態の本発明の薬剤を含有する吸入装置を含む。

40

【0064】

本発明を実施するのに用いる本発明の薬剤の用量はもちろん例えば、治療される特定の症状、望まれる作用および投与様式によって異なる。一般に、吸入による投与に好適な日用量は $1\mu\text{g} \sim 10\text{mg}/\text{kg}$ のオーダーであり、他方、経口投与に好適な日用量は $0.1\text{mg} \sim 1000\text{mg}/\text{kg}$ のオーダーである。

【0065】

上記のポリペプチド (B) または気管支過敏症と関連している上記の変異ポリペプチド、

50

例えば、配列番号7または配列番号8のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドの変異体によってコードされ、その変異体が配列多型を含むポリペプチドをその活性のエンハンサー（アゴニスト）またはインヒビター（アンタゴニスト）を同定するために、すなわち、炎症性または閉塞性気道疾病、特に喘息を治療するのに有用な化合物を同定するために用いてもよい。エンハンサーまたはインヒビターは例えば、ペプチド、ペプチドミメティクス、核酸または低分子量化合物であってもよい。従って、本発明はまた、ポリペプチド（B）または気管支過敏症、特に、喘息と関連しているその変異体の活性を調節する物質などの炎症性または閉塞性気道疾病の治療に有用な物質を同定する方法を提供し、これは候補物質を上記ポリペプチド（B）または上記のその変異体と混合して候補物質の上記活性に対する作用を測定すること

10

を含んでなる。ポリペプチド（B）または変異体の活性は、例えば、Sanoら、EMBO Journal 12: p.2249 - 2256によって記載されたように、例えば、L細胞におけるホモタイプなCa²⁺依存性凝集および接着を促進することによって測定すればよい。本発明はまた上記のポリペプチド（B）またはその変異体と結合する物質、特に、喘息などの炎症性または閉塞性気道疾病の治療に有用な物質を同定する方法を含み、これは候補物質を上記ポリペプチド（B）または上記変異体と混合して結合が生じたかどうかを調べることを含んでなる。

【0066】

別の態様では、本発明は上記のポリヌクレオチド（A）の変異体によってコードされる変異ポリペプチドと結合するか、その活性を調節する物質、特に、喘息などの炎症性または閉塞性気道疾病の治療に用いるのに好適な物質を同定する方法を提供し、これは候補物質

20

を上記変異ポリペプチドと混合して（i）結合が生じたかどうかを調べ、かつ/または、候補物質の上記活性に対する作用を測定することを含んでなる。

【0067】

本発明を以下の実施例によって例示する。実施例に用いた略語は以下の意味を有する：

AEBSF： 4 - (2 - アミノエチル) ベンゼンスルホニルフルオリド

BAC： 細菌人工染色体

BAP： 1, 4 - ビス(アクリロイル)ピペラジン

BHR： 気管支過敏症

BLAST： 基礎的局所アラインメント検索ツール(basic local alignment search tool)

BSA： ウシ血清アルブミン

CSGE： コンホメーション感受性(conformation sensitive)ゲル電気泳動

dNTP： デオキシヌクレオチド三リン酸

DTT： ジチオスレイトール

EIA： 酵素免疫アッセイ

EST： 発現された配列タグ

FAM： 6 - カルボキシ - フルオレセイン

FCS： 胎児ウシ血清

HBEC： ヒト気管支上皮細胞

LBNL： ローレンス・バークレー国立研究所

LOD： オッズの対数

MTN： マルチプル・ティッシュ・ノーザン

ORF： オープン・リーディング・フレーム

PAC： P1人工染色体

PCR： ポリメラーゼ連鎖反応

PBS： リン酸緩衝生理食塩水

PEG： ポリエチレングリコール

PMSF： フェニルメチルスルホニルフルオリド

SDS - PAGE： ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動

SNP： 単一ヌクレオチド多型

STS： 配列タグをつけた部位

10

20

30

40

50

TAMRA : 6 - カルボキシ - テトラメチル - ローダミン

TDT : 伝達不均衡試験

TET : テトラクロロ - 6 - カルボキシ - フルオレセイン

TTE : 44mMのTris、14.5mMのタウリン、0.1mMのEDTA、pH9.0

【実施例1】

【0068】

喘息患者および非喘息患者の個体をオランダの喘息の遺伝学についての家系研究から選択する（[Panhuysenら, *Clinical and Experimental Allergy* 25 (付録2) : p.35 - 38] ; フローニンゲン大学病院およびメリーランド大学の医薬品倫理委員会が本研究を承認しており、記入されたインフォームド・コンセントをすべての参加者から得る）。ピートリックソード、ハレン、オランダにおける、1962年と1975年の間の、喘息の患者を喘息の診断およびその治療の最適化について評価する。この第1の評価からこの研究に含めるには、患者は3つの基準を満たさなければならない：(1)喘息に一致する症状；(2)年齢 45歳；(3)ヒスタミンに対する気管支過敏症（デ・フリースの30秒吸入法を用いてPC20 32mg/ml ; [de Vriesら, *International Archives of Allergy* 20 : p.93 - 101]）。臨床評価は一般的な空気アレルギーでの皮内皮膚試験の実施、ウォーターシール肺活量計（Lo de Spirograph、グローニンゲン、オランダ）での肺機能試験、および30秒吸入プロトコルを用いるヒスタミンでの気管支過敏症についての試験 [de Vriesら, *Int. Arch. Allergy* 20 : p.93 - 101] を含む。DNA単離、総IgE、特異的IgEおよび好酸球測定のために血液サンプルを採取する。

10

20

【0069】

1990年以降、これらの発端者とその配偶者、最小2人の子供、可能なら孫とともに再研究する。全体で、200の2および3世代の家族を研究する。この第2の評価（1990～1998）では、発端者では第1の評価（1962～1975）で行われた測定を反復し、また家族でも実施する。800μgのサルブタノール（アルブテロール）の投与の20分後に肺活量計を反復することによって可逆性を調べる。すべての参加者に可能であれば臨床試験の前に肺の薬物治療を停止するよう求める：吸入副腎皮質ステロイドは14日間、吸入長時間作用性 ミメティックスおよび経口抗ヒスタミンは48時間、吸入短時間作用性 ミメティックスおよび抗コリン薬は8時間停止する。喘息患者は研究の前に喘息悪化しなかったか、または6週間の経口プレドニゾンの過程を必要としなかった。

30

【0070】

この評価は喘息およびアレルギーの症状および治療についてのさらなる質問を含む英国医療審議会（British Medical Council）アンケートの改変型をさらに含む [Panhuysenら, *Clinical and Experimental Allergy* 25 (付録2) : p.35 - 38]。定義により、発端者には医師の喘息の診断が存在する。配偶者においては、被験者が(1)現在喘息の定期的な治療を受けている、(2)これまでに開業医または喘息の専門医を訪れたか、あるいは(3)これまでに喘息の医薬品を用いたと報告する場合には、喘息の所見があるとする。アレルギー性鼻炎は以下の質問のうちの1つに対する肯定的回答と定義する：(1)動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）、羽（例えば、枕の中の）の周辺にいるとき、または家のほこりっぽい場所；または(2)木、草、および花の周辺にいるときに鼻水や鼻詰まりがあるか？。花粉症は質問：これまでに花粉症だったことはあるか？に対する肯定的な回答と定義する。

40

【0071】

第1の92家族では血清総IgEは固相免疫アッセイによって測定されている [Panhuysenら, *Clinical and Experimental Allergy* 25 (付録2) : p.35 - 38]。108家族の第2のセットでは、血清IgEレベルは酵素結合蛍光アッセイによって測定する（Mini Vidas、Biomerieux Vittek Inc.、マーシー、フランス）。皮膚試験は16種の一般的な空気アレルギー、陽性および陰性対照を用いる皮下皮膚試験によって実施されている。以下のアレルギーを試験する：混合した花粉、2種の混合した木の花粉、混合した草、イエダニ、貯蔵庫ダニ、ネコ、イヌ、ウマ、ウサギ/モルモットの鱗屑、羽混合物および5種の糸状菌類（*Aspergillus*

50

fumigatus, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Botrytis Cineria*)。(ALK - Abello、ニューゲイン、オランダ)。陽性皮膚試験は最大膨疹径が 5mmである場合に存在すると考えられている。

【0072】

オランダの家族において、候補遺伝子アプローチを用いて、総血清IgEレベル [Meyersら, *Genomics* 23: p.464 - 470]、気管支過敏症 [Postmaら, *New England Journal Medicine* 333: p.894 - 900] および喘息 [Panhuysenら, *Journal of Investigative Medicine* 43: 281A; Bleeckerら, *American Journal of Human Genetics* 59: A213] のヒト染色体5qとの連鎖についての証拠がこれまでに認められている。しかしながら、その他の複雑な疾病で認められたように、連鎖領域は広い (> 40cMにまたがるサイトカインクラスターから₂アドレノセプター領域)。連鎖領域を絞り込むために、標準的なプロトコール(ピュアジーン (Puregene) キット、Genra Systems Inc.、ミネアポリス、ミネソタ州)を用いて血液DNAサンプルからDNAを抽出する。染色体5q31~q33領域にまたがるトリおよびテトラヌクレオチドリピートからなる37種のマーカーの収集物を用いてDNAサンプルの遺伝子型を同定する。蛍光標識したプライマーを用いるマルチプレックスPCRを実施し、得られる増幅された断片を変性ポリアクリルアミドゲルで分離する。標識した断片をABI377配列決定機を用いて検出し、従来技術を用いてGENOTYPERソフトウェア [Applied Biosystems, USA] を用いて遺伝子型をスコアづけする。プログラムリンケージ・デザイナー [Van Campら, *Trends Genetics* 13: 82] の改変版を用いて対立遺伝子をピンとして遺伝を調べる。次いで、疾病情報を用いずに、Linkage DesignerのアウトプットをLINKAGEバージョン5.1ソフトウェア [Handbook of Statistics, Vol.8, RaoおよびChakraborty (編) p.81 - 123のLathropおよびLalouel, Elsevier Science Publishers BV, アムステルダム] を用いていずれかの不一致について解析する。データの最終チェックとして、CRIMAP [LanderおよびGreen, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: p.2363 - 2367] を用いて染色体マップの順序および長さを調べ、二重組換えを検出する。連鎖している家族では、この解析により7.0を超えるLODスコアを有するBHRの連鎖領域が同定される。ピークLODスコアはマイクロサテライトマーカーD5S2011およびD5S2017によって規定される。

【実施例2】

【0073】

ローレンス・パークレー国立研究所ゲノムセンターウェブサイト (LBNL; www-hgc.lbl.gov/biology/bacmap/2.gif) で入手可能なヒト染色体5q31~q33についての物理的マップ情報を用いて同定され、Research Genetics (ハンツビル、アラバマ、USA) からBACクローン番号h164 (22f14)、c5 (50g20)、h187 (35k5)、h167 (8e5) およびh177 (32d16) として得られるマーカーD5S2011とD5S2017の間の染色体領域にまたがる細菌人工染色体 (BAC) クローンおよびGenome Systems Inc. (セントルイス、ミズーリ、USA) によるLBNLウェブサイト (www-hgc.lbl.gov/sts.html) で入手可能なSTSマーカーbac51107T (BAC50g20の5'末端) およびbac51330T (BAC22f14の3'末端) に関して、配列番号9~12を含むプライマーを用いるPCRによって単離されたP1人工染色体 (PAC) (BACおよびPACはともにヒト染色体領域5q31~5q33のサブ領域をカバーしている) をABI377配列に関する従来技術 (<http://www.pebio.com/ab/about/dna/377/>) を用いて配列決定する。得られるゲノムDNA配列をGENSCAN (BurgeおよびKarlin, *Journal of Molecular Biology* 268: p.78 - 94) およびGENEMARKバージョン2.4 (BorodovskyおよびMcIninch, *Computers and Chemistry* 17: p.123 - 133) 遺伝子検出プログラムおよびBLAST (Altschulら, *Journal of Molecular Biology* 215: p.403 - 410) 相同性検索を用いて公開タンパク質、ESTおよびDNAデータベース (SWISSPROT、SWISSPROTPLUS、GenBank、Genbankアップデート、EMBL、GENEMBLPLUS、GenBank EST、EMBL EST、GenBank STS、EMBL STS) に対して解析し、その結果をグラフィック・ディスプレイのためにACeDb (A C. elegans Database; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Acedb/>) のヒト5番染色体特異的バージョンに解析する。このグラフィック・ディスプレイから重要な領域 (すなわち、遺伝子) を予想されるエキソンおよびアラインされた

10

20

30

40

50

EST/タンパク質ヒットによって同定する。遺伝子AAGAは、まず、グラフィック・ディスプレイでゲノムDNAの少なくとも22.5kbをカバーし、かつ、配列決定されていないDNAのストレッチによって分離されたDNA配列の2つの島に広がる153~2196bpの大きさにわたる5個のエキソンを含んでなるGENSCANで予測された遺伝子として同定される。

【表1】

GENSCANで予測された エキソン	ヌクレオチド位置*		エキシソンの大きさ (bp)
	配列番号1	配列番号2	
1	1053-1889	-	837
2	5031-7226	-	2196
3	12987-13206	-	220
4	16002-16396	-	395
5	-	1695-1847	153

*示された座標は本来のゲノム配列の逆補体に関するものである。

【0074】

GENSCANで予測されたエキソン中のDNA配列はヒトをはじめとする各種生物におけるカドヘリン型分子と相同性を有するタンパク質をコードし、このことはそれがカドヘリンタンパク質ファミリーのメンバーであるということを示唆する。100%の相同性はプロトカドヘリン42遺伝子(GENEBANK受託番号L11370、L11369およびAA481656)に相当するmRNA配列およびESTで検出される。mRNAおよびEST配列のアラインメントにより3種のスプライシング変異体が確認されており(配列番号4、5および6)、そのうちの2種がこれまでに同定されている(Sanoら, EMBO Journal 12: p.2249-2256)、1種(配列番号6)は新規のものである。LasergeneソフトウェアのEditSeqモジュール(DNASTAR社、マディソン、ウィスコンシン、USA)を用いる最長オープン・リーディング・フレーム(ORF)についての配列番号4、5および6の解析により3198個のヌクレオチド(配列番号4、377~3574位)および3729個のヌクレオチド(配列番号5および6、377~4105位)のORFが示されている。配列番号4のORFはこれまでに報告されたものよりも118ヌクレオチド長く(494-3574位; Sanoら, EMBO Journal 12: p.2249-2256およびGenBank受託番号L11370)、翻訳によりGenBank受託番号L11370について予測されるものよりも39アミノ酸長いタンパク質(配列番号7)を生じる(1065個のアミノ酸対1026個のアミノ酸)ということを示記する。配列番号5および6のORFは1242個のアミノ酸のタンパク質(配列番号8)に翻訳される。

【0075】

エキソン2に相当し、かつ、配列番号13および14を含むプライマーを用いてヒトゲノムDNAから作製した441bpのPCR断片を用い、多数のヒト組織由来のmRNAのノーザンプロット(ヒト12レーン MTNプロット; Clontech Laboratories UK Ltdベージングストーク、ハンブシャー州、UK)をプローブしてAAGAの発現パターンを調べる。スプライシング変異体に相当するバンドが脳、心臓、骨格筋、大腸、腎臓、肝臓、小腸、膵臓および肺で検出されている。胸腺、脾臓および末梢血リンパ球についてはハイブリダイゼーションは検出されていない。配列番号13および14を含むプライマーを用いる種々の細胞系由来の第1鎖cDNAのPCR解析によりAAGAは活性化されたおよび活性化されていないヒト気管支上皮細胞(HBEC)で高レベルで、線維芽細胞で中程度のレベルで、そして好中球およびマクロファージで低レベルで発現されるということが示されている。

【実施例3】

【0076】

本実施例では、喘息患者から単離された血液DNAからPCR増幅したDNA断片において可能性ある配列変化を検出するためにコンホメーション感受性ゲル電気泳動(CSGE: Ganguly et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90: p.10325-10329; GangulyおよびWilliams, Hum. Mut. 9: p.339-343)を用いる。DNAヘテロ二本鎖中の単一塩基のミスマッチを、コンホメーション変化を生じさせ、

10

20

30

40

50

かつ、ホモ二本鎖とヘテロ二本鎖の移動の相違をもたらして mismatches の傾向を増幅する軽い変性溶媒の存在下でポリアクリルアミドゲル電気泳動で検出する。ヘテロ二本鎖を複製するために、増幅した PCR 産物を熱変性させ、アニーリングさせ、次いで、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析する。DNA 断片は臭化エチジウムによって可視化する。次いで、差のある電気泳動移動パターンを示す DNA 断片を配列決定してポリヌクレオチド配列の変化の存在およびこの変化の正確な性質を確認する。

【0077】

Lasergene ソフトウェアの EditSeq モジュール (DNASTAR, Inc., マディソン、ウィスコンシン州、USA) を用いて配列番号 4、5 および 6 を手作業で配列番号 1 および 2 とアラインする。この解析は配列番号 4、5 および 6 の 5' 末端で DNA 配列の 470bp のセグメントは配列番号 1 または 2 とアラインしないということを示す。失われているゲノム配列を同定するために GENBANK データベースの BLAST 検索をこの 470bp の mRNA 配列を用いて行う。これにより GENBANK 受託番号 AC013643 (ヒトクローン RP11 - 16P20 由来の 13 個の順序づけられていない部分の 154594bp のワーキングドラフト配列) において 2717bp のゲノム DNA 配列 (配列番号 3) が同定されている。アラインメント解析は 3 つの選択的転写物はゲノム DNA の少なくとも 21kb にまたがる 7 つのエキソンに由来するということを示す。

10

【表 2】

スプライシング変異体 1

エキソン	配列番号 4	配列番号 3 中のヌクレオチド位置 †	配列番号 1 中のヌクレオチド位置 †	エキソンの大きさ (bp)
1	1-456	2115-2570	-	456
*	457-470	-	-	14
2	471-1052	-	1030-1611	582
3	1053-1298	-	1648-1893	246
4	1299-4069	-	5035-7805	2771

20

【表 3】

スプライシング変異体 2

エキソン	配列番号 5	配列番号 3 中のヌクレオチド位置 †	配列番号 1 中のヌクレオチド位置 †	エキソンの大きさ (bp)
1	1-456	2115-2570	-	456
*	457-470	-	-	14
2	471-1052	-	1030-1611	582
3	1053-1298	-	1648-1893	246
4	1299-3490	-	5035-7226	2192
5	3491-3710	-	12987-13206	220
6	3711-4648	-	16002-16950	949

30

【表 4】

スプライシング変異体3

エクソン	配列番号5	配列番号3中の ヌクレオチド 位置†	配列番号1中の ヌクレオチド 位置†	配列番号2中の ヌクレオチド 位置†	エクソンの大 きさ (bp)
1	1-456	2115-2570	—	—	456
*	457-470	—	—	—	14
2	471-1052	—	1030-1611	—	582
3	1053-1298	—	1648-1893	—	246
4	1299-3490	—	5035-7226	—	2192
5	3491-3710	—	12987-13206	—	220
6	3711-4591	—	16002-16896	—	895
7	4592-4684	—	—	797 - 889	93

* mRNA配列は入手可能なゲノム配列とアラインしない。

† 示された座標は本来のゲノム配列の逆補体に関するものである。

【 0 0 7 8 】

AAGA遺伝子配列に対応するPCRプライマーセットを配列番号1および2およびPrimer Express (登録商標) (バージョン1.0; Perkin Elmer、P/N604313) を用いて設計する。これらのプライマーセット (配列番号15~94) は以下のとおりである。

【表 5】

プライマー セット		
1	GTACACTACCCGAGTGGCGTG	CCTCTTACTGGCTCCTCCAGC
2	AGCTGGCCCCATACTCACC	CGTCCACTGGCTCTCTCTCC
3	TCCCGCCCATGGAACA	GACTTGGCATCTCAGAACAAGAG
4	CTCCCCACATGCATGGTAGG	GCATGCTCTGGGGCATGT
5	TCCTCTTTTTCTGACAATCACCC	AAGGACAGGCCAGGGCAG
6	TTCTGGCAGTTTTTCCCTAAG	GAGCTATTTGGGCTGCAGGT
7	TCAAGCACGGTGACACGC	GCCCCGGCTGCTAGA
8	TGGGACCAGCATCACGG	CAGCCGACTATGGTTTTCCAG
9	GATGCAGGGATCACCAGGG	CTTGCAGCCTTCCTGATTCTG
10	CTTGACACCAATGACAACGCC	TCAGAGTTCCCCAGCTT
11	TAGTGAGACCCCTTCTCCCA	CTTTGTCAGGAAGAGGCAAATG
12	AGGTGAGCTGAGTTGGAACAAAG	CCAAGCTGCCTAGTGCCTG
13	ATACATGCCTCCTCCCCTAGG	CACTTGGCTTGAGGACCCA
14	CAGCCCAGCTCCTTTC	TGGGCCCGGTTTCTCAT
15	GGGTACAATGGGCAGGTCT	AGTCTACTCCAAACCTAGGTCTCTATGTCA
16	TGGGACCAGCCCCAG	GCACACGGATTAGGCTGAGTG
17	CCTACCACCCCAACCCA	GAGCAGTACTCCGACTACAGCTACC
18	TGGCCCCAACACGG	TCCCCGCATCCACCTG
19	AATGTGTTTGCAGGTGGCAG	GGAGGCCAAAAGTGGTTACCA
20	TCATCCTCGTCTCCACTGG	GGCACAGCCTTGGTCCATC
21	TTGCCACGCTGCTTGGAG	GTCTTGGTGAGACGGTCAGCC
22	GTGGCGCCGCTCAATCT	CAACGGTGACTTTGTTATCCAGAA
23	AAGCTGAGCGAGGTGGGA	GAGAGCTATGAGTTGAAGGTGGTG
24	CTGGCATGTTCTCCATCACTGAG	ACAACGCACCTGTCTTCACTCAG
25	AGATGGTGAAGAGGCCCTTAGC	GCAGGTGATGTGCCCTTCC
26	GGAGTTAGTGCTGGAGAGTGGG	CAAGAGTGCCCGTGCC
27	GTCTCCTCTGCCACATCCTCTG	CCCTGATCTAAACCATCTCTGTTCTC
28	CTGTCCAGTCAAGAAGACGC	TGTCCCATCTCCAATAGTTGCC
29	CAATACATAGATGATTTGTTTAAAGCCT	ATGGTGGTGGGCCCTGT
30	GACACTGCATGACCAGCAGG	ACTGGGCTCCTTCCCTTGAC
31	CCCTGCTTCAGGGCTAAAATT	CCAAATGGCCATTCCAG
32	GATGGAAATGAGGGGAGAGGAC	ACACCAAACGGCCCC
33	GTGTGGCTGCGGGTGG	CCGCTCCCTCCTACAGACCT
34	CCGTTTGGTGTTCCGGTC	TGCCTGTGAGTTCAGCGGT
35	ATCCCTGGCGCTGCG	CCCGATTAATACCAGTCCGG
36	TCCCAACCCAGGCATCC	AAAGGCGCTGTCTCTCCA
37	CTTAGTTCTGGCCCCCTGCCT	CTACAAACATTTCTGAGCCCC
38	GCCAGAATTTCCGGCTCAA	CAACCCTTCTAAACCTGAGGC
39	TCCTCACCTTCACTGTGGG	CCTTGCTGCTTTCGGAGAGA
40	GGAGACCGAGGCTGAGACCT	AGCTGACGCGTTCTGAGGAT

10

20

30

40

【0079】

上記のプライマーセットを用いて、16人の喘息患者由来の血液DNAサンプルから40種のポリヌクレオチドを増幅する。PCR反応を1×GeneAmp（登録商法）10×PCRバッファー（Perkin Elmer P/N N808-0240）、13ngの鋳型DNA、400μMの各dNTP（Amersham Life Science Nucleix Plus（登録商標）25mM dNTPミックス；製造番号US77119）、30ngの各プライマー、2mMのMgCl₂および0.5uのAmpliAq Gold（登録商標）ポリメラーゼ（Perkin-Elmer P/N N808-0242）を含有する10μlの反応容積で実施する。

【0080】

Biometra UNO IIサイクラー（パート番号050-603；アナケム社、ルートン、UK）を用いる典型的な熱サイクリング条件は以下のとおりであり、配列ステップ2-ステップ3-ス

50

テップ4を36回反復する：

ステップ1	95	10分
ステップ2	92	1分
ステップ3	60	1分
ステップ4	72	2分
ステップ5	72	10分

【0081】

ヘテロ二本鎖を作製するために、熱サイクラー（例えば、Biometra UN011）を用いて2 μ lのPCR産物を95 $^{\circ}$ Cで10分間変性させて68 $^{\circ}$ Cにて30分間アニーリングさせる。ゲル解析の前に各サンプルに2 μ lの2 \times ローディングバッファー（20%のエチレンジグリコール、30%のホルムアミド、0.025%のキシレンシアノール、0.025%のプロムフェノールブルー）を加える。

10

【0082】

標準的なDNA配列決定装置（Owl Scientific S3S；Autogen Bioclear UK Ltd.）を60のサンプルコーム（Owl Scientific S2S - 60A；Autogen Bioclear UK Ltd.）および温度プローブ（Biorad、カタログ番号165 - 5058）を備えた標準的な電源装置（Biorad、カタログ番号165 - 5057）とともに用いる。0.4mmの厚さの15%ポリアクリルアミドゲルを99：1の割合のアクリルアミド対BAP架橋剤、0.5 \times TTE中の10%エチレンジグリコールおよび15%のホルムアミドを用いて調製する。ゲルは温度を最高25 $^{\circ}$ Cに制限しながら（必要に応じて扇風機、例えば、Jencons、カタログ番号292 - 004を用いて温度を低く維持しながら）30ワットにて1時間プレ・ランする。プレ・ラン後、ウェルをピペットを用いて洗い流してサンプルをウェルにのせる。次いで、ゲルを25 $^{\circ}$ Cにて12ワットで一晩（15時間）電気泳動する。350bpよりも大きい断片はゲルに残す。

20

【0083】

電気泳動後、ゲルプレートを分離する。ゲルを1 μ g/mlの臭化エチジウム（バイオラッド、カタログ番号161 - 0433）を含有する0.5 \times TTEに10分間入れることでゲルを染色し、次いで、0.5 \times TTE中で10分間脱染する。次いで、UVトランスイルミネーター（例えば、UVP GDS 7500）上でゲルの写真をとる。

【0084】

40種のPCR断片のうちの15種について16人の患者のうちの1人以上において可能性あるポリヌクレオチド変化がCSGEによって検出されている。これらの可能性ある変化の各々について、16人の患者すべて由来のPCR断片を標準的な方法を用いるABI377自動シーケンサーでの二本鎖DNA配列決定に付し（<http://www.pebio.com/ab/about/dna/377/>）、得られるDNA配列をCONSEDソフトウェアを用いて解析し（Gordonら，Genome Research 8：p.195 - 202）、配列変化の存在を確認し、正確な塩基変化を同定する。CSGEによって検出された15種の可能性ある変化のすべてが確認されている。多型変化を示す患者の番号を以下の表に示す：

30

【表6】

多型	配列番号 1位置	配列番号2 (逆補体)位置	配列番号 4位置	アミノ酸変化	患者 番号
GからT	589	—	—	イントロン1	16
CからT	1001	—	—	イントロン1	2
CからA	1060	—	501	Pro3His (エキソン2)	16
GからC	2033	—	—	イントロン3	1
TからG	2193	—	—	イントロン3	1
AからG	2561	—	—	イントロン3	16
GからA	5667	—	1931	Ala480Thr (エキソン4)	1
CからT	5804	—	2068	Pro525Pro (エキソン4)	1
CからT	6377	—	2641	Ala716Ala (エキソン4)	14
GからC	7390	—	3654	3' 非翻訳	5
GからT	7531	—	3795	3' 非翻訳	1
GからC	—	1212	—	3' 非翻訳	12
GからA	—	1216	—	3' 非翻訳	1
GからA	—	1964	—	3' 非翻訳	2
GからA	—	2330	—	3' 非翻訳	5

10

【0085】

検出されたポリヌクレオチド変化のうち2つはAAGAによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を変更し(非症候性変化)、2つは症候性であり(遺伝コードの縮重による残基変化はない)、11は遺伝子の非コード領域に生じている。

20

【0086】

オランダの家族から200組の3人組(両親と罹患した子供)をABI PRISM(登録商標)7700配列検出機(PE - Applied Biosystems、ウォリントン、UK)でTagMan(登録商標)技術を用いる対立遺伝子識別アッセイによって配列番号1の1060、2561、6377、7390位および配列番号2の2330位でのSNPについて遺伝子型を同定する。2つのTaqMan(登録商標)蛍光発生プローブ(一方は非SNP対立遺伝子に特異的であり、他方はSNP対立遺伝子に特異的である)を設計してPCR増幅した標的配列のSNP部位とハイブリダイズさせる。

【表7】

位置	SNP	非SNP
1060	TGCCTCAGGGGCTCCATCCT	TGTGCCTCAGGTGCTCCATCCT
2561	TGCCTCACCGGCACACG	TGCCTCACCGGCACACG
6377	TAGATCAGCTCGGCATTGACACCAG	CTGTAGATCAGCTCAGCATTGACACCAG
7390	CTCCCATGTGCCAGACCGGC	CCTCCCATGTACCAGACCGGCA
2330	TGCCCCAGGCACTAGGCAGCT	TGCCCCAGGCGCTAGGCA

30

【0087】

TaqMan(登録商標)プローブは蛍光レポーター色素(FAMまたはTET)およびクエンチャー色素(TAMRA)がそれぞれ5'および3'末端に共有結合されたオリゴヌクレオチドからなる。無処理のプローブではレポーター色素のクエンチャー色素への近接はレポーター蛍光の抑制をもたらす。標的配列の増幅の際には、プローブはPCRの伸長ステップの間に切断される。これによりクエンチャー色素の影響がなくなりレポーター色素が蛍光を発することが可能となる。SNPおよび非SNPプローブは異なるレポーター色素を保持するので、各色素の蛍光レベルはサンプル中のSNPまたは非SNP標的配列の量に比例する。

40

【0088】

伝達不均衡試験 [Spielmanら, American Journal of Human Genetics 52: p.506 - 516] を用いて5つの遺伝子型のSNPと喘息/喘息の亜型間の遺伝的関連について調べる。この試験では、親から罹患した子供に伝達された対立遺伝子と同じ親から伝達されていないその他の対立遺伝子に対してマッチさせる。次いで、得られた対に不一致についてのMcNemarのカイ2乗検定を適用する [TerwilligerおよびOtt, Human Heredity 42, p.337 - 346]

50

。200組のオランダの喘息家族から得られた遺伝子型データのTDT解析により配列番号1の6377位 ($p = 0.00017$) および7390位 ($p = 0.00049$) のSNPと気管支過敏症の間の強い遺伝的関連が示され、AAGAは喘息の罹患性遺伝子であり、また2つのSNPを保持する個体は気管支過敏症を発症する危険が高いことを示している。さらに、家族ベースの関連試験 [FBAT; Horvath, XuおよびLaird, European Journal of Human Genetics 9, 301 - 306] を用いて、6377および7390位のSNPそれぞれについて $p = 0.01$ および $p = 0.001$ が得られている。

【実施例4】

【0089】

本実施例はT. ni Hi5細胞におけるバキュロウイルス系を用いるC末端に6個のヒスチジンタグをつけた全長AAGAの発現および得られたポリペプチドの精製に関する。 10

【0090】

1. 組換えAAGAバキュロウイルスの構築

以下のプライマー:

5ST

5' - GAAGATCTTCGGAATTCCATCATGGTGATGGGGAGCCCTTTGGAG - 3'

を用いるPCR増幅によってユニークなEcoRI部位をAAGA開始コドンの5' (配列番号4、5および6の377位) に組み込む。

別のプライマーを用いて6個のヒスチジン残基をAAGA停止コドンの直前に(3ST1については配列番号4の3574位ならびに3ST2については配列番号5および6の4105位) 導入する。このプライマーはまたユニークなKpnI部位もAAGA停止コドンの3' に組み込む。 20

3ST1 (スプライシング変異体1)

5' -

AAGATCTTCGGTACCTCAATGGTGATGGTGATGGTGCTCCACACCTCGGTCCAG

- 3'

3ST2 (スプライシング変異体2および3)

5' -

AAGATCTTCGGTACCTCAATGGTGATGGTGATGGTGCAGGTAGATCTCGCGCTTG

- 3'

AAGAスプライシング変異体1の組換え「Hisタグをつけた」バージョンを3208bpのEcoRI / KpnI断片としてEcoRI / KpnI消化したpFastbac1バキュロウイルストランスファーベクター (Life Sciences) に連結する。AAGAスプライシング変異体2および3の組換え「Hisタグをつけた」バージョンは3739bpのEcoRI / KpnI断片としてEcoRI / KpnI消化したpFastbac1に連結する。組換えAAGA配列はDH10Bac細胞に保持されるBacmid DNAにトランスポートする (Life Sciences; Bac to Bacバキュロウイルス発現システム)。開示されたプロトコール (Bac to Bacバキュロウイルス発現システムマニュアル; Life Sciences) を用いてAAGA組換えBacmidをDH10Bac細胞から単離してSf9細胞にトランスフェクトする。 30

【0091】

2. 組換えバキュロウイルスストックの増幅

組換えバキュロウイルスを 0.5×10^6 細胞/mlの細胞密度および0.01の感染効率 (moi) で96時間Sf9細胞 (SF900 SFMII培地; Life Sciences) で維持された) に感染させることで増幅する。次いで、Sf9細胞を $1000 \times g$ で5分間遠心分離する。高力価ウイルスを含有する上清を4にて保存する。 40

【0092】

3. Hi5細胞における組換えAAGAの発現

Excell 401培地 (JRH Biosciences; 振盪フラスコ (90RPMで回転させた) またはスピナーフラスコ (75PRMで回転させた) のいずれかでAMS Biotechnology) によって分配された) で 3×10^5 から 3×10^6 個の間の細胞/mlの密度で維持されたHi5細胞 (Invitrogen) を増幅させた組換えバキュロウイルスを用いて2.0のmoiにて 2.0×10^6 の細胞密度で60時間感染させる。感染後、Hi5細胞を $1000 \times g$ で5分間遠心分離し、上清を捨てて細胞ペレットを - 8 50

0にて凍結する。

【0093】

4. 粗溶菌液調製

細胞 (1×10^9 個) を100mlの溶解バッファー (20mMのHepes pH7.5、100mMのNaCl、5%のグリセロール、2mMのβ-メルカプトエタノール、0.5mMのイミダゾール、0.1%のノニデットP-40、40 μg/mlのAEBSF、0.5 μg/mlのロイペプチン、1 μg/mlのアプロチニンおよび0.7 μg/mlのペプスタチンA) に再懸濁する。細胞を氷上で15分間インキュベートし、次いで、4にて39,000 × gで30分間遠心分離する。このサンプルを使用直前に0.22 μmのフィルターを通して濾過する。

【0094】

5. 金属キレートアフィニティークロマトグラフィー

金属キレートアフィニティークロマトグラフィーを室温にてBioCADクロマトグラフィーワークステーションに取り付けたカラムを用いて実施する。20mlのポロスMC/M (16mmD × 100mmL) カラムに使用前および各精製後にNi²⁺を充填する。Ni²⁺を充填するために、カラムを10カラム容積 (CV) の50mMのEDTA pH8、1MのNaCl次いで10CVの水で洗浄する。カラムに500mlの0.1MのNiSO₄ pH4.5~5を充填し、10CVの水で洗浄し、次いで、5CVの0.3MのNaClで洗浄することで結合していないNi²⁺を全て除去する。すべてのステップは20ml/分の流速で実施する。充填したMC/Mカラムを5CVのバッファーB (20mMのHepes pH7.5、500mMのNaCl、5%のグリセロール、2mMのβ-メルカプトエタノール、1mMのPMSF、250mMのイミダゾール) で満たし、次いで、10CVのバッファーA (0.5mMのイミダゾールを除いてバッファーBと同一) で平衡化する。20ml/分の流速での実施当たり90~95mlの粗溶菌液をカラムに入れる。次のステップは30ml/分の流速で実施する。12CVのバッファーAで洗浄することで結合していない物質はいずれも除去し、10CVにわたって0~100%のバッファーB勾配を適用することによってAAGAを溶出する。勾配にわたって画分 (8ml) を回収する。AAGA含有画分を合してプロテアーゼ阻害剤を溶解バッファーについて前に記載された最終濃度まで加える。DTTも1mMの最終濃度まで加える。合した画分を4にて4リットルの20mMのTris-HCl pH7.5、1mMのDTT、0.2mMのPMSFに対して一晩透析する。

【0095】

6. イオン交換 (陰イオン交換) クロマトグラフィー

4にてFPLCワークステーション (Amersham Pharmacia Biotech) に取り付けたカラムでResource (登録商標) Qクロマトグラフィーを実施する。6mlのResource (登録商標) Qカラム (16mmD × 30mmL) を2ml/分の流速にて10CVのバッファーC (20mMのTris-HCl pH7.5、1mMのDTT) で平衡化する。透析した金属キレート溶出液をカラムに入れて、10CVのバッファーCで洗浄する。10CVにわたる0~100%のバッファーD勾配 (20mMのTris-HCl pH7.5、1mMのDTT、1MのNaCl) を入れることでタンパク質を溶出する。カラムを溶出する際に画分 (3ml) を回収する。

【0096】

7. ゲル濾過

4にてBioCAD SPRINTクロマトグラフィーワークステーション (PE Biosystems) に取り付けたカラムでゲル濾過クロマトグラフィーを実施する。24ml (10mmD × 300mmL) のSuperdex 200HR (Amersham Pharmacia Biotech) カラムを0.5ml/分の流速にて10CVのバッファーE (20mMのTris-HCl pH7.5、1mMのDTT、150mMのNaCl) で平衡化する。イオン交換溶出液をカラムに入れバッファーEで溶出する。精製の実施による画分 (1ml) を回収して分析する。

【0097】

8. サンプル濃縮

4にてMillipore Ultrafree-15遠心分離装置 (分子量カットオフ50kDa) を用いてサンプルを約10倍濃縮する。この装置は使用前に予めすすぐ。-80での長期保存に用いる最終保存バッファーは20mMのHepes pH7.5、1mM DTT、100mMのNaCl、5%のグリセロールとする。4での保存にはサンプルからグリセロールを省略してもよい。

10

20

30

40

50

【実施例 5】

【0098】

本実施例は実施例4に記載されたように精製したAAGAタンパク質に対するポリクローナル抗体の作製に関する。

【0099】

ウサギの免疫化：

オランダウサギ (Harlen - Olac) を以下のスケジュールに従って4箇所 of 皮下部位でPBS中の500 μ gの精製したAAGAタンパク質で免疫化する。

【表 8】

日	免疫化
0	第1の免疫化フロイント完全アジュバント中の1:1
15	第1の追加免疫フロイント不完全アジュバント中の1:1
45	第2の追加免疫フロイント不完全アジュバント中の1:1
55	耳動脈からの第1の試験出血
毎月	良好な抗体応答が得られるまでフロイント不完全アジュバント中の追加免疫1:1

10

【0100】

試験出血 (500 μ l) を採取して血清を抗体力価について評価する。最大力価に到達した時点で血清を回収する。これは血液 (10ml) を採取によって行い、それを4 にて2時間凝結させることで可能となる。血液を1000 \times gで5分間遠心分離して血清を分離する。血清を回収してアッセイするまで - 20 にて保存する。

20

【0101】

ELISAスクリーニング：

Nunc - Immuno Plate \cdot Maxisorp 96ウェルプレート (Nunc, Fisher Scientific UK、ラフバラ、UK) を個体支持体として用い、4 にて精製したAAGAタンパク質 (100ng/ウェル) で一晚コーティングする。このプレートを37 にて2% BSA (Sigma) および0.02%のNaN₃ (Sigma) を含有するPBSで3時間ブロックする。ブロックした後、プレートをPBSの種々の希釈液中の血清とともに室温にて一晚インキュベートする。ポリクローナル抗体の存在を双方ともビオチン標識したウサギのIgG抗体 (ヤギ抗ウサギIgG抗血清、1:25000希釈) を用いて40分のインキュベーション時間で調べる。次いで、アルカリホスファターゼを結合させたストレプトアビジン (Immununo research、Dianova、CH) を1:10000希釈液で加える。ジエタノールアミンに溶解したアルカリホスファターゼ基質 (Sigma、f.c. 1mg/ml) を加えることで反応の進行を実施する。45分後、ELISAプレートリーダー (Bio-rad laboratories Ltd.、ヘメルヘムステッド、UK) を用いて490nmを参照して405nmの吸光度を読む。

30

【0102】

精製：

5mlのプロテインA - アガロースをクロマトグラフィーカラムに流し入れて6カラム容積の0.1Mのtris (ヒドロキシメチル) メチルアミン (Tris) バッファー pH7.5で洗浄する。抗AAGA抗体を含有するウサギ血清をTrisバッファーで希釈し (1/2) てプロテインA - アガロースに加える。カラムを6容積のTrisバッファーで洗浄することで結合していないタンパク質を除去する。3カラム容積の0.1Mのグリシンバッファー pH3.0を用いてカラムからIgGを溶出して1mlの画分として28 μ lの1MのTrisを含有するチューブに回収する。還元条件下でSDS - PAGEによってタンパク質含量について陽性である画分を純度について調べる。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖に相当する50および25Kdの2つのバンドを可視化する。免疫グロブリンのみを含有する画分をプールし、タンパク質濃度について再び調べて - 20 にて保存する。

40

【実施例 6】

【0103】

50

本実施例は実施例4に記載されたように精製したAAGAタンパク質に対するモノクローナル抗体の調製を記載する。

【0104】

マウスの免疫化

以下に示されるスケジュールに従って、雌のBalb/cマウスをPBS中の100 μ gのAAGAタンパク質を用いて腹腔内で免疫化する。

【表9】

日	免疫化
1	第1の免疫化フロイント完全アジュバントを用いる1:1
14	第1の追加免疫フロイント不完全アジュバントを用いる1:1
21	第2の追加免疫フロイント不完全アジュバント中の1:1
28-30	3回のPBS中の最終追加免疫
31	マウス骨髄腫細胞との融合

10

【0105】

融合用脾臓細胞を調製するために動物を屠殺した後ELISA(実施例5)によって血清を抗体力価について評価する。抗体力価が十分であれば(1/1000~1/100,000)、ハイブリドーマをスクリーニングし、そうでなければ廃棄する。

【0106】

骨髄腫細胞の調製

融合前にSp2/0ネズミ骨髄腫細胞(ATCC#CRL1581;20 μ g/mlの8-アザグアニンを含む培養培地で維持された)をRPMI1680(8-アザグアニンは含まれていない)、10%(v/v)FCSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン(それぞれ50IU/mlおよび50 μ g/ml)で1週間培養する。細胞を遠心分離(200 \times g5分間)によって回収して冷RPMI1640で3回洗浄する。96ウェルマイクロタイタープレート当たり約2.5 \times 10⁶個の細胞を用いる。

20

【0107】

脾臓細胞懸濁液の調製

マウスを過量の麻酔薬(フォレン)で屠殺し、脾臓を摘出してセルストレーナー(70 μ mメッシュセルストレーナー;ベクトン&ディキンソン、オックスフォード、UK、カタログ番号2350)に押し付けて通す。細胞懸濁液をRPMI1640(上記と同じ)で3回洗浄してカ

30

【0108】

骨髄腫細胞と脾臓細胞の融合

脾臓および骨髄腫細胞を混合し(2:1)、遠心分離して(200 \times g、5分間)ペレットを37 $^{\circ}$ C水浴で加温する。予め加温しておいたポリエチレングリコール4000(10⁸個の細胞当たり1ml)を1分にわたって、次いで、20mlの予め加温しておいた洗浄培地を2分にわたってゆっくりと加える。遠心分離した後、ペレットを選抜培地(RPMI1640、10%のFCS、1%のペニシリン-ストレプトマイシン、10%のBMコンディムドH1(Boehringer Mannheim、ルイス、UK製支持細胞置換;カタログ番号1088947))、10%のHAT培地サプリメント(融合されていない骨髄腫細胞を選択するためのヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン;Boehringer Mannheim、ルイス、UK;カタログ番号644579)に注意深く再懸濁して、200 μ l/96ウェルマイクロタイタープレートのウェルでプレーティングする。5日後、倒立顕微鏡でマイクロタイターウェルの底を調べることによってハイブリッド細胞のクラスターを同定すればよい。10~14日後、ELISA(実施例4)によって培養上清を抗体の存在について調べる。陽性クローンを24ウェルアッセイプレートに拡大して再試験する。

40

【0109】

陽性ハイブリドーマのクローニング

依然として陽性である拡大したクローンを限界希釈によってクローニングする。細胞を96ウェルマイクロタイタープレートにおける4つの希釈ステップで連続希釈する;5、2、1および0.5細胞/ウェル。HAT培地上清をHT培地サプリメント(Boehringer Mannheim、ルイ

50

ス、UK ; カタログ番号623091) で置換する。約1週間後、細胞をELISA (実施例4) によってスクリーニングする。単一の陽性クローンを含むウェルの細胞を拡大する。

【 0 1 1 0 】

モノクローナル抗体上清の作製

細胞をハイブリドーマが異常増殖して壊死するまで培養フラスコ中で標準的な培地 (RPMI 1640、10% (v/v) FCSおよび1%ペニシリン - ストレプトマイシン) で増殖させる。遠心分離によって細片を除去し、ELISA (実施例4) を用いて抗体を含有する上清の力価を求め、次いで4℃、-20℃または-70℃にて滅菌条件下で保存する。

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/008640 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, A61K 38/17, 39/395, 48/00, A61P 11/06
- (21) International Application Number: PCT/EP02/07847
- (22) International Filing Date: 15 July 2002 (15.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/305,649 16 July 2001 (16.07.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except AT, US): NOVARTIS AG [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).
- (71) Applicant (for AT only): NOVARTIS-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]; Brunner Strasse 59, A-1230 Vienna (AT).
- (71) Applicants (for all designated States except US): WAKE FOREST UNIVERSITY HEALTH SCIENCES [US/US]; Medical Center Boulevard, Winston Salem, NC 27157 (US); RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN [NL/NL]; Broerstraat 5, NL-9712 CP Groningen (NL).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): WHITTAKER, Paul, Andrew [GB/GB]; Novartis Horsham Research Centre, Wimbleshurst Road, Horsham, West Sussex RH12 5AB (GB); MEYERS, Deborah, Alexis [US/US]; Wake Forest University, Medical Center Boulevard, Winston Salem, NC 27157 (US); POSTMA, Dirkje, Sjoukje [NL/NL]; University of Groningen, Hanzeplein 1, NL-9713 GZ Groningen (NL); BLEECKER, Eugene, Roland [US/US]; Wake Forest University, Medical Center Boulevard, Winston Salem, NC 27157 (US).
- (74) Agents: GROS, Florent et al.; Novartis AG, Corporate Intellectual Property, Patent & Trademark Department, CH-4002 Basel (CH).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LT, LU, LV, MA, MD, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/008640 A2

(54) Title: DISFASI ASSOCIATED GENE

(57) Abstract: The invention relates to the use of an asthma-associated gene, designated AAGA, the protein molecule encoded by AAGA and related molecules in diagnostic and prognostic screening of patient populations, to polymorphisms in AAGA, and to the use of the protein encoded by AAGA or a variant thereof as a therapeutic target.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

1

Disease-Associated Gene

The present invention relates to the use of an asthma-associated gene, designated AAGA, the protein molecule encoded by AAGA and related molecules in diagnostic and prognostic screening of patient populations, to polymorphisms in AAGA, and to the use of the protein encoded by AAGA or a variant thereof as a therapeutic target.

Asthma is a very common lung disease with the following characteristics:

airways obstruction - this is usually reversible but often progressive
chronic bronchial inflammation - a condition characterised by inflammatory cell infiltration and activation, release of biochemical mediators and structural changes (airway remodelling)
bronchial hyperresponsiveness (BHR) - an exaggerated bronchoconstrictor response to a variety of immunologic, biochemical and physical stimuli.

Asthma is characterised clinically by chronic, intermittent airway obstruction with wheezing, coughing and breathlessness. Although asthma is typically associated with an obstructive impairment that is reversible, neither this finding nor any other single test or measure is adequate to diagnose asthma [Guidelines for the diagnosis and development of asthma, 1997, NIH Publication No. 97-4051]. Many diseases are associated with this pattern of abnormality. The patient's pattern of symptoms (along with other information from the patient's medical history) and exclusion of other possible diagnoses also are needed to establish a diagnosis of asthma. Clinical judgement is needed in conducting the assessment for asthma. Patients with asthma are heterogeneous and present signs and symptoms that vary widely from patient to patient as well as within each patient over time.

Many hypotheses have been advanced to explain the pathophysiology of asthma, including problems with airway smooth muscle, the role of inflammation, nervous innervation of the airways and mechanisms related to mediators. Although all of these factors may be important, it is unclear which are the primary (i.e. causative) defects and which are the secondary defects. It is generally agreed, however, that both the environment and genetics are important. Given the multifactorial nature of asthma, one approach to identifying the fundamental mechanisms is to discover asthma susceptibility genes that predispose individuals to develop asthma.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

2

One method which can be used to identify asthma susceptibility genes is positional cloning. In this method, susceptibility genes are localised to a specific region of a human chromosome by using DNA markers to track the inheritance of the genes through families. DNA markers are fragments of DNA with a defined physical location on a chromosome, whose inheritance can be monitored. The closer a DNA marker is to a susceptibility gene, the greater the probability that the marker and the susceptibility gene will be passed together from parent to child. This phenomenon is called genetic linkage. Once linkage to a specific chromosomal region has been obtained, the size of the region is narrowed down using a combination of physical and genetic mapping until the region is small enough to be sequenced and the susceptibility gene can be identified. After identification of the susceptibility gene, any polymorphisms in this gene can be determined and an analysis performed to see whether these mutations occur with greater prevalence in asthmatics compared to non-asthmatics. The major advantages of positional cloning are that it is possible to identify novel genes even though the underlying factors causing the disease are unknown, and the genes identified are of direct pathological relevance (i.e. primary causative defects) because they make carriers directly susceptible to developing the disease.

In recent years a number of academic research groups have provided evidence for the presence of genes important in the regulation of asthmatic and allergic responses on human chromosome 5. In particular, evidence for the presence of susceptibility genes for BHR and elevated serum IgE levels on chromosome 5 in subregion 5q31-5q33 [Meyers et al., *Genomics* 23: 464-470; Postma et al., *N. Eng. J. Med.* 333:894-900; and Bleecker et al., *Clin. Exp. Allergy* 25:84-88] was obtained from genetic linkage analysis of 92 Dutch asthma families. Strong evidence for genetic linkage between marker D5S436, total serum IgE levels [Meyers et al., *Genomics* 23: 464-470; Postma et al., *N. Eng. J. Med.* 333:894-900; and Bleecker et al., *Clin. Exp. Allergy* 25:84-88] and BHR [Postma et al., *N. Eng. J. Med.* 333:894-900; and Bleecker et al., *Clin. Exp. Allergy* 25:84-88] was found in the Dutch families.

No asthma susceptibility gene has yet been identified, so there is a need in the art for the identification of such genes. Identification of asthma susceptibility genes would provide a fundamental understanding of the disease process from which a number of clinically important applications would arise. Susceptibility genes identified may lead to the development of therapeutics (small molecule drugs, antisense molecules, antibody molecules) directly targeted to the gene or protein product of the gene, or may target the biochemical pathway of which the protein product is a part at an upstream or downstream location if the development of such drugs is easier than directly targeting the gene or its protein product.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

3

Polynucleotide sequences comprising the gene, sequence variants thereof and protein products thereof may be used to develop a clinical diagnostic test for asthma and for the identification of individuals at high risk for the development of asthma. The results of such tests may also have prognostic value and may be used to predict patients who respond to and those who do not respond to drug therapy. Finally, information about the DNA sequences of asthma susceptibility genes and the amino acid sequences encoded by these genes facilitates large scale production of proteins by recombinant techniques and identification of the tissues/cells naturally producing the proteins. Such sequence information also permits the preparation of antibody substances or other novel binding molecules specifically reactive with the proteins encoded by the susceptibility genes that may be used in modulating the natural ligand/antiligand binding reactions in which the proteins may be involved and for diagnostic purposes.

Terms used herein have the following meanings:

"Isolated" refers to material removed from its original environment.

"Hybridization" or "hybridizes" refers to any process by which a strand of a polynucleotide binds with a complementary strand through base pairing.

"Stringent conditions" refer to experimental conditions which allow up to 20% base pair mismatches, typically two 15 minute washes in 0.1 XSSC (1.5mM NaCl, 1.5 mM sodium citrate, pH 7.0) at 65°C.

"Homology" or "homologous" refers to a degree of similarity between nucleotide or amino acid sequences, which may be partial or, when sequences are identical, complete.

"Expression vector" refers to a linear or circular DNA molecule which comprises a segment encoding a polypeptide of interest operably linked to additional segments which provide for its transcription.

"Antisense" refers to selective inhibition of protein synthesis through hybridisation of an oligo- or polynucleotide to its complementary sequence in messenger RNA (mRNA) of the target protein. The antisense concept was first proposed by Zamecnik and Stephenson (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:280-284; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:285-288) and has subsequently found broad application both as an experimental tool and as a means of generating putative therapeutic molecules (Alama, A., Pharmacol. Res. 36:171-178; Dean,

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

4

N.M., *Biochem. Soc. Trans.* 24:623-629; Bennet, C.F., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280:988-1000; Crooke, S.T., *Antisense Research and Applications*, Springer).

It has now been found by genetic linkage analysis and bioinformatics analysis that AAGA, a gene on chromosome 5 comprising a nucleotide sequence encoding a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 8, which nucleotide sequence has 100% homology with mRNA sequences and ESTs corresponding to the protocadherin-42 gene, is associated with bronchial hyperresponsiveness. Protocadherin-42 is a member of the cadherin superfamily. Proteins of this superfamily are involved in cell-cell (intercellular) adhesion, which plays an important role in a wide range of events *in vivo* and is crucial for the maintenance of tissue integrity - see M. Takeichi, *Annu. Rev. Biochem.* (1990), 58, 237-52. AAGA has been found to be expressed at a high level in human bronchial epithelial cells. It has also been found that polymorphisms in AAGA occur more prevalently in asthmatic patients than they do in non-asthmatics.

Accordingly, in one aspect, the present invention provides a method for determining whether a subject has, or is at risk of developing, a disease characterised by bronchial hyperresponsiveness, comprising determining, in a sample of cells from the subject, (i) the level of expression of a polynucleotide (A) comprising the nucleotide sequence SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6 or a sequence which hybridises thereto under stringent conditions, polynucleotide (A) being hereinafter referred to alternatively as the AAGA gene, or the level of expression of a polypeptide (B) comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 8 or a functionally equivalent variant thereof, or the level of bioactivity of said polypeptide (B) and comparing the level of expression of (A) or (B) or the level of bioactivity of (B) with the respective level of expression of (A) or (B) or bioactivity in a healthy subject, or (ii) the presence of a variant of said polynucleotide (A) or said polypeptide (B) associated with bronchial hyperresponsiveness.

The term "variant" as used herein means, in relation to amino acid sequences, an amino acid sequence that is altered by one or more amino acids. The changes may involve amino acid substitution, deletion or insertion. In relation to nucleotide sequences, the term "variant" as used herein means a nucleotide sequence that is altered by one or more nucleotides; the changes may involve nucleotide substitution, deletion or insertion. A preferred functionally equivalent variant of the amino acid sequence SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:8 is one having at least 80%, more preferably at least 90%, and especially more than 95% amino acid sequence

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

5

identity to SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:8. In such preferred functionally equivalent variants, the regions of SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:8 corresponding to the extracellular domain are usually substantially conserved.

By an amino acid sequence having x% identity to a reference sequence such as SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:8, is meant a sequence which is identical to the reference sequence except that it may include up to 100-x amino acid alterations per each 100 amino acids of the reference sequence. For example, in a subject amino acid sequence having at least 80% identity to a reference sequence, up to 20% of the amino acid residues in the reference sequence may be substituted, deleted or inserted with another amino acid residue. Percentage identity between amino acid sequences can be determined conventionally using known computer programs, for example the FASTDB program based on the algorithm of Brutlag et al (Comp.App.Biosci. (1990) 6:237-245).

The level of expression of a polynucleotide (A) as hereinbefore defined or a polypeptide (B) as hereinbefore defined may be determined, for example, by Northern blot analysis, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), in situ hybridization, immunoprecipitation, Western blot hybridization or immunohistochemistry. The level of (A), e.g. as mRNA, or the polypeptide (B), measured by one of the above techniques, in cells from the subject, may be compared with the level of (A) or (B) respectively in a healthy subject. An abnormal level of polynucleotide (A) or polypeptide (B) is likely to be indicative of aberrant AAGA activity associated with bronchial hyperresponsiveness.

The level of a bioactivity of the polypeptide (B) can be measured, for example, by measuring calcium-dependent cell-cell adhesion, for instance by promoting homotypic Ca^{2+} dependent aggregation and adhesion in L-cells, e.g. as described by Sano et al, EMBO J. 12: 2249 - 2256. Comparison of the measured activity in cells from the subject with the activity measured in cells from a healthy subject indicates whether a subject has abnormal AAGA activity associated with bronchial hyperresponsiveness.

A variant of polynucleotide (A) associated with bronchial hyperresponsiveness may be a variant having an alteration which alters the amino acid sequence in the encoded polypeptide or which alters the expression level of the encoded polypeptide, the stability of a transcript or the way in which a transcript is processed. Such alterations may involve at least one of the following: (i) a deletion of one or more nucleotides from polynucleotide (A), (ii) an addition of one or more nucleotides to polynucleotide (A), (iii) a substitution of one or more nucleotides

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

6

of polynucleotide (A), (iv) a gross chromosomal rearrangement of polynucleotide (A), (v) a gross alteration in the level of a messenger RNA transcript of polynucleotide (A), (vi) aberrant modification of polynucleotide (A), such as of the methylation pattern of the genomic DNA, (vii) the presence of a non-wild type splicing pattern of a messenger RNA transcript of polynucleotide (A), (viii) a non-wild type level of polypeptide (B), (ix) allelic loss of polynucleotide (A), and/or (x) inappropriate post-translational modification of polypeptide (B). Various assay techniques may be used to detect alterations in an AAGA gene (polynucleotide (A)). These methods include, but are not limited to, methods involving sequence analysis, Southern blot hybridization, conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE), restriction enzyme site mapping, and methods involving detection of the absence of nucleotide pairing between the nucleic acid to be analyzed and a probe.

Accordingly, in one embodiment, the variant of polynucleotide (A), i.e. genetic abnormality, associated with bronchial hyperresponsiveness in a subject is detected by incubating a DNA sample from the subject with a polynucleotide probe comprising at least 5, e.g. at least 15 contiguous nucleotides of polynucleotide (A) as hereinbefore defined, under conditions where the probe hybridises to complementary polynucleotide sequence, to produce a first reaction product, and comparing the first reaction product with a control reaction product obtained from the probe and DNA from a healthy subject. If there is a difference between the first reaction product and the control reaction product which is correlated with bronchial hyperresponsiveness, e.g. in asthmatics, the difference indicates a predisposition to developing a disease characterised by bronchial hyperresponsiveness. The probe is generally a synthetic oligonucleotide having 15 to 50 nucleotides, and may be labelled, e.g. with a fluorophore or radioactive nucleotide, to provide a detectable signal.

AAGA mutations that are particularly likely to cause or contribute to the development of asthma or other inflammatory or obstructive airways diseases characterised by BHR are those mutations that negatively impact normal (wildtype) functioning of AAGA, in particular the extracellular domain which is involved in homotypic association and therefore cell-cell adhesion and the intracellular domain which interacts with structural proteins or signalling molecules. Examples of such mutations include: i) mutations that affect the level of transcripts produced; ii) missense mutations occurring within the intracellular, transmembrane or extracellular domain; and mutations which affect the way in which the transcript is processed.

Specific diseases or disorders, e.g., genetic diseases or disorders, are associated with specific allelic variants of polymorphic regions of certain genes, which do not necessarily encode a

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

7

mutated protein. Thus, the presence of a specific allelic variant of a polymorphic region of a gene, such as a single nucleotide polymorphism ("SNP"), in a subject can render the subject susceptible to developing a specific disease or disorder. Polymorphic regions in genes, e.g., AAGA genes, can be identified, by determining the nucleotide sequence of genes in populations of individuals. If a polymorphic region, e.g., SNP or a haplotype, i.e. a combination of SNPs, is identified, then the link with a specific disease can be determined by studying specific populations of individuals, e.g, individuals which developed a specific disease, such as asthma. A polymorphic region can be located in any region of a gene, e.g., exons, in coding or non coding regions of exons, introns, and promoter regions.

It has been found that AAGA genes comprise polymorphic regions, specific alleles of which are associated with bronchial hyperresponsiveness, particularly in asthmatic patients. Thus, determining the presence of a variant of a polynucleotide (A) as hereinbefore defined may comprise determining the identity of an allele or allelic variant of a polymorphism of a polynucleotide (A) in a subject, thereby to determine whether the subject has a specific allelic variant of a polymorphism which is associated with bronchial hyperresponsiveness.

Numerous SNPs in SEQ ID NO: 1 identified in DNA samples from asthmatic patients are shown in Example 3. Of these, the polymorphisms at positions 6377 (a change from C to T) and 7390 (a change from G to C) of SEQ ID NO: 1 have been shown to be associated with bronchial hyperresponsiveness. Accordingly, in a preferred embodiment, determining the presence of a variant of polynucleotide (A) as hereinbefore described comprises determining, in a sample of cells from the subject, the identity of the base at one or both of the positions corresponding to positions 6377 and 7390 in SEQ ID NO: 1. The presence of T at the position corresponding to said position 6377 and/or C at the position corresponding to said position 7390 indicates a variant of polynucleotide (A) associated with bronchial hyperresponsiveness. When it is desired to determine the presence of a haplotype, i.e. a combination of SNPs, the identity of the base at positions corresponding to both positions 6377 and 7390 may be determined, or the identity of the base at one or both of these positions and the identity of the base at one or more of the positions corresponding to positions 589, 1001, 1060, 2033, 2193, 2561, 5667, 5804 and 7531 in SEQ ID NO: 1 and positions 1212, 1216, 1964 and 2330 in SEQ ID NO: 2 may be determined. In a specifically preferred embodiment, a nucleic acid comprising SEQ ID NO: 1, or a portion thereof comprising nucleotide 6377 and/or nucleotide 7390, is isolated from the cell sample and sequenced.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

8

In an exemplary embodiment, DNA of a sample cell from a subject is rendered accessible for hybridization and is contacted with a nucleic acid probe including a region of nucleotide sequence which is capable of hybridizing to a sense or antisense sequence of an AAGA gene (polynucleotide (A)) or naturally occurring mutants thereof, e.g. a polymorphic region of the gene such as a region including position 6377 and/or position 7390 of SEQ ID NO: 1, or 5' or 3' flanking sequences naturally associated with AAGA genes or naturally occurring mutants thereof and hybridization of the probe to the sample DNA is detected. Such techniques can be used to detect alterations or allelic variants at either the genomic or mRNA level, including deletions, substitutions, etc., as well as to determine mRNA transcript levels.

Another method of identifying an allele or allelic variant of a polymorphic region is allele specific hybridization using probes overlapping the mutation or polymorphic site and having about from 5 to 30, e.g. 5, 10, 20, 25, or 30 nucleotides. In a preferred embodiment, several probes capable of hybridizing specifically to allelic variants, such as single nucleotide polymorphisms, are attached to a solid phase support, e.g., a "chip". Oligonucleotides can be bound to a solid support by a variety of processes, including lithography. For example a chip can hold up to about 250,000 oligonucleotides. Mutation detection analysis using these chips comprising oligonucleotides, also termed "DNA probe arrays" is described e.g., in Cronin et al. (1996) Human Mutation 7:244. In one embodiment, a chip comprises all the allelic variants of at least one polymorphic region of a gene. The solid phase support is then contacted with a test nucleic acid and hybridization to the specific probes is detected. Accordingly, the identity of numerous allelic variants of one or more genes in a DNA sample from a patient can be identified in a simple hybridization experiment.

Accordingly, the invention in another aspect provides an allele-specific oligonucleotide probe capable of detecting a polymorphism in polynucleotide (A) as hereinbefore described at one or more of positions 6377 and 7390 of SEQ ID NO: 1. The allele-specific probe generally has about 15-50 nucleotides, more usually about 15-30 nucleotides, and overlaps said position 6377 or 7390. Conveniently a central position of the probe aligns with said position 6377 or 7390. The nucleotide sequence of such a probe is generally 100% complementary to the corresponding sequence in the polymorphic region of the polynucleotide (A). The probe may be labelled, e.g. conventionally, e.g. with a fluorophore or radioactive label, to provide a detectable signal.

In certain embodiments, detection of the alteration comprises utilizing the probe/primer in a polymerase chain reaction (PCR) (see, e.g. U.S. Pat. Nos. 4,683,195 and 4,683,202), such as

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

9

anchor PCR or RACE PCR, or, alternatively, in a ligase chain reaction (LCR) (see, e.g., Landegran et al. (1988) *Science* 241:1077-1080; and Nakazawa et al. (1994) *PNAS* 91:360-364), the latter of which can be particularly useful for detecting point mutations in the AAGA gene (see Abravaya et al. (1995) *Nuc Acid Res* 23:675-682). In a merely illustrative embodiment, the method includes the steps of (i) collecting a sample of cells from a patient, (ii) isolating nucleic acid (e.g., genomic, mRNA or both) from the cells of the sample, (iii) contacting the nucleic acid sample with one or more primers which specifically hybridize to an AAGA gene under conditions such that hybridization and amplification of the AAGA gene (if present) occurs, and (iv) detecting the presence or absence of an amplification product, or detecting the size of the amplification product and comparing the length to a control sample. It is anticipated that PCR, LCR or any other amplification procedure (e.g. scf sustained sequence replication (Guatelli, J. C. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), transcriptional amplification system (Kwoh, D. Y. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), or Q-Beta Replicase (Lizardi, P. M. et al., 1988, *Bio/Technology* 6:1197)), may be used as a preliminary step to increase the amount of sample on which can be performed any of the techniques for detecting mutations described herein.

A preferred method of determining the presence of a variant of a polynucleotide (A) as hereinbefore defined, where the variant comprises a single nucleotide polymorphism, comprises determining the allelic variant by sequencing a DNA sample from the subject. In another method of identifying an allelic variant of a polymorphism, DNA fragments from a cell sample are amplified by PCR in the presence of an allele-specific primer capable of detecting a polymorphism in polynucleotide (A), particularly at one or more of positions 6377 and 7390 of SEQ ID NO 1. Numerous SNPs identified in DNA samples from asthmatic patients are shown in Example 2. Of these, the polymorphisms at positions 6377 and 7390 in SEQ ID NO: 1 have been shown in certain populations to be associated with bronchial hyperresponsiveness.

The invention also provides an allele-specific primer, for example for use in polymorphism-detecting procedures including an amplification step, capable of detecting a polymorphism in polynucleotide (A) as hereinbefore defined at one or more of positions 6377 and 7390 in SEQ ID NO: 1. This primer generally has about 15 to 50 nucleotides, more usually about 15-30 nucleotides. The nucleotide sequence of the primer corresponds with that of the allele to be detected, although a partially corresponding sequence with about 5 to 10 of the nucleotides at the 3' end of the primer corresponding with those of the allele to be detected may be used.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

10

The primer may be labelled, e.g. with a fluorophore or radioactive label, to assist detection thereof.

The invention further provides a diagnostic or prognostic kit comprising an allele-specific oligonucleotide probe as hereinbefore described or an allele-specific primer as hereinbefore described, optionally together with other reagents such as labelling reagents (to incorporate a detectable label into a hybridised product), buffers and DNA polymerases such as Taq polymerase.

Accordingly, in another aspect the invention provides an isolated polynucleotide which is a variant of polynucleotide (A) as hereinbefore defined associated with bronchial hyperresponsiveness, particularly a variant of polynucleotide (A) having a specific allelic variant of a single nucleotide polymorphism associated with bronchial hyperresponsiveness, such as a single nucleotide polymorphism at position 6377 and/or position 7390 of SEQ ID No: 1, especially T at said position 6377 and/or C at said position 7390. Correspondingly, in a further aspect the invention provides an isolated mutant polypeptide associated with bronchial hyperresponsiveness which is encoded by the polynucleotide variant of polynucleotide (A) associated with bronchial hyperresponsiveness as hereinbefore described, or an isolated polypeptide which is a variant of polypeptide (B) as hereinbefore defined associated with bronchial hyperresponsiveness.

Information obtained using the diagnostic assays described herein (alone or in conjunction with information on another genetic defect, which contributes to the same disease) is useful for prognosing, diagnosing or confirming that a symptomatic subject has a genetic defect (e.g. in an AAGA gene or in a gene that regulates the expression of an AAGA gene), which causes or contributes to the particular disease or disorder. Alternatively, the information (alone or in conjunction with information on another genetic defect, which contributes to the same disease) can be used prognostically for predicting whether a non-symptomatic subject is likely to develop a disease or condition, which is caused by or contributed to by an abnormal AAGA activity or protein level in a subject. In particular, the assays permit one to ascertain an individual's predilection to develop bronchial hyperresponsiveness associated with a mutation in or associated with AAGA, where the mutation is a polymorphism such as a single nucleotide polymorphism (SNP). Based on the prognostic information, a doctor can recommend a regimen e.g. a therapeutic protocol useful for preventing or delaying onset of asthma in the individual.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

11

Knowledge of the particular alteration or alterations, resulting in defective or deficient AAGA genes or proteins in an individual (the AAGA genetic profile), alone or in conjunction with information on other genetic defects contributing to the same disease (the genetic profile of the particular disease) allows a customization of the therapy for a particular disease to the individual's genetic profile, the goal of "pharmacogenomics". For example, subjects having a specific allele of an AAGA gene may or may not exhibit symptoms of a particular disease or be predisposed to developing symptoms of a particular disease. Further, if those subjects are symptomatic, they may or may not respond to a certain drug, e.g., a specific AAGA therapeutic, but may respond to another. Thus, generation of an AAGA genetic profile, (e.g., categorization of alterations in AAGA genes which are associated with the development of asthma), from a population of subjects, who are symptomatic for a disease or condition that is caused by or contributed to by a defective and/or deficient AAGA gene and/or protein (an AAGA genetic population profile) and comparison of an individual's AAGA profile to the population profile, permits the selection or design of drugs that are expected to be safe and efficacious for a particular patient or patient population (i.e., a group of patients having the same genetic alteration).

Accordingly, in another aspect, the invention provides a method for pharmacogenomically selecting a therapy to administer to an individual having asthma, comprising determining an AAGA genetic profile of an individual and comparing the individual's AAGA genetic profile to an AAGA genetic population profile, thereby to select a therapy for administration to the individual.

For example, an AAGA population profile can be performed by determining the AAGA profile, e.g., the identity of AAGA genes, in a patient population having a disease which is caused by or contributed to by a defective or deficient AAGA gene. Optionally, the AAGA population profile can further include information relating to the response of the population to an AAGA therapeutic, using any of a variety of methods, including, monitoring: 1) the severity of symptoms associated with the AAGA related disease, 2) AAGA gene expression level, 3) AAGA mRNA level, and/or 4) AAGA protein level. and (iii) dividing or categorizing the population based on the particular genetic alteration or alterations present in its AAGA gene or an AAGA pathway gene. The AAGA genetic population profile can also, optionally, indicate those particular alterations in which the patient was either responsive or non-responsive to a particular therapeutic. This information or population profile is then useful for predicting which individuals should respond to particular drugs, based on their individual AAGA profile.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

12

In a preferred embodiment, the AAGA profile is a transcriptional or expression level profile and step (i) is comprised of determining the expression level of AAGA proteins, alone or in conjunction with the expression level of other genes, known to contribute to the same disease. The AAGA profile can be measured in many patients at various stages of the disease.

Pharmacogenomic studies can also be performed using transgenic animals. For example, transgenic mice which contain a specific allelic variant of an AAGA gene can be created, e.g., by replacing their wild-type AAGA gene with an allele of the human AAGA gene. The response of these mice to specific AAGA therapeutics can then be determined.

The treatment of an individual with an AAGA therapeutic can be monitored by determining AAGA characteristics, such as AAGA protein level or activity, AAGA mRNA level, and/or AAGA transcriptional level. These measurements will indicate whether the treatment is effective or whether it should be adjusted or optimized. Thus, AAGA can be used as a marker for the efficacy of a drug during clinical trials.

In a preferred embodiment, the present invention provides a method for monitoring the effectiveness of treatment of a subject with a pharmaceutical (e.g., an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate identified by the screening assays described herein) comprising the steps of determining the level of expression of a polynucleotide (A), e.g. as mRNA or genomic DNA, or a polypeptide (B), or the level of an activity of said polynucleotide (A) or polypeptide (B) in a preadministration DNA sample from the subject and in a post-administration DNA sample from the subject, comparing the respective level of expression or activity in the pre-administration sample and the post administration sample and, if required, altering the administration of the pharmaceutical to the subject accordingly. For example, increased administration of the agent may be desirable to increase the expression or activity of AAGA to higher levels than detected, i.e., to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent may be desirable to decrease expression or activity of AAGA to lower levels than detected, i.e., to decrease the effectiveness of the agent.

Cells of a subject may also be obtained before and after administration of an AAGA therapeutic to detect the level of expression of genes other than AAGA, to verify that the AAGA therapeutic does not cause a deleterious increase or decrease in the expression of such genes. This can be done, e.g., by using the method of transcriptional profiling. Thus, mRNA

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

13

from cells exposed in vivo to an AAGA therapeutic and mRNA from the same type of cells that were not exposed to the AAGA therapeutic could be reverse transcribed and hybridized to a chip containing DNA from numerous genes, to compare thereby the expression of genes in cells treated and not treated with an AAGA-therapeutic. If, for example an AAGA therapeutic turns on the expression of a proto-oncogene in an individual, use of this particular AAGA therapeutic may be undesirable.

An individual's AAGA genetic profile or the genetic profile of asthma can enable: 1) more effective prescription of a drug that will address the molecular basis of asthma; and 2) better determination of the appropriate dosage of a particular drug. The ability to target populations expected to show the highest clinical benefit, based on the AAGA or asthma genetic profile, can enable: 1) the repositioning of marketed drugs with disappointing market results; 2) the rescue of drug candidates whose clinical development has been discontinued as a result of safety or efficacy limitations, which are patient subgroup-specific; and 3) an accelerated and less costly development for drug candidates and more optimal drug labeling (e.g. since the use of AAGA as a marker is useful for optimizing effective dose).

In another aspect, the invention provides a method of treating a disease characterised by bronchial hyperresponsiveness which comprises administering to a subject in need thereof an effective amount of a polynucleotide (A) as hereinbefore described, or a polypeptide (B) as hereinbefore described, or an antibody (C) which is immunoreactive with said polypeptide (B) or a variant thereof associated with the disease, or an antisense oligonucleotide (D) comprising a nucleotide sequence complementary to that of said polynucleotide (A) or a variant thereof associated with the disease.

The polynucleotide (A) may be cDNA comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:6, a genomic DNA comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 or a DNA comprising a nucleotide sequence which hybridises to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:6 under stringent conditions.

In another aspect of the invention, the polynucleotide (A) comprises a portion having at least 20, e.g. at least 50, e.g. at least 100, e.g. at least 200, contiguous bases from SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:6. In a further aspect, the polynucleotide (A) comprises a nucleotide sequence encoding at least 10,

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

14

e.g. at least 50, e.g. at least 100, e.g. at least 200, contiguous amino acids from SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:8.

The polynucleotide (A) may be isolated by bioinformatics analysis of DNA sequences from the subregion 5q31-5q33 on chromosome 5 determined by sequencing of yeast artificial chromosomes (YACs), bacterial artificial chromosomes (BACs) and/or P1 artificial chromosomes (PACs) to identify genes within that subregion, searching for a sequence having greater than 95% identity to the predicted exon for a selected gene and isolating cDNA from a human lung cDNA library by PCR using primers designed using that sequence.

The polynucleotide (A), for example having the sequence SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:6, may be prepared from the nucleotides which it comprises by chemical synthesis, e.g. automated solid phase synthesis using known procedures and apparatus.

In another aspect of the invention, the polypeptide (B) comprises a portion having at least 10, e.g. at least 50, e.g. at least 100, e.g. at least 200 contiguous amino acids from SEQ ID NO:7, or SEQ ID NO:8.

The polypeptide (B) or mutant polypeptide as hereinbefore described may be produced by cloning a polynucleotide sequence or variant thereof as hereinbefore described into an expression vector containing a promoter and other appropriate regulating elements for transcription, transferring into prokaryotic or eukaryotic host cells such as bacterial, plant, insect, yeast, animal or human cells, and culturing the host cells containing the recombinant expression vector under suitable conditions. Techniques for such recombinant expression of polypeptides are well known and are described, for example, in J.Sambrook et al, Molecular Cloning, second edition, Cold Spring Harbor Press, 1990.

The polypeptide (B) or mutant polypeptide as hereinbefore described may be expressed as a recombinant fusion protein with one or more heterologous polypeptides, for example to facilitate purification. For example, it may be expressed as a recombinant fusion protein with a heterologous polypeptide such as a polyhistidine containing a cleavage site located between the polynucleotide sequence of the invention and the heterologous polypeptide sequence, so that the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:8, or variant thereof associated with bronchial hyperresponsiveness, may be cleaved and purified away from the heterologous moiety using well known techniques.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

15

The polypeptide (B) or mutant polypeptide as hereinbefore described may also be synthesised, in whole or in part, from the amino acids which it comprises using well known chemical methods, for example automated solid phase techniques.

The polypeptide (B) or mutant polypeptide as hereinbefore described may be purified by well known standard procedures.

The antibody (C) may be a polyclonal or monoclonal antibody. Such antibodies may be prepared using conventional procedures. Methods for the production of polyclonal antibodies against purified antigen are well established (cf. Cooper and Paterson in Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. Eds., John Wiley and Sons Inc., Chapter 11). Typically, a host animal, such as a rabbit, or a mouse, is immunised with a purified polypeptide of the invention, or immunogenic portion thereof, as antigen and, following an appropriate time interval, the host serum is collected and tested for antibodies specific against the polypeptide. Methods for the production of monoclonal antibodies against purified antigen are well established (cf. Chapter 11, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. Eds., John Wiley and Sons Inc.). For the production of a polyclonal antibody, the serum can be treated with saturated ammonium sulphate or DEAE Sephadex. For the production of a monoclonal antibody, the spleen or lymphocytes of the immunised animal are removed and immortalised or used to produce hybridomas by known methods. Antibodies secreted by the immortalised cells are screened to determine the clones which secrete antibodies of the desired specificity, for example using Western blot analysis. Humanised antibodies can be prepared by conventional procedures.

The antisense oligonucleotide (D) comprises a nucleotide sequence complementary to that of the mRNA of AAGA, in particular a nucleotide sequence complementary to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:6, or complementary to that of a polynucleotide encoding a variant of a polypeptide (B) having a polymorphism correlated with the disease, e.g. asthma, in particular a nucleotide sequence complementary to such a polymorphic variant of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:6. The antisense oligonucleotide may be DNA, an analogue of DNA such as a phosphorothioate or methylphosphonate analogue of DNA, RNA, an analogue of RNA, or a peptide nucleic acid (PNA). The antisense oligonucleotides may be synthesised by conventional methods, for example using automated solid phase techniques.

The role of the polypeptide (B) in asthma and other obstructive or inflammatory airways diseases characterised by bronchial hyperresponsiveness can be determined using conventional allergen driven animal models for bronchial hyperresponsiveness, e.g. the ovalbumin-induced BHR mouse model (Tsuyuki et al, J. Clin. Invest. 96:2924-2931) or the guinea pig model hereinafter described.

Polynucleotides, polypeptides, antibodies, or antisense oligonucleotides as hereinbefore described, hereinafter alternatively referred to collectively as agents of the invention, may be used in the treatment (prophylactic or symptomatic) of inflammatory or obstructive airways diseases. For example, a polypeptide (B) may be used to treat a mammal, particularly a human, deficient in or otherwise in need of that polypeptide; a polynucleotide (A) may be used in gene therapy where it is desired to increase AAGA activity, for instance where a subject has a mutated or missing AAGA gene; an antisense oligonucleotide (D) may be used to inhibit AAGA activity or activity of variants of the AAGA gene having a polymorphism correlated with a disease, e.g. asthma, where this is desired; and an antibody (C) may be used to inhibit ligand/antiligand binding activities of AAGA polypeptides.

"Gene therapy" refers to an approach to the treatment of human disease based upon the transfer of genetic material into somatic cells of an individual. Gene transfer can be achieved directly in vivo by administration of gene-bearing viral or non-viral vectors into blood or tissues, or indirectly ex vivo through the introduction of genetic material into cells manipulated in the laboratory followed by delivery of the gene-containing cells back to the individual. By altering the genetic material within a cell, gene therapy may correct underlying disease pathophysiology. Suitable vectors, and procedures, for gene delivery to specific tissues and organ systems in animals are described in Dracopoli, N.C. et al., Current Protocols in Human Genetics, John Wiley and Sons Inc., Chapters 12 and 13 respectively. In relation to a polynucleotide (A) as hereinbefore described, gene therapy may involve delivery of a viral or non-viral gene therapy vector containing an expression cassette of the AAGA gene under suitable control elements to the lungs of diseased individuals (eg. asthmatics) so that the underlying disease pathophysiology is corrected or ameliorated.

The effectiveness of an agent of the invention in inhibiting or reversing airways hyperreactivity may be demonstrated in a guinea pig test model. The acute injection of pre-formed immune complex renders guinea pigs hyperreactive to histamine. Doses of histamine which cause only a small degree of bronchoconstriction prior to administration of immune complex cause a

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

17

much stronger effect thereafter. Guinea-pigs (Dunkin-Hartley, male, 400-600g) are anaesthetised with phenobarbital (100 mg/kg i.p.) and pentobarbital (30 mg/kg i.p.) and paralysed with gallamine (10 mg/kg i.m.) and ventilated with a mixture of air and oxygen (45:55), v/v. Animals are ventilated (8 ml/kg, 1Hz) via a tracheal cannula. Ventilation is monitored by a flow transducer. When making measurements of flow, coincident pressure changes in the thorax are monitored directly via an intrathoracic trochar, permitting display of differential pressure relative to the trachea. From this information resistance and compliance are calculated at each inspiration. An allergic reaction is initiated by intravenous injection of preformed immune complexes (prepared by adding 30 µg of bovine gamma globulin in 0.05 ml of saline to 0.05 ml of guinea pig anti-bovine gamma globulin anti-serum) 3 times at 10 minute intervals. Intravenous injections of histamine (1.0-3.2 µg/kg at 10 minute intervals) are used to define the sensitivity of the airways prior to and following the last exposure to the immune complex. Airways hyperreactivity is expressed as the paired difference for the maximal value of lung resistance in response to histamine before and after repeated injection of immune-complex. The agents of the invention are administered intratracheally either as solutions or suspensions in tragacanth. The ED₅₀ values for reversal of airways hyperreactivity are determined graphically from the dose response curves and represent those doses which cause a 50% reduction of airways hyperreactivity.

Diseases characterised by bronchial hyperresponsiveness to which the present invention is applicable include inflammatory or obstructive airways diseases, particularly asthma of whatever type or genesis including both intrinsic (non-allergic) asthma and extrinsic (allergic) asthma, mild asthma, moderate asthma, severe asthma, bronchitic asthma, exercise-induced asthma, occupational asthma and asthma induced following bacterial infection. Treatment of asthma is also to be understood as embracing treatment of subjects, e.g. of less than 4 or 5 years of age, exhibiting wheezing symptoms and diagnosed or diagnosable as "wheezy infants", an established patient category of major medical concern and now often identified as incipient or early-phase asthmatics. (For convenience this particular asthmatic condition is referred to as "wheezy-infant syndrome".)

Prophylactic efficacy in the treatment of asthma will be evidenced by reduced frequency or severity of symptomatic attack, e.g. of acute asthmatic or bronchoconstrictor attack, improvement in lung function or reduced airways hyperreactivity. It may further be evidenced by reduced requirement for other, symptomatic therapy, i.e. therapy for or intended to restrict or abort symptomatic attack when it occurs, for example anti-inflammatory (e.g. corticosteroid) or bronchodilatory. Prophylactic benefit in asthma may in particular be

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

18

apparent in subjects prone to "morning dipping". "Morning dipping" is a recognised asthmatic syndrome, common to a substantial percentage of asthmatics and characterised by asthma attack, e.g. between the hours of about 4 to 6 am, i.e. at a time normally substantially distant from any previously administered symptomatic asthma therapy.

Other inflammatory or obstructive airways diseases and conditions to which the present invention is applicable include adult respiratory distress syndrome (ARDS), chronic obstructive pulmonary, airways or lung disease (COPD, COAD or COLD), including chronic bronchitis or dyspnea associated therewith, emphysema, as well as exacerbation of airways hyperreactivity consequent to other drug therapy, in particular other inhaled drug therapy. The invention is also applicable to the treatment of bronchitis of whatever type or genesis including, e.g., acute, arachidic, catarrhal, croupus, chronic or phthinoid bronchitis. Further inflammatory or obstructive airways diseases to which the present invention is applicable include pneumoconiosis (an inflammatory, commonly occupational, disease of the lungs, frequently accompanied by airways obstruction, whether chronic or acute, and occasioned by repeated inhalation of dusts) of whatever type or genesis, including, for example, aluminosis, anthracosis, asbestosis, chalicosis, ptilosis, siderosis, silicosis, tabacosis and byssinosis.

Having regard to their anti-inflammatory activity, in particular in relation to inhibition of eosinophil activation, agents of the invention are also useful in the treatment of eosinophil related disorders, e.g. eosinophilia, in particular eosinophil related disorders of the airways (e.g. involving morbid eosinophilic infiltration of pulmonary tissues) including hypereosinophilia as it affects the airways and/or lungs as well as, for example, eosinophil-related disorders of the airways consequential or concomitant to Löffler's syndrome, eosinophilic pneumonia, parasitic (in particular metazoan) infestation (including tropical eosinophilia), bronchopulmonary aspergillosis, polyarteritis nodosa (including Churg-Strauss syndrome), eosinophilic granuloma and eosinophil-related disorders affecting the airways occasioned by drug-reaction.

The agents of the invention may be administered by any appropriate route, e.g. orally, for example in the form of a tablet or capsule; parenterally, for example intravenously; topically, e.g. in an ointment or cream; transdermally, e.g. in a patch; by inhalation; or intranasally.

Pharmaceutical compositions containing agents of the invention may be prepared using conventional diluents or excipients and techniques known in the galenic art. Thus oral dosage

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

19

forms may include tablets and capsules, and compositions for inhalation may comprise aerosol or other atomizable formulations or dry powder formulations.

The invention includes (A) an agent of the invention in inhalable form, e.g. in an aerosol or other atomizable composition or in inhalable particulate, e.g. micronised form, (B) an inhalable medicament comprising an agent of the invention in inhalable form; (C) a pharmaceutical product comprising such an agent of the invention in inhalable form in association with an inhalation device; and (D) an inhalation device containing an agent of the invention in inhalable form.

Dosages of agents of the invention employed in practising the present invention will of course vary depending, for example, on the particular condition to be treated, the effect desired and the mode of administration. In general, suitable daily dosages for administration by inhalation are of the order of 1µg to 10 mg/kg while for oral administration suitable daily doses are of the order of 0.1mg to 1000 mg/kg.

A polypeptide (B) as hereinbefore described, or a mutant polypeptide as hereinbefore described associated with bronchial hyperresponsiveness, for example a polypeptide encoded by a variant of a polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding a polypeptide comprising amino acid sequence SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:8, which variant contains a sequence polymorphism, can be used to identify enhancers (agonists) or inhibitors (antagonists) of its activity, i.e. to identify compounds useful in the treatment of inflammatory or obstructive airways diseases, particularly asthma. The enhancers or inhibitors may be, for example, peptides, peptidomimetics, nucleic acids, or low molecular weight compounds. Accordingly, the invention also provides a method of identifying a substance which modulates the activity of a polypeptide (B) or a variant thereof associated with bronchial hyperresponsiveness, particularly a substance useful in the treatment of inflammatory or obstructive airways diseases such as asthma, comprising combining a candidate substance with said polypeptide (B) or said variant thereof and measuring the effect of the candidate substance on said activity. The activity of the polypeptide (B) or variant may be measured, for example, by promotion of homotypic Ca^{2+} dependent aggregation and adhesion in L-cells e.g. as described by Sano et al, EMBO J. 12:2249-2256. The invention also includes a method of identifying a substance which binds to a polypeptide (B) or variant thereof as hereinbefore described, particularly a substance useful in the treatment of inflammatory or obstructive airways diseases such as asthma, comprising mixing a candidate substance with said polypeptide (B) or said variant and determining whether binding has occurred.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

20

In another aspect the invention provides a method of identifying a substance which binds to, or modulates an activity of, a mutant polypeptide encoded by a variant of polynucleotide (A) as hereinbefore described, particularly a substance suitable for use in the treatment of an inflammatory or obstructive airways disease such as asthma, which comprises mixing a candidate substance with said mutant polypeptide and (i) determining whether binding has occurred and/or (ii) measuring the effect of the candidate substance on said activity.

The invention is illustrated by the following Examples. Abbreviations used in the Examples have the following meanings:

AEBSF :	4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride
BAC :	bacterial artificial chromosome
BAP :	1,4-bis(acryloyl)piperazine
BHR:	bronchial hyperresponsiveness
BLAST :	basic local alignment search tool
BSA :	bovine serum albumin
CSGE :	conformation sensitive gel electrophoresis
dNTP :	deoxynucleotide triphosphate
DTT :	dithiothreitol
EIA :	enzyme immunoassay
EST :	expressed sequence tag
FAM:	6-carboxy-fluorescein
FCS :	fetal calf serum
HBEC:	human bronchial epithelial cell
LBNL:	Lawrence Berkeley National Laboratory
LOD:	logarithm of odds
MTN :	multiple tissue northern
ORF :	open reading frame
PAC :	P1 artificial chromosome
PCR:	polymerase chain reaction
PBS :	phosphate buffered saline
PEG :	polyethylene glycol
PMSF :	phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS -PAGE :	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNP :	single nucleotide polymorphism

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

21

STS : sequence tagged site
TAMRA: 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
TDT: transmission disequilibrium test
TET: tetrachloro-6-carboxy-fluorescein
TTE : 44mM Tris, 14.5mM taurine, 0.1mM EDTA, pH 9.0

Example 1

Asthmatic and non-asthmatic individuals are selected from a family study on the genetics of asthma in the Netherlands ([Panhuysen et al., Clin. Exp. Allergy 25 (suppl. 2): 35-38]; the Medical Ethics Committee of the University Hospital of Groningen and the University of Maryland approves this study and written informed consents are obtained from all participants). Between 1962 and 1975, patients with asthma are evaluated for diagnosis of asthma and optimization of their treatment in Beatrixoord, Haren, the Netherlands. For inclusion in this study, from this first evaluation patients have to meet three criteria: (1) symptoms consistent with asthma; (2) age \leq 45 years; (3) bronchial hyperresponsiveness to histamine ($PC_{20} \leq 32$ mg/ml using the de Vries 30 seconds inhalation method; [de Vries et al., Int. Arch. Allergy 20:93-101]). Clinical evaluation includes the performance of intracutaneous skin tests with common aeroallergens, pulmonary function testing with a water-seal spirometer (Lode Spirograph, Groningen, the Netherlands), and testing for bronchial hyperresponsiveness with histamine, using the 30 seconds inhalation protocol [de Vries et al., Int. Arch. Allergy 20:93-101]. Blood samples for DNA isolation and total IgE, specific IgE and eosinophil measurements are taken.

From 1990 onwards, these probands are re-studied together with their spouses, a minimum of two children and, if possible, grandchildren. In total, 200 two- and three generation families are studied. At this second evaluation (1990-1998), the measurements taken at the first evaluation (1962-1975) are repeated in the probands, and also performed in the relatives. Reversibility is tested by repeating spirometry 20 minutes after administration of 800 μ g of salbutamol (albuterol). All participants are asked to stop pulmonary medication before the clinical testing if possible: inhaled corticosteroids are stopped for 14 days, inhaled long acting beta-mimetics and oral antihistamines 48 hours, inhaled short acting beta-mimetics and anticholinergics 8 hours. The asthma patients did not have an asthma exacerbation or require a course of oral prednisone in the 6 weeks prior to the study.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

22

This evaluation further includes a modified version of the British Medical Council questionnaire with additional questions on symptoms and therapy of asthma and allergy [Panhuyzen et al., Clin. Exp. Allergy 25 (suppl. 2): 35-38]. By definition, a physician's diagnosis of asthma is present in the probands. In the spouses, it is present if the subject reports (1) to be under current regular treatment for asthma, (2) has ever visited a general practitioner or specialist for asthma or (3) has ever used asthma medication. Allergic rhinitis is defined as a positive answer to one of the following questions: Do you have a runny or stuffed nose when you are in the surrounding of (1) animals (e.g. dogs, cats, horses), feathers (e.g. in pillows), or in a dusty part of the house?; or (2) trees, grasses, and flowers. Hay fever is defined as a positive answer to the question: have you ever had hay fever?

Serum total IgE is measured in the first 92 families by solid phase immunoassay [Panhuyzen et al., Clin. Exp. Allergy 25 (suppl. 2): 35-38]. In the second set of 108 families, serum IgE levels are measured by an enzyme linked fluorescent assay (Mini Vidas, Biomerieux Vitex Inc., Marcy, France). Skin testing is performed by an intracutaneous skin test with 16 common aeroallergens, a positive, and negative control. The following allergens are tested: mixed grass pollens, two mixed tree pollens, mixed weeds, house dust mite, storage mite, cat-, dog-, horse-, rabbit/guinea pig dander, feather mix, and five moulds (*Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Botrytis Cimeria*). (ALK-Abelló, Nieuwegein, The Netherlands). A positive skin test is considered to be present if the largest wheal diameter is ≥ 5 mm.

Evidence for linkage of total serum IgE levels [Meyers et al., Genomics 23:464-470], bronchial hyperresponsiveness [Postma et al., New Eng J. Med. 333: 894-900] and asthma [Panhuyzen et al., J. Invest. Med. 43: 281A; Bleeker et al., Am. J. Hum. Genet. 59:A213] to human chromosome 5q has previously been found in the Dutch families using a candidate gene approach. However, as has been found in other complex diseases, the region of linkage is wide (>40 cM spanning the region from the cytokine cluster to the β_2 -adrenoceptor). In order to refine the region of linkage, DNA is extracted from blood DNA samples using standard protocols (Puregene kit, Genra Systems Inc., Minneapolis, MN). A collection of 37 markers consisting of tri- and tetranucleotide repeats spanning the chromosome 5q31-q33 region is used to genotype the DNA samples. Multiplex PCR using fluorescently labelled primers is performed, and the resulting amplified fragments are separated on denaturing polyacrylamide gels. The labelled fragments are detected using the ABI377 sequencing machine and the genotypes scored using GENOTYPER software [Applied Biosystems, USA] using conventional techniques. A modified version of the program Linkage Designer [Van Camp et al., Trends

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

23

Genet. 13:82] is used to bin alleles and to check inheritance. The output from Linkage Designer is then analysed for any inconsistencies using LINKAGE version 5.1 software [Lathrop and Lalouel, in *Handbook of Statistics*, Vol. 8., Rao and Chakraborty (eds), pp. 81-123. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam.] without disease information. As a final check of the data, CRIMAP [Lander and Green, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2363-2367] is used to determine the order and length of the chromosomal map and to detect double recombinants. In linked families, this analysis identifies a region of linkage for BHR with a LOD score in excess of 7.0: The peak LOD score is defined by microsatellite markers D5S2011 and D5S2017.

Example 2

Bacterial artificial chromosome (BAC) clones spanning the chromosomal region between markers D5S2011 and D5S2017 identified using physical map information for human chromosome 5q31-q33 publicly available on the Lawrence Berkley National Laboratory Genome Centre web site (LBNL; www-hgc.lbl.gov/biology/bacmap/2.gif) obtained as BAC clone numbers h164 (22f14), c5 (50g20), h187 (35k5), h167 (8e5) and h177 (32d16) from Research Genetics (Huntsville, Alabama, USA), and a P1 artificial chromosome (PAC) isolated by PCR using primers with SEQ ID NOS: 9 to 12 for the STS markers bac51107T (5' end of BAC 50g20) and bac51330T (3' end of BAC 22f14) available on the LBNL website (www-hgc.lbl.gov/sts.html) by Genome Systems Inc. (St. Louis, Missouri, USA), the BACs and PAC together covering a sub-region of human chromosomal region 5q31-5q33, are sequenced using conventional techniques for an ABI 377 sequence (<http://www.pebio.com/ab/about/dna/377/>). The resulting genomic DNA sequence is analysed using GENSCAN (Burge and Karlin, J. Mol. Biol. 268:78-94) and GENEMARK version 2.4 (Borodovsky and McIninch, Comp. Chem. 17:123-133) gene-finding programs and BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410) homology searches against public protein, EST and DNA databases (SWISSPROT, SWISSPROTPLUS, GenBank, Genbank updates, EMBL, GENEMBLPLUS, GenBank EST, EMBL EST, GenBank STS, EMBL STS), the results of which are parsed into a human chromosome 5-specific version of ACeDb ([A C e g l e g a n s D a t a b a s e ; http://www.sanger.ac.uk/Software/Acedb/](http://www.sanger.ac.uk/Software/Acedb/)) for graphic display. From this graphic display significant regions (i.e. genes) are identified by predicted exons and aligned EST/protein hits. A gene AAGA is initially identified on the graphic display as a GENSCAN-predicted gene covering at least 22.5 kb of genomic DNA and comprising 5 exons ranging in size from 153-2196 bp spread over two islands of DNA sequence separated by a stretch of unsequenced DNA:

GENSCAN-Predicted Exon	Nucleotide Position† In:		Exon Size (bp)
	SEQ ID No.1	SEQ ID No.2	
1	1053 - 1889	-	837
2	5031 - 7226	-	2196
3	12987 - 13206	-	220
4	16002 - 16396	-	395
5	-	1695 - 1847	153

† the coordinates given are for the reverse complement of the original genomic sequence.

The DNA sequences in the GENSCAN-predicted exons encode a protein having homologies to cadherin-type molecules in a range of organisms, including humans, which suggest that it is a member of the cadherin protein family. A homology of 100% is detected with the mRNA sequences and ESTs corresponding to the protocadherin 42 gene (GENBANK accession numbers L11370, L11369 and AA481656). Alignment of the mRNA and EST sequences identifies three splice variants (SEQ ID Nos:4, 5 and 6), two of which have been previously identified (Sano et al., EMBO J. 12:2249-2256), and one (SEQ ID No:6) which is novel. Analysis of SEQ ID Nos:4, 5 and 6 for the longest open reading frame (ORF) using the EditSeq module of Lasergene software (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, USA) reveals ORFs of 3198 nucleotides (SEQ ID No:4, position 377-3574) and 3729 nucleotides (SEQ ID Nos:5 and 6, position 377-4105). It is noted that the ORF for SEQ ID No:4 is 118 nucleotides longer than that previously reported (position 494-3574; Sano et al., EMBO J. 12:2249-2256 and GenBank Accession No. L11370), translating to give a protein (SEQ ID No: 7) 39 amino acids longer than that predicted for GenBank Accession No. L11370 (1065 amino acids versus 1026 amino acids). The ORF for SEQ ID Nos:5 and 6 translates into a 1242 amino acid protein (SEQ ID No:8).

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

25

Using a 441 bp PCR fragment corresponding to exon 2 and generated from human genomic DNA using primers having SEQ ID NOS: 13 and 14, a northern blot of mRNA from a number of human tissues (human 12-lane MTN blot; Clontech Laboratories UK Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) is probed to examine the expression pattern of AAGA. Bands corresponding to the splice variants are detected in brain, heart, skeletal muscle, colon, kidney, liver, small intestine, pancreas and lung. No hybridisation is detected for thymus, spleen and peripheral blood lymphocytes. PCR analysis of first-strand cDNAs derived from various cell lines using primers having SEQ ID NOS: 13 and 14 shows that AAGA is expressed at a high level in activated and unactivated human bronchial epithelial cells (HBECS), at a medium level in fibroblasts, and at a low level in neutrophils and macrophages.

Example 3

In this example conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE; Ganguly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10325-10329; Ganguly and Williams, Hum. Mut. 9:339-343) is used to detect potential sequence changes in PCR-amplified DNA fragments from blood DNA isolated from asthmatic patients. Single base mismatches in DNA heteroduplexes are detected by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of mildly denaturing solvents which amplify the tendency of mismatches to produce conformational changes and result in differential migration of homo-duplexes and heteroduplexes. To generate heteroduplexes, amplified PCR products are thermally denatured, annealed, then analysed by polyacrylamide gel electrophoresis. DNA fragments are visualised by ethidium bromide staining. DNA fragments showing differential electrophoretic migration patterns are then sequenced to confirm the presence of a change to the polynucleotide sequence and the exact nature of this change.

SEQ ID NOS:4, 5 and 6 are manually aligned with SEQ ID NOS: 1 and 2 using the EditSeq module of Lasergene software (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, USA). This analysis indicates that a 470 bp segment of DNA sequence at the 5'-end of SEQ ID Nos:4, 5 and 6 does not align with SEQ ID No:1 or 2. A BLAST search of the GENBANK database is undertaken using this 470 bp of mRNA sequence to identify the missing genomic sequence. This identifies a genomic DNA sequence of 2717 bp (SEQ ID NO:3) in GENBANK accession No. ACO13643 (154594 bp working draft sequence of 13 unordered pieces from human clone RP11-16P20). The alignment analysis reveals that the three alternative transcripts are derived from 7 exons spanning at least 21 kb of genomic DNA :

SPLICE VARIANT 1

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

26

Exon	SEQ ID No.4	Nucleotide Position in SEQ ID No.3†	Nucleotide Position in SEQ ID No.1†	Exon Size (bp)
1	1 - 456	2115 - 2570	-	456
*	457 - 470	-	-	14
2	471 - 1052	-	1030 - 1611	582
3	1053 - 1298	-	1648 - 1893	246
4	1299 - 4069	-	5035 - 7805	2771

SPLICE VARIANT 2

Exon	SEQ ID No.5	Nucleotide Position in SEQ ID No.3†	Nucleotide Position in SEQ ID No.1†	Exon Size (bp)
1	1 - 456	2115 - 2570	-	456
*	457 - 470	-	-	14
2	471 - 1052	-	1030 - 1611	582
3	1053 - 1298	-	1648 - 1893	246
4	1299 - 3490	-	5035 - 7226	2192
5	3491 - 3710	-	12987 - 13206	220
6	3711 - 4648	-	16002 - 16950	949

SPLICE VARIANT 3

Exon	SEQ ID NO:6	Nucleotide Position in SEQ ID No.3†	Nucleotide Position in SEQ ID No.1†	Nucleotide Position in SEQ ID No.2†	Exon Size (bp)
1	1 - 456	2115 - 2570	-	-	456
*	457 - 470	-	-	-	14
2	471 - 1052	-	1030 - 1611	-	582
3	1053 - 1298	-	1648 - 1893	-	246
4	1299 - 3490	-	5035 - 7226	-	2192
5	3491 - 3710	-	12987 - 13206	-	220
6	3711 - 4591	-	16002 - 16896	-	895
7	4592 - 4684	-	-	797 - 889	93

* mRNA sequence does not align with genomic sequence available

† the coordinates given are for the reverse complement of the original genomic sequence.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

27

PCR primer sets corresponding to AAGA gene sequence are designed using SEQ ID NOs:1 and 2 and Primer Express™ (version 1.0; Perkin Elmer, P/N 604313). These primer sets (SEQ ID NOs: 15-94) are:

PRIMER SET	FORWARD	REVERSE
1	GTACACTACCCGAGTGGCGTG	CCTCTTACTGGCTCCTCCAGC
2	AGCTGGCCCATACTCACC	CGTGCACCTGGCTCTCTCTCC
3	TCCCGCCCATGGAACA	GACITGGCATCTCAGAACAAGAG
4	CTCCCCACATGCAATGGTAGG	GCATGCTCTGGGGCATGT
5	TCCTCTTTTTCGACAAATCAACC	AAGGACAGGCCAGGGCAG
6	TTCTGGCAGTTTTCCCTAAG	GAGCTATTGGGCTGCAGGT
7	TCAAGCACGGTGACACGC	GCCOCCGGCTGTAGA
8	TGGGACCAGCATCACGG	CAGCCGACTATGGTTTCCAG
9	GATGCAGGGATCACCAGGG	CTTGACGCTTCCATGATTCTG
10	CTTGACACCAATGACAAGGCC	TCAGAGGTTCCCGCAGCTT
11	TAGTGAGACCCCTTCTCCCA	CTTTGTCAGGAAGAGGCAAAATG
12	AGGTGAGCTGAGTTGGAAACAAG	CCAAGCTGCCTACTGCCTG
13	ATACATGCCCTCCTCCCTAGG	CACCTTGGCTTGAGGACCCA
14	CAGCCCCAGCTCCTTCC	TGGGCCGGTTTCTCAT
15	GGGGTACAATGGGCAGGTCT	AGTCTACTCCAACCTAGGTCTCTATGTCA
16	TGGGACCCAGCCCGAG	GCACACGGATTAGGCTGAGTG
17	CCTACCACCCCAACCCA	GAGCAGTACTCCGACTACAGCTACC
18	TGGCCCAACACCG	TCCCGCATCCACCTG
19	AATGTGTTTGCAGGTGGCAG	GGAGGCCAAAAGTGGTTACCA
20	TCATCCTCGTCTCCACTGG	GGCACAGCCTTGGTCCATC
21	TTGCCACGCTGCTTGGAG	GTCTTGGTGAGACGGTCAGCC
22	GTGGCGCGCTCAATCT	CAACGGTGACTTTGTTATCCAGAA
23	AAGCTGAGCGAGGTGGGA	GAGAGCTATGAGTTGAAGGTGGTG
24	CTGGCATGTTCTCCATCACTGAG	ACAACGCACCTGTCTTCACTCAG
25	AGATGGTGAAGAGGCCCTTAGC	GCAGGTGATGTGCCCTTCC
26	GGAGTTAGTGTGGAGAGTGGG	CAAGAGTCCCGTGGCC
27	GTCTCCTGCCACATCCTCTG	CCCTGATCTAAACCATGCTGTCTC
28	CTGTCCAGTCGAAGAAGACGC	TGTCCCATGCCAATAGTTGCC
29	CAATACATAGATGATTTGTTAAGGCT	ATGGTGGTGGGCCCTGT
30	GACACTGCATGACCAGCAGG	ACTGGGCTCCTTCCCTTGAC
31	CCCTGCTTCAGGGCTAAAATT	CCAAATGGCCCATTCAG
32	GATGGAATGAGGGGAGAGGAC	ACACCAAAACGGCCCCC
33	GTGTGGCTGCGGGTGG	CCGCTCCCTCTACAGACCT
34	CCGTTTGGTGTTCGGGTC	TGCCGTGAGTTCAGGGGT
35	ATCCCTGGCGCTCGC	CCCGATTAATACCAGTGGGG
36	TCCCAACCCAGGCATCC	AAAGGGCGCTGTCTCTCCA
37	CTTAGTCTGGCCCTGCCT	CTACAAACATTTCTGAGCCCC
38	GCCAGAATTCGGGCTCAA	CAACCCCTCCTAAACCTGAGGC
39	TCCTACCCCTTCACTGTGGG	CCCTGCTGCTTTCGGAGAGA
40	GGAGACCCAGGCTGAGACCT	AGCTGACGCGTCTGAGGAT

Using the above primer sets, 40 polynucleotides are amplified from blood DNA samples from 16 asthmatic patients. PCR reactions are carried out in a reaction volume of 10 µl containing 1X GeneAmp® 10X PCR buffer (Perkin Elmer P/N N808-0240), 13 ng of template DNA, 400

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

28

μ M of each dNTP (Amersham Life Science Nucleix Plus™ 2.5 mM dNTP mix; Prod. No. US77119), 30 ng of each primer, 2 mM MgCl₂ and 0.5 u of AmpliTaq Gold™ polymerase (Perkin-Elmer P/N N808-0242).

Typical thermal cycling conditions using a Biometra UNO II cycler (Part No. 050-603; Anachem Ltd., Luton, UK) are as follows, the sequence Step 2-Step 3-Step 4 being repeated 36 times:

Step 1	95°C	10 min
Step 2	92°C	1 min
Step 3	60°C	1 min
Step 4	72°C	2 min
Step 5	72°C	10 min

To generate heteroduplexes, 2 μ l of PCR product is denatured at 95°C for 10 minutes and annealed at 68°C for 30 minutes using a thermal cycler (eg. Biometra UNOII). 2 μ l of 2x loading buffer (20% ethylene glycol, 30% formamide, 0.025% xylene cyanol, 0.025% bromophenol blue) is added to each sample before gel analysis.

A standard DNA sequencing apparatus (Owl Scientific S3S; Autogen Bioclear UK Ltd.) is used with a 60 sample comb (Owl Scientific S2S-60A; Autogen Bioclear UK Ltd.) and standard power supply (Biorad, Cat No. 165-5057) equipped with a temperature probe (Biorad, Cat No. 165-5058). A 0.4 mm thick 15% polyacrylamide gel is prepared using a 99:1 ratio of acrylamide to BAP cross linker, 10% ethylene glycol and 15% formamide in 0.5 x TTE. Gels are pre-run for one hour at 30 watts, limiting the temperature to a maximum of 25°C (using an electric fan to keep the temperature down if necessary eg. Jencons, Cat No. 292-004). After the pre-run, the wells are flushed with a pipette and the samples are loaded into the wells. The gel is then electrophoresed at 12 watts overnight (15 hours) at 25°C. Fragments greater than 350 bp remain on the gel.

After electrophoresis, the gel plates are separated. The gel is stained by placing the gel in 0.5x TTE containing 1 μ g/ml ethidium bromide (Biorad, Cat No. 161-0433) for 10 minutes, followed by destaining in 0.5x TTE for 10 minutes. The gel is then photographed on a UV transilluminator (eg. UVP GDS 7500).

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

29

Potential polynucleotide changes are detected by CSGE in one or more of the 16 patients for 15 of the 40 PCR fragments. For each of these potential changes, the PCR fragment from all 16 patients is subjected to double stranded DNA sequencing on an ABI377 automated sequencer using standard methods (<http://www.pcbio.com/ab/about/dna/377/>) and the resulting DNA sequence is analysed using CONSED software (Gordon et al., Genome Res. 8:195-202) to confirm the presence of a sequence change and to identify the exact base change. All of the 15 potential changes detected by CSGE are confirmed. The number of patients exhibiting the polymorphic changes are shown in the table below:

Polymorphism	SEQ ID No.1 position	SEQ ID No.2 (rev. comp.) position	SEQ ID No.4 position	a.a. change	# patients
G to T	589	-	-	Intron 1	16
C to T	1001	-	-	Intron 1	2
C to A	1060	-	501	Pro3His (exon 2)	16
G to C	2033	-	-	Intron 3	1
T to G	2193	-	-	Intron 3	1
A to G	2561	-	-	Intron 3	16
G to A	5667	-	1931	Ala480Thr (exon 4)	1
C to T	5804	-	2068	Pro525Pro (exon 4)	1
C to T	6377	-	2641	Ala716Ala (exon 4)	14
G to C	7390	-	3654	3' untranslated	5
G to T	7531	-	3795	3' untranslated	1
G to C	-	1212	-	3' untranslated	12
G to A	-	1216	-	3' untranslated	1
G to A	-	1964	-	3' untranslated	2
G to A	-	2330	-	3' untranslated	5

Two of the detected polynucleotide changes alter the amino acid sequence (non-synonymous change) of the AAGA-encoded protein, 2 are synonymous (no residue change due to degeneracy of the genetic code), and 11 occur in non-coding regions of the gene.

Two hundred trios (both parents and an affected child) from the Dutch families are genotyped for SNPs at positions 1060, 2561, 6377, 7390 in SEQ ID NO:1 and position 2330 in SEQ ID NO: 2 by allelic discrimination assay using TaqMan™ technology on the ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector (PE-Applied Biosystems, Warrington, UK). Two TaqMan™ fluorogenic probes, one specific to the non-SNP allele and one specific to the SNP allele, are designed to hybridise to the site of the SNP in the PCR-amplified target sequence:

Position	SNP	Non-SNP
1060	TGCCTCAGGGGCTCCATCCT	TGTGCTCAGGTGCTCCATCCT
2561	TGCCTCACCGGCACACG	TGCCTCACCGGCACACG

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

30

6377	TAGATCAGCTCGGCATTGACACCAG	CTGTAGATCAGCTCAGCATTGACACCAG
7390	CTCCCATGTGCCAGACCGGC	CCTCCCATGTACCAGACCGGCA
2330	TGCCCCAGGCACTAGGCAGCT	TGCCCCAGGCGCTAGGCA

The TaqMan™ probes consist of an oligonucleotide with a fluorescent reporter dye (FAM or TET) and a quencher dye (TAMRA) covalently linked to the 5'- and 3'-ends, respectively. The proximity of the reporter dye to the quencher dye results in suppression of the reporter fluorescence in the intact probes. Upon amplification of the target sequence, the probe is cleaved during the extension step of the PCR. This removes the influence of the quencher dye and allows the reporter dye to fluoresce. As the SNP and non-SNP probes carry different reporter dyes, the level of fluorescence of each dye is proportional to the amount of SNP or non-SNP target sequence in the sample.

The transmission disequilibrium test [Spielman et al., Am. J. Hum. Genet. 52: 506-516] is used to test for a genetic association between the 5 genotyped SNPs and asthma/asthma subphenotypes. In this test an allele transmitted by a parent to an affected child is matched to the other allele not transmitted from the same parent; McNemar's chi-square test of discordance is then applied to the resulting pairs [Terwilliger and Ott, Hum. Hered. 42, 337-346]. TDT analysis of the genotype data obtained from the 200 Dutch asthma families reveals a strong genetic association between the SNPs at positions 6377 ($p=0.00017$) and 7390 ($p=0.00049$) in SEQ ID NO:1 and bronchial hyperresponsiveness and indicate that AAGA is a susceptibility gene for asthma and that individuals carrying the two SNPs are at increased risk for developing bronchial hyperresponsiveness. In addition, $p=0.01$ and $p=0.001$ are obtained for the SNPs at positions 6377 and 7390 respectively using the family based association test [FBAT; Horvath, Xu and Laird, Eur. J. Hum. Genet. 9, 301-306].

Example 4

This Example relates to the expression of full length AAGA with a 6 histidine tag at the C-terminus using the Baculovirus system in *T.ni* Hi5 cells, and to the purification of the resulting polypeptide.

1. Construction of a Recombinant AAGA Baculovirus

A unique *EcoRI* site is incorporated 5' to the AAGA start codon (position 377 in SEQ ID Nos: 4, 5 and 6) by PCR amplification using the following primer:

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

31

5ST

5'-GAAGATCITCGGAAATTCATCAATG-GTGATGGGAGCCCTTTGGAG-3'

Another primer is used to introduce 6 histidine residues immediately prior to the AAGA stop codon (position 3574 in SEQ ID No:4 for 3ST1 and position 4105 in SEQ ID Nos:5 and 6 for 3ST2). This primer also incorporates a unique KpnI site 3' to the AAGA stop codon.

3ST1 (Splice variant 1)

5'-

AAGATCITCGGTACCTCAATGGTGATGGTGATGGTGCTCCACACCTCGGTCCAG

-3'

3ST2 (Splice variants 2 and 3)

5'-

AAGATCITCGGTACCTCAATGGTGATGGTGATGGTGCAAGGTAGATCTCGCGCTTG

-3'

The recombinant "His tagged" version of AAGA splice variant 1 is ligated as a 3208 bp EcoRI/KpnI fragment into EcoRI/KpnI digested pFastbac1 baculovirus transfer vector (Life Sciences). The recombinant "His tagged" version of AAGA splice variants 2 and 3 is ligated as a 3739 bp EcoRI/KpnI fragment into EcoRI/KpnI digested pFastbac1. The recombinant AAGA sequences are transposed into Bacmid DNA carried by DH10Bac cells (Life Sciences; Bac to Bac Baculovirus expression system). AAGA recombinant Bacmids are isolated from DH10Bac cells and transfected into Sf9 cells using published protocols (Bac to Bac baculovirus expression system manual; Life Sciences).

2. Amplification of recombinant Baculovirus stocks

The recombinant baculovirus is amplified by infecting Sf9 cells (maintained in SF900 SFMII medium; Life Sciences) at a cell density of 0.5×10^6 cells/ml and a multiplicity of infection (moi) of 0.01 for 96 hours. Sf9 cells are then centrifuged at 1000x g for 5 minutes. The supernatants containing high titre virus are stored at 4°C.

3. Expression of recombinant AAGA in Hi5 Cells

Hi5 cells (Invitrogen), maintained at densities of between 3×10^5 and 3×10^6 cells/ml in Excell 401 medium (JRH Biosciences; distributed by AMS Biotechnology in either shaker flasks (rotated at 90 RPM) or spinner flasks (stirring at 75 RPM) are infected with the amplified

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

32

recombinant Baculovirus at a cell density of 2.0×10^6 at an moi of 2.0 for 60 hours. Following infection Hi5 cells are centrifuged at $1000 \times g$ for 5 minutes, the supernatants poured off and the cell pellets frozen at -80°C .

4. Crude lysate preparation

The cells (1×10^9) are resuspended in 100 ml lysis buffer (20 mM Hepes pH 7.5, 100 mM NaCl, 5% glycerol, 2 mM β -mercaptoethanol, 0.5 mM imidazole, 0.1% Nonidet P-40, 40 $\mu\text{g/ml}$ AEBSF, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin and 0.7 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A). Cells are incubated on ice for 15 min then centrifuged at $39,000 \times g$ for 30 min at 4°C . The sample is filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ filter immediately prior to use.

5. Metal chelate affinity chromatography

Metal chelate affinity chromatography is carried out at room temperature with a column attached to a BioCAD chromatography workstation. A 20 ml Poros MC/M ($16\text{mmD} \times 100\text{mmL}$) column is charged with Ni^{2+} prior to use and after each purification. To charge with Ni^{2+} , the column is washed with 10 column volumes (CV) 50 mM EDTA pH 8, 1 M NaCl followed by 10CV water. The column is charged with 500 ml 0.1 M NiSO_4 pH 4.5-5, washed with 10CV water, then any unbound Ni^{2+} removed by washing with 5CV 0.3 M NaCl. All steps are performed with a flow rate of 20 ml/min. The charged MC/M column is saturated with 5CV Buffer B (20 mM Hepes pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 2 mM β -mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 250 mM imidazole) followed by equilibration with 10CV Buffer A (as Buffer B except 0.5 mM imidazole). 90-95 ml of the crude lysate is loaded onto the column per run at a flow rate of 20 ml/min. Subsequent steps are carried out with a flow rate of 30 ml/min. Any unbound material is removed by washing with 12 CV buffer A and AAGA eluted by applying a 0-100% Buffer B gradient over 10 CV. Fractions (8 ml) are collected over the gradient. AAGA-containing fractions are combined and protease inhibitors added to the final concentrations described for the lysis buffer above. DTT is also added to a final concentration of 1 mM. The combined fractions are dialysed overnight against 4 litres 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF at 4°C .

6. Ion Exchange (Anion Exchange) Chromatography

ResourceTM Q chromatography is carried out at 4°C with a column attached to an FPLC workstation (Amersham Pharmacia Biotech). A 6 ml ResourceTM Q column ($16 \text{ mmD} \times 30 \text{ mmL}$) is equilibrated with 10 CV Buffer C (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT) at a flow rate of 2 ml/min. The dialysed metal chelate eluate is applied to the column and washed with 10 CV Buffer C. The protein is eluted by applying a 0 - 100% Buffer D gradient (20 mM

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

33

Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 1 M NaCl) over 10 CV. Fractions (3 ml) are collected on eluting the column.

7. Gel Filtration

Gel Filtration chromatography is carried out at 4°C with a column attached to a BioCAD SPRINT chromatography workstation (PE Biosystems). A 24 ml (10 mmD x 300 mmL) Superdex 200 HR (Amersham Pharmacia Biotech) column is equilibrated with 10 CV Buffer E (20 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM DTT, 150 mM NaCl) at a flow rate of 0.5 ml/min. The ion exchange eluate is applied to the column and eluted with Buffer E. Fractions (1 ml) throughout the purification run are collected and analysed.

8. Sample Concentration

Samples are concentrated approximately 10-fold using a Millipore Ultrafree-15 centrifugation device (MW cut-off 50 kDa) at 4°C. The device is pre-rinsed with water prior to use. The final storage buffer used for long term storage at -80°C is 20 mM Hepes pH 7.5, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 5% glycerol. Glycerol can be omitted from the sample for storage at 4°C.

Example 5

This example relates to the production of polyclonal antibodies against AAGA protein purified as described in Example 4.

Immunisation of Rabbits:

Dutch rabbits (Harlen-Olac) are immunised at 4 subcutaneous sites with 500 µg purified AAGA protein in PBS according to the following schedule:

DAYS	IMMUNISATIONS
0	1 st immunisation 1:1 in complete Freund's adjuvant
15	1 st boost 1:1 in incomplete Freund's adjuvant
45	2 nd boost 1:1 in incomplete Freund's adjuvant
55	1 st test bleed from the ear artery
Every month	Boost 1:1 in incomplete Freund's adjuvant until a good antibody response is obtained

Test bleeds (500 µl) are taken and the serum assessed for antibody titre. Serum is collected when a maximum titre is reached. This is done by collecting blood (10 ml) and allowing it to clot for 2 hours at 4°C. The blood is centrifuged at 1000x g for 5 minutes to separate the serum. The serum is removed and stored at -20°C until assayed.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

34

ELISA Screening:

Nunc-Immuno Plate Maxisorp 96 well plates (Nunc, Fisher Scientific UK, Loughborough, UK) are used as a solid support and coated with the purified AAGA protein (100 ng/well) overnight at 4°C. The plates are blocked for 3 hours at 37°C with PBS containing 2% BSA (Sigma) and 0.02% NaN₃ (Sigma). After blocking, plates are incubated overnight at room temperature with serum in different dilutions of PBS. The presence of polyclonal antibodies is checked with both biotin labelled IgG-antibodies to rabbit (Goat anti-rabbit IgG antiserum, 1:25000 dilution), with an incubation time of 40 min. Alkaline phosphatase conjugated streptavidin (Immununo Research, Dianova, CH) is then added at a dilution of 1:10000. Development of the reaction is carried out by adding an alkaline phosphatase substrate (Sigma, f.c. 1 mg/ml) dissolved in diethanolamine. After 45 min. absorbance is read at 405 nm with a reference of 490 nm with an ELISA plate reader (Bio-rad laboratories Ltd., Hemel Hempstead, UK).

Purification:

5 ml protein A-agarose is poured into a chromatography column and washed with 6 column volumes of 0.1 M tris (hydroxymethyl) methylamine (Tris) buffer pH 7.5. The rabbit serum containing anti-AAGA antibodies is diluted (1/2) with Tris buffer and added to the protein A-agarose. Unbound proteins are removed by washing the column with 6 volumes of Tris buffer. The IgG is eluted off the column with three column volumes of 0.1 M glycine buffer pH 3.0 and collected as 1 ml fractions into tubes containing 28 µl of 1 M Tris. The fractions which are positive for protein content are checked for purity by SDS-PAGE under reducing conditions. Two bands at 50 and 25 Kd are visualised corresponding to the heavy and light chains of an immunoglobulin molecule. Fractions containing only immunoglobulin are pooled, re-checked for protein concentration and stored at -20°C.

Example 6

This example describes the preparation of monoclonal antibodies against AAGA protein purified as described in Example 4.

Immunisation of Mice:

Female Balb/c mice are immunised intraperitoneally with 100 µg of AAGA protein in PBS according to the schedule given below:

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

35

DAYS	IMMUNISATIONS
1	1 st immunisation 1:1 with complete Freund's adjuvant
14	1 st boost 1:1 with incomplete Freund's adjuvant
21	2 nd boost 1:1 with incomplete Freund's adjuvant
28-30	Three final boosts in PBS
31	Fusion with mouse myeloma cells

Serum is assessed for antibody titre by ELISA (Example 5) after the animal is sacrificed for the preparation of spleen cells for fusion. If antibody titre is sufficient, (1/1000 to 1/100,000), the hybridomas are screened, otherwise discarded.

Preparation of Myeloma Cells

Sp2/0 murine myeloma cells (ATCC #CRL 1581; maintained in culture medium containing 20 µg/ml 8-azaguanine) are cultivated for one week before fusion in RPMI 1640 (8-azaguanine is *not* included), 10% (v/v) FCS and 1% penicillin-streptomycin (50IU/ml and 50 µg/ml, respectively). The cells are harvested by centrifugation (200 xg for 5 min) and washed three times in cold RPMI 1640. Approximately 2.5×10^6 cells are used per 96 well microtitre plate.

Preparation of Spleen Cell Suspension

The mouse is killed by an overdose of anesthetic (Forene), the spleen dissected and pressed through a cell strainer (70 µm mesh cell strainer; Becton & Dickinson, Oxford, UK, Cat. No 2350). The cell suspension is washed three times in RPMI 1640 (as above) and counted: 5.10^6 cells /96 well plate are necessary.

Fusion of Myeloma Cells and Spleen Cells

The spleen and myeloma cells are mixed (2:1), centrifuged (200 xg for 5 min) and the pellet warmed in a 37°C water bath. Prewarmed polyethylene glycol 4000 (1 ml per 10^8 cells) is added slowly over one minute, then 20 ml of prewarmed wash medium over two minutes. After centrifugation the pellet is carefully resuspended in selection medium (RPMI 1640, 10% FCS, 1% penicillin-streptomycin, 10% BM conditioned HI (feeder cell replacement from Boehringer Mannheim, Lewes, UK; Cat. No. 1 088 947), 10 % HAT-media supplement (hypoxanthine, aminopterin and thymidine to select against unfused myeloma cells; Boehringer Mannheim, Lewes, UK; Cat. No. 644 579) and plated, 200 µl/well of a 96 well

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

36

microtitre plate. After five days clusters of hybrid cells can be identified by examining the bottom of the microtitre wells with an inverted microscope. After 10 - 14 days the culture supernatant is tested for the presence of antibodies by ELISA (example 4). The positive clones are expanded in a 24 well assay plate and retested.

Cloning of Positive Hybridomas

The expanded clones which are still positive are cloned by limiting dilution. Cells are diluted serially in four dilutions steps in a 96 well microtitre plate; 5, 2, 1 and 0.5 cells/well. HAT-media supplement is replaced with HT-media supplement (Boehringer Mannheim, Lewes, UK; Cat. No. 623 091). After approximately one week the cells are screened by ELISA (Example 4). The cells of those wells containing a single positive clone are expanded.

Production of Monoclonal Antibody Supernatant

The cells are grown in culture flasks in standard medium (RPMI 1640, 10% (v/v) FCS and 1% penicillin-streptomycin) until the hybridomas overgrow and die. The debris is removed by centrifugation and the supernatant containing the antibodies is titred using ELISA (Example 4) before storing under sterile conditions at 4°C, -20°C or -70°C.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

37

Claims

1. A method for determining whether a subject has, or is at risk of developing, a disease characterised by bronchial hyperresponsiveness, comprising determining, in a sample of cells from the subject, (i) the level of expression of a polynucleotide (A) comprising the nucleotide sequence SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6 or a sequence which hybridises thereto under stringent conditions, or the level of expression of a polypeptide (B) comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 8 or a functionally equivalent variant thereof, or the level of a bioactivity of said polypeptide (B), and comparing the level of expression of (A) or (B) or the level of bioactivity of (B) with the respective level of expression of (A) or (B) or bioactivity in a healthy subject, or (ii) the presence of a variant of said polynucleotide (A) or said polypeptide (B) associated with bronchial hyperresponsiveness.
2. A method according to claim 1, in which the variant of polynucleotide (A) associated with bronchial hyperresponsiveness is a variant having an alteration which alters the amino acid sequence in the encoded polypeptide or which alters the expression level of the encoded polypeptide or which alters the stability of a transcript or which alters the way in which a transcript is processed.
3. A method according to claim 2, in which the variant has an alteration involving at least one of (i) a deletion of one or more nucleotides from polynucleotide (A), (ii) an addition of one or more nucleotides to polynucleotide (A), (iii) a substitution of one or more nucleotides of polynucleotide (A), (iv) a gross chromosomal rearrangement of polynucleotide (A), (v) a gross alteration in the level of a messenger RNA transcript of polynucleotide (A), (vi) aberrant modification of polynucleotide (A), such as of the methylation pattern of the genomic DNA, (vii) the presence of a non-wild type splicing pattern of a messenger RNA transcript of polynucleotide (A), (viii) a non-wild type level of polypeptide (B), (ix) allelic loss of polynucleotide (A), and (x) inappropriate post-translational modification of polypeptide (B).
4. A method according to claim 1, 2 or 3, in which the variant of polynucleotide (A) is detected by incubating a DNA sample from the subject with a polynucleotide probe comprising at least 5 contiguous nucleotides of polynucleotide (A), under conditions where the probe hybridises to complementary polynucleotide sequence, to produce a first reaction product, and comparing the first reaction product with a control reaction product obtained

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

38

from the probe and DNA from a healthy subject.

5. A method according to claim 1, 2 or 3, in which determining the presence of a variant of a polynucleotide (A) comprises determining the identity of an allele or allelic variant of a polymorphism of a polynucleotide (A) to determine thereby whether the subject has a specific allelic variant of a polymorphism which is associated with bronchial hyperresponsiveness.

6. A method of detecting in a cell sample the presence of a variant of polynucleotide (A) as defined in claim 1 associated with bronchial hyperresponsiveness comprising determining the identity of an allele or allelic variant of a polymorphism of a polynucleotide (A) in said sample.

7. A method according to claim 5 or 6, which comprises allele- specific hybridisation using a probe overlapping the polymorphism and having from 5 to 30 nucleotides.

8. A method according to claim 5 or 6, in which the variant of polynucleotide (A) comprises a single nucleotide polymorphism and the allelic variant is identified by sequencing a DNA sample.

9. A method according to any one of claims 5 to 8, in which the polymorphism is at one or both of positions corresponding to positions 6377 and 7390 in SEQ ID NO: 1.

10. A method according to claim 1, 2 or 3, in which determining the presence of a variant of said polynucleotide (A) comprises determining, in a sample of cells from the subject, the identity of the base at one or both of positions corresponding to positions 6377 and 7390 in SEQ ID NO: 1.

11. A method according to claim 9 or 10, in which T at the position corresponding to said position 6377 and/or C at the position corresponding to said position 7390 indicates a variant of said polynucleotide (A) associated with bronchial hyperresponsiveness.

12. A method according to any one of claims 5, 6 and 9 to 11, in which a nucleic acid comprising SEQ ID NO: 1, or a portion thereof comprising nucleotide 6377 and/or nucleotide 7390, is isolated from said sample and the isolated nucleic acid or portion is sequenced.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

39

13. A method according to claim 5 or 6, in which DNA fragments from a cell sample are amplified by PCR in the presence of an allele-specific primer capable of detecting a polymorphism in polynucleotide (A) at one or more of positions 6377 and 7390 in SEQ ID NO: 1.
14. An allele-specific oligonucleotide probe capable of detecting a polymorphism in polynucleotide (A) as defined in claim 1 at position 6377 or 7390 of SEQ ID No: 1.
15. A probe according to claim 14 having 15 to 30 nucleotides and overlapping said position 6377 or 7390.
16. An allele-specific primer capable of detecting a polymorphism in polynucleotide (A) as defined in claim 1 at position 6377 or 7390 of SEQ ID No: 1.
17. An isolated polynucleotide which is a variant of polynucleotide (A) as defined in claim 1 associated with bronchial hyperresponsiveness.
18. A polynucleotide according to claim 17 which is a variant of polynucleotide (A) having a specific allelic variant of a single nucleotide polymorphism at position 6377 and/or position 7390 of SEQ ID NO:1.
19. An isolated mutant polypeptide associated with bronchial hyperresponsiveness which is a polypeptide encoded by a polynucleotide according to claim 17 or 18 or a variant of polypeptide (B) as defined in claim 1 associated with bronchial hyperresponsiveness.
20. A method for pharmacogenomically selecting a therapy to administer to an individual having asthma, comprising determining an AAGA genetic profile of an individual and comparing the individual's AAGA genetic profile to an AAGA genetic population profile, thereby to select a therapy for administration to the individual.
21. A method of monitoring the effectiveness of treatment of a subject with a pharmaceutical comprising determining the level of expression or activity of polynucleotide (A) or polypeptide (B) as defined in claim 1 in a pre-administration DNA sample from the subject and in a post-administration DNA sample from the subject, comparing the respective level of expression or activity in the pre-administration sample and the post-administration sample and, if required,

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

40

altering administration of the pharmaceutical to the subject accordingly.

22. A method of treating a disease characterised by bronchial hyperresponsiveness which comprises administering to a subject in need thereof an effective amount of a polynucleotide (A) as defined in claim 1, or a polypeptide (B) as defined in claim 1, or an antibody (C) which is immunoreactive with said polypeptide (B) or a variant thereof associated with the disease, or an antisense oligonucleotide (D) comprising a nucleotide sequence complementary to that of said polynucleotide (A) or a variant thereof associated with the disease.

23. A method according to any one of claims 1 to 13 and 22, in which the disease is asthma.

24. A method of identifying a substance which modulates the activity of a polypeptide (B) as defined in claim 1 or a variant thereof associated with bronchial hyperresponsiveness comprising combining a candidate substance with said polypeptide (B) or said variant and measuring the effect of the candidate substance on said activity.

25. A method of identifying a substance which binds to a polypeptide (B) or variant thereof as defined in claim 1 comprising mixing a candidate substance with said polypeptide (B) or said variant and determining whether binding has occurred.

26. A method of identifying a substance which binds to, or modulates an activity of, a polypeptide encoded by a variant of polynucleotide (A) as defined in claim 17 or 18, comprising mixing a candidate substance with said polypeptide and (i) determining whether binding has occurred and/or (ii) measuring the effect of said substance on said activity.

27. Use of an oligonucleotide probe comprising at least 5 contiguous nucleotides of polynucleotide (A) as defined in claim 1 for the preparation of an agent for the diagnosis or prognosis of a disease characterised by bronchial hyperresponsiveness.

28. Use of a polynucleotide (A) as defined in claim 1 or a portion thereof comprising nucleotide 6377 and/or nucleotide 7390 of SEQ ID No: 1 for the preparation of an agent for the diagnosis or prognosis of a disease characterised by bronchial hyperresponsiveness.

29. Use of a polynucleotide (A), a polypeptide (B), an antibody (C) or an oligonucleotide (D) as defined in claim 22 for the preparation of a medicament for treatment of a disease characterised by bronchial hyperresponsiveness.

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

1

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis AG et al

<120> Disease-Associated Gene

<130> Case 4-32067A/HO 41

<140>

<141>

<160> 94

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19751

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

aaggacagcc cagggcagct cccaatgcc attccagggc tagtcagccc tgaccacagt 60
tctgacocca atcttgacct gtgttccett gtaagcaact gcccatggca gcaggagggg 120
gagggagaga gccctagcaa ctgtgcatgt ccctgtgtgc atgctctggg gcattgtgtc 180
atgctctggg gcatgtgtgc acgtgtgtgc gcctgtgtgc acgtctctgg gcattgtgtc 240
tgggggaaag toggggaagg taacacctac tctcaaac taaccattt cacaagcctt 300
gcccaattca agctggcctt ttatgggggt ggagaatact gggcaccgtg ggtgattgtc 360
agaaaaagag gatttgagat gtcaatcctc atgcatagc actgacttgg catctcagaa 420
caaaagagaa tgagacatca tccctctctc ctccagccaa ccttaattga gcccatgttg 480
acaagtcaag gtcccagggt ctgggggtgtg taaggacgta cttgtgtctc tttcctacca 540
tgcatgtggg gagggtgtct ccagttgggg atgctcgagg tctcaccctt ccactggctc 600
tctctcccta tctcaatc acagtaacta ccactcgtga ctgaaggcag atgctcgtgt 660
gaagaggtgt ttgggtgaag caacagagag agagcaaggg gnaaaagag gaagaaggcc 720
gggcagccgg gcttgggccc agggagcgtc aggtgggtca ggggttcca tgggggggag 780
ctgctctagg catgcccagg ctcttactgg ctctctcagg tggggcagac actgctgcta 840
caccagctg tggatgagat toagggatct gactttctgg aatcgggggt ctgtctgggg 900
actgactgct cttgtggaga atcgtgtgtc agtgggagag ggtgagtatg gggccagctc 960
tgggcagctc agggccaggc ttttctctcc agctcatggt cctgtttttg cctctctccc 1020
tgcagccct cctgactctg ggcctctcca ggatggagcc cctgaggcac agcccagccc 1080
ctgggggaca acggtactgt ctgcccctca tgtctctagg actgctgctc ctgctggctc 1140
catccccagg ccagccactc cgggtatgtt acaagtgcc ggagggaacg caaccacaca 1200
ccctcaattgg gagcctcgca gccgactatg gttttccaga tgtggggcac ctgtacaagc 1260
tagaggtggg tgcccgttac cttctgctgg atggcaagac agtgacattt ttaccaccgg 1320
agactcccat cgaccgtgag gggctcctgt aatgccagaa ccagctccct ggtgatccct 1380
gcactcctgga gtttgaggtg tctatcacag acctcgtgca gaatggcagc ccccgctgct 1440
tgaggggcca gatagaagta caagacatca atgacaacac acccaacttc gccctaccag 1500
tcatctctct ggcctcctct gagaacacca acatcggctc actctctccc atcccgtgtg 1560
cttcagaccg tgatgtctgt ccacaagctg tggctccta tgagctcag gctgggctcg 1620
agggccagga gctatttggg ctgcaggtgg cagaggacca gaaggagaag caaccacagc 1680
tcatttggat gggcaacctg gaccgtgagc gctgggactc ctatgaactc accatcaagg 1740
tgcaggatgg cggcagcccc ccacgggcca gcagtgccct gctgggtgtc accgtgtgtg 1800
acaccaatga caacgccccc aagtttgagc ggcctccta tgaggccgaa ctatctgaga 1860
atagcccact agggccactg gtcacacagg tgagaggccc cctcctgata actgtcaggg 1920
tgaccaccca ctgaaaaatgg gagcccaccc aaccaggtag gacttccctt caacttaggg 1980
aaaaactgac agaatctgtt agtgagacc ctctctccca aactcagcca ggggagcttt 2040
tcccaccca ccccagcagg tgatattact ttctctctac aggtcaacta ggtgacagtg 2100
aaatagcata tgaacagttt cctgtgaccc ctcaaggcaga ctcaagctgg ggaacctct 2160
gagaagttaa actcccggcc tagtcaagta gatcctctc tctagccag gtgagctgag 2220
ttggaacaaa ggaatcaccc tttatccagg tagaatctc cctgagatga gatgatctc 2280
ccaaccaggg atagttctct ttagccaga tgaggttttc ctgaagctgg aggatatagc 2340
ctcaatttgc ctctctctga caaagtcaga tgagatcatt ttagccaggt gggaccctca 2400
gagttctgaa aaaaactact aggtgtctgt tatacatgoc tctctcccta ggcattgggt 2460
gcccatagat gtgggtgtct tggtaagtg ggttcagtg ggggtcaact tctctctgtt 2520
gaagttctca gcccccctct ccattgggaa ttgcccaggg actaggcagc ttggtggggc 2580
tgggactgg gagggagcaa agaaagcctc bctgcaaga ggtgggtgta tctcccctg 2640
tcactcagc tctgtctctc tgcagcccc agctccttc ccttctccca tgggctgaag 2700
atgctctctc ctttgatgtg agggagctga ggaggtctgg cctgcccctg acaccattac 2760
ccatctctga aaacccttag tctctgggtc tcaagccaaa gtgggagatg ggtgggagtt 2820

```

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

2

```

ttagcctttt tttttttt tagagcctgg tggactggga cctggaaaag asactgagaa 2880
agaaaaggga gacagacagt cggggatagc aaataactag agcctagggt ccagcgacag 2940
ttctaaacac atgatgtgta ttatcattac taabctttac agtacaaggt aagttattac 3000
ccatttttgc agatgagaaa ccggggcccaa acagattaga aaactcgctc gatctctcac 3060
agctaatgag ttacagatcc acccttgcgg cagccaagag tctggcttca gagcctagggt 3120
tftaaagagc tttaccacct ccagtgagg tgaagcggga gagttaggca gagagtaagc 3180
agagaggtca gtaggctga aaagagagca tggaaagaaa caggctgtgg gaaaggggaa 3240
gaatcagaac ttagcaagga tgaagaggag acagaagcca agagtcacag agacaaagag 3300
agttaaagca agagcaagt aagctggaaag accaactcag agccaaggya gactggggat 3360
cctcatcata aagttatga cagtgagact ggggtgaggg gaggagaaac tgtttgggtt 3420
tggactcagc agatgtgagc aqegaccagg gtacctgggg accattgcc caggagctct 3480
cactgtagga aaagccagg cggggatagc tggagttccc atbcccaagg aggagaggac 3540
tggcagtgcc ttgagggctc actaggtgca gtgcccacta ctgcattagc actgattttt 3600
cagagggcag cgggtaggag ggttagatgt tggacagaca aaaagaaata catgctcttt 3660
agggagcact ttccctgtgc cgggcaatgt caggcaatbt taacctgtat atccctttg 3720
atgtccacca cagttctgtg aaataggtta cattaatabc cccatttccac acattcatag 3780
actgagctct agggaggtta aataatgtgc ccaaggtcac atagttactt ggyaagtggt 3840
ataactggga ttgaaacca ggaactctct gttttgttac ccagagactc ctgccaagt 3900
atgcttattc tccctcact ccccaagca gtcaactctc gtctgctgt gacttaactc 3960
cagccctcat gttctctct gccacagat acccaatggc cttcccacc tgggtctctc 4020
tcccattac caacctggt tcatagagat tgagtcagat gcgcttga gttggcgtgg 4080
gaggggtgac ccgctgact cagagggaca gacagtctat tgtttgatc tgggagccca 4140
gcccactgac agcaggtctc tgggctgca tcaacccctc cctctgggt gcaggtcag 4200
gcccagttcg ccgatttgg tctcggcag ccggtaccag tgggagggag aagttgctgc 4260
tgaaccaagg ttcccgggt tgaacagagc gttgctgggt ccggctctc 4320
tgaaccaaaa cctactga cttcttcaa aagaaatccc ccaactggg gcttcagat 4380
gggcatgtga gctttactc atgtgtgcaa acacacatc gcaaaaac atatacttc 4440
tcaacaaaa atcacacata atcacacatt ctgacacat atacacata caaacacata 4500
taactctca cacaaaata tcaactttaa tcaacatlc tgaacaaac atacacatac 4560
atattgtcat gctgctgac atgtagtca cttcaacag ggcacacaca ccgctctac 4620
tactcagccc tccacatc tcaaggagg tcaaggcagg tctcaatgtt gaaatggctt 4680
cctagttctc atgttactc catctctcc tttatattt tggcaagct acagcaatga 4740
caagttaggt tcaatttgc cctgtccat ctcaaatag cctgctgag actgttggg 4800
atttcagagc tgcactgag ctctcagga aaataggtta gtaatgctc ccagatgtc 4860
gcaattggga aaaggcagga cacacatgc tctggaaag gtagcagatc logattgct 4920
gtgtctgcca tgcctgttg aaaggacatt ggcagcagtg gtgcccctt alttgctac 4980
cctgatctaa accatctct tctctctgt tttctctcc tgcctatag gtgaaggcca 5040
atgactcaga ccaaggtgcc aatgcagaaa tcaatacac atccaccag ggcagcaaca ccgctctac 5100
ttgtgaggg ggaacttca ctcagcagga acactgact taccactgtt cagggcccgg 5160
tggaccgtga ggaactaagc accctggct tctcagtgct tgcbaaggc agggcaaca 5220
accccaagag tcccctgoc caggtgttg tgaccgtgaa ggaactgaaat gcaaatgccc 5280
ccaccattga gatccgggc atagggctag gactcatca agatgggag gctaacatc 5340
cagaggtagt ggcagaggag acagctgtg ccctggtgca ggtgtctgac cgagatgag 5400
gagagaatgc agctgtcacc tgtgtgtg caggtgatgt gccctccag ctgcccagg 5460
ccagttagac aggcagtjac tacaccatg agatgtggc tgtgactct ggaaccccc 5520
actacagaaa ggtcaagac tcaaccatg aggtgtgga cgtcaatgac aacgcaactg 5580
cctctccag cactaacctc ctcaagtg gaggctgct tcccggaaa caaacagct ggtgaagta 5700
tcttcactca gagtgtcact gaggctgact cctcagctc cctcagctc agccagact 5760
tctgtgagat cactgccagt gatgtgact ctgctctaa tctgtgctg gtttactctc 5820
tggagcctga gccgctgct aagggcctc tcaaccatc acccgagact ggagagatcc 5880
aggtagaac atctctgat cgggaacagc gggagagcta lgagttgag gtggtggcag 5940
ctgaccggg cagtctagc ctccaggcca cagccactgt cctgtcaat gtgctggact 5940
gcaatgacaa tgaacccaaa tttatgtga gtggtcaaa ottctcagt atggagaaca 6000
tgcagact gaptccagtg ggcattgtga ctgtcaatga tggagacaag ggggagaatg 6060
cccaggtgca gctctcagtg gacagagca acgtgact tttatccag aatggcacag 6120
goccatctc atccagctg agctttagat gaggcaaca aagccctac acctccagc 6180
tgaaggcagt gtaggtgtgc gtcccactc gctcagotta cgttgggtc accatcaatg 6240
tctggagca gaatgacaac gcaacctata tcaactgccc tttcaaaccc tctcaaacg 6300
tctgacccc ccagacagct cttggtgaga cggtaagca ggtggcagcc gaggactttg 6360
actctggtgt caatgcccag ctgatctaca gcatgtcagg tggcaacct tatggactct 6420
tcaagattgg gtcacattca ggtgcaatca cctggagaa ggagattgag cggcgcaacc 6480
atggctaca ccgctggtg gtaaggtca gtgaccggg caagccccc cgtctatgca 6540
cagccttggc ccatcttat gtaaatgaga ctctggcaca ccgcaagctg ctggagacc 6600
tctgggcca cagcctggac acgcgctgg atattgacat tctgggat ccagatag 6660
agcctctcaa gcaagctgac aacattctc ttggtgtgtt ggtctgtgt gttgcccgtg 6720
ccttgcctat cgcctggcg gttctgtgc gtaactgcag acagcggag gccaaaagt 6780
gttaccagcc tggtaagag gagaccaag acctgtatc cccaagccc agtggcaag 6840
cctccaaagg aaacaaaagc aaaggcaaga agagcaagc ccaaaagccc gtagagccag 6900
tggaggacga gtagagagc gggctgacga agtccctcaa gttcaactc atgagcagat 6960

```

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

3

```

ccccgggga cagtcocccg atcccactgc cccctcaacta cccaccaggc agccctgacc 7020
tgggcggca cctcgcctct aactcccac tgccttccat cccagctcag ccccagccac 7030
cctcagcctc caagaagcac cagtggttac aggacctgcc accctgaaac aactcctggg 7140
gcaccgggga caccacgtcc accggctctg agcagtaact cgaclacagc taccgacca 7200
accccccaa abaccocagc aagcaggtag gccagccctt tcagctcagc acaccocagc 7260
ccctacccca cccctaccac ggagccatct ggaccgaggt gtgggagta tggagcaggt 7320
ttactgtgct tgcctgactg gggggccagc ctgagccagc agtgggaggt ggggcttag 7380
tgcctcaccg ggcacaagga ttaggctgag tgaagatcaa gggggggtgt gctctgtggt 7440
tccctccctg cccctccccc actggggaga gacctgtgat ttgccaagtc cctggaccct 7500
ggaccagcta ctgggcttia tgggttgggg gtggtagcca ggtgagcgtc astggggagg 7560
gaaatgggta agaagctac tccaaactca ggtctctatg tccagaccga cctagctgct 7620
tctctagagg gaaaacaggg agacctgggg tctctgtgat aactgagtgc gtagctcgc 7680
agggggggc accctcccat tgtgcctctc gtgtgtatgt tgcattaacc tctctccac 7740
cactagcctt ctggggctgg gtcccacatg cctctgacc tgcataataa gttctctatt 7800
tttggagttt tggtttctta tttctggaa ctgagagaag cagcgagaga gactgggagc 7860
agcccttgtt cctcaggtcc taacctcaat tcccctccc ttctctttg ctctgtccac 7920
atctagacc tggccatgt acccccact atcttagcct accctctgc cctccacccc 7980
cagtgcceta tccactgtg ggaagtgge ctctgacca gctctcaat gtagctgct 8040
ggcaatgtgt ccccttgccc atgtctata gggcttctt cctaagaatg accagaaag 8100
ggcagtgga gctataccca agtctgccc catctgagc ttgattttc caatctgctc 8160
aaacagttgc ctctgacaga cctcagactg gagcactgg tagggagtag cactcagcct 8220
ttctctctgc cttaggtgaa ggcagagAAC ctcttgatta caccagccac ctctcccagc 8280
ggcaagtctc tccctcaagt cccctcccca gctcttca tcccaacaca ggcaacccc 8340
agcaattcgc tggccctccc ctgtgtctcc ccaactgta caccagctg agctcaggg 8400
agcgggccc tggggagac atggcgaat cctcaagtct ttgcattgac ctgcccctga 8460
ccccactct taggggttc cctgctcatg agcagtgct tcttagtct gctctccgct 8520
tgtgatgta cctccctccc cacttcccac tctgtctct ggccaccctg ggtgtctgct 8580
ttgactctc tctctccca tctctcaatt ctgtctctc tgggtctgc ctgtctctg 8640
ttgtgctga gttggaggaa ggctaaatg tggctgagg gctcagccc ctgggggagt 8700
ctctgagcgc agaggcaacc tatctccatg gtgactaag aggtctgaga cactcccaag 8760
agccaagcgc ctccagctct tctctctgat tccatccaca aatccccc atgcccctgg 8820
gggcccocaa agtaaaaaat ccttgggtcc ttgggaggt ggggctggg gaagttagat 8880
ctaacaatc tgcctctctc agcaactctt gaaccccat tctctctct cctttctgt 8940
cctttctggc atctctccg tctttctct atctcttag cgtctctctc tctttctct 9000
tcccagtcac tggggatlg tctcttact agctctaact caacctaac cctcattgca 9060
gcacaactga atgtctctc ccaacattca gatacaacca aaccaccca cctgtgtca 9120
tcatcaacac acacaggcca agtttccact gagtaactca catggtacta gacctgtgt 9180
aaaaaaggg cactactgta caagacagc aagtgaacga tgaggcaatt gagtgtctg 9240
agtcgaatga gaagtgcctt actaaagctt tcccactt atccatgaa actacttca 9300
ctgctactgc tcactctctc ttttttttt ttttttttt ttagatggag ttttgcctt 9360
gttcccagc ctggagtgca atggcaatg ctccagctac tgaacctct gctccagag 9420
tccaagaat tctctgctc cagctctctg agtagctggg attacagcca tgtgcaaca 9480
caccagctca atttgtatt ttttagtag acagggttc tccatgttg ttagctggt 9540
ctttagctcc tgaactcagg cgaactgccc gcctggcct cccaaagtgc tgggattaca 9600
ggcatgagcc accatgcccg gcaactcact ccaattttt agtcttact aggtgtgag 9660
taccatgcta agcaacttgt gtgaattagt tcaactcagt ctcataactc tttatgat 9720
gggtcaattt aatataaatt ttgcaagaat gaaaactaaa tagtgatga gccaaactca 9780
aacacaagc agcggggtct ccttataccc atctagctat aaaaaaggc tctctgtgtg 9840
aagttagttt tgggtgaag aatctatga tccacttag ctattaaag ctctgcaag 9900
tctccaaaa aagggggaa cctgttagact tctgttaacc ttttttttt ttttttttt 9960
agcagggctc ttgctctgct acccagctg gagtgcagg gccactctt ggctcattc 10020
aacctctgc accctgggctc aagcgtact cctgtgtagc tgggactaca gctgtcacc 10080
accacactgc gtaatttttt gtaatttctg tagagacagg gttttgccat gttcccagg 10140
ctggctcaaa ctccctggctc caagcgatct gccacactca gctcccaaa gtgcttgat 10200
gacagtgctg agctgcccgt cctggcccaca atttgttta cctctgagt tttctgaatt 10260
tatttcaaca tattgcccct ccttctctt gacgagcaca gtatgggaaa actgttaca 10320
gacatggaaa tgggtctctg gaagagaaa gtccagctgt caatgatgag caggatlag 10380
gaggggggt cccctgctct ctaacaggt caccgtgtaa gcaaaactct gggcagaa 10440
tgaaccaagt tggaggcagg gaaaggcag aaaaaggaat attctgcaaa gaaggggc 10500
taagagaaa gctgaaagat gagaactgaa gaactgtagg tttagagga cataggtgcc 10560
taccaaaag tcttcagaa ggaactagtc cctgaaagct catgagtgt ttgatgaa 10620
tgggttttag aaagagcact ggaatatatg gtgggtctaa aagggcatag agatgaagt 10680
acggactga acctcaaga gttgactat gatggtgca atgggggtga tggatggat 10740
gatttggcaa aggttaggg gaaaggacc acaggatca agyatattt gbatatgag 10800
taggatagg gaatgaggg agactacca gtabctccg glagactca goctctag 10860
tctggctgat aggatagta ttagatcatt gccatacag agetaattg aagaactt 10920
tggttcaga catgttgaat ctaaggggc agtagcaga gccactgga aataatcag 10980
aaggtcttag agcttcagga ctcaagagt ttgagagga tttttgac tgggcttta 11040
taatttgata gtcataaaat tagaggaac attagtgtt gggataacc caacctcca 11100

```

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

```

ttttatggaa aagaatcatg ggaaaagaga ccaagcgact tgccttagtag gcaggaccaa 11160
agccttcaat taccagabat gggttctgca gggagggggg actgctggcc agtatcttga 11220
aagaactctg gaagagagag aaccaaacaac catgttgcoc tbtgtcctcc agaccctccc 11280
tgacccttaa taccctctac accaggtgga ctacactcct ttatagctcc ccggccoccaa 11340
aaotccatgt tagttttggg gacctatca gtoatcacc agaccctcca gtgttttaga 11400
toatacaag gattcoaaga acggtgctct attcctgaag atgagggtgg agccatcttc 11460
aggaatgggg atagtgggga ggcagttctg ggtcactctc acagcagctc caaaaactctc 11520
gtcctgacaag cctcttccac cctagctgcc ttgaatgggg ctattaggag ggttaagtcta 11580
caaaagcaag gcacactccc ctggccatct tcataacctc ctatccagag ttatagagta 11640
agacaaagca ctgccaaagt ctggaggat gggaaaggagc tttagagctc atcagcaggg 11700
ccttgggctt agctgttttc acccctggcc tccagggacc ctgagctgcr acctctccaa 11760
actcctaatt tctgtttggc aggaaaatct gtggcagctc caagtggtta ttgggtggc 11820
tggctgggtg tgccaagtgc caagttgaga ttgccaggtt ccagggtgta tctttaacct 11880
tgggcagcca taccagggctg ctggctggga gcagctgtc acggttccac tcccccgacc 11940
cccagctccc agtccaaagc tccaagtctg gctcctcatg ccagcagccc tccagaagc 12000
tcttctcatc ttctgggaag gagtctccct ttgagaccag ctttctcaat ccttaatggg 12060
tgactgccc tctcccocat tccaggctcc tggcagagcc ctacccttc cagtgaatat 12120
tctatctcct gatcgggagg actggggagt tcccatbgtt ctgtttgttc ccttcccc 12180
agtgccctg gtctgttttc aggtctctcc ctttttttc actcccaggc ctctctggag 12240
ggagtgaaag tgggatggg ggcctgagtg ggaggggca cagcaggagc tcttcagact 12300
gctcaaacat cacaaccaa ggtatggaaa cacagataa gaaaagaaa gtgttctcc 12360
catttggag gaggcagtg caagagcagt gagacaggtg aggagctgga gtttggagg 12420
tactgtttgg aatgagggga actaacctgt gtgtattgg tagctgttt gggagttag 12480
agctgctctc ttttaggaag ctgttctaga aactgcagc tatgtctggt tttagagctc 12540
gagctggaat tagggagtc ggggtgtatt atgttactct ggtattgggc tctacacgt 12600
attcacagtc atctgggat taaggggggg ctgtgcaat atgggagc tgggttagaa 12660
cttagaggtg tgcctataa caagctgag cactgtaga ggttatbgt gtagcatag 12720
ggctataat aactctggg cctgctgctg attgagact ccagtatgt gacttggctg 12780
taactagagc ggtctagaa ctacaggact gtcttcact ggggctgtg ctttggggag 12840
gaatgtgctg tctggggccc tgggtctctt ctgttctgt gttgaacct gagttagtag 12900
gtgctggctc tctactaggg cctggtatgg tgggtggccc tgtgggcaag ctggctggtc 12960
agtagtgaca atctgtctcc ctgcagttac ctccaccgc cgtccacttc tgggccacca 13020
gcagggccca gtagctgcaag gaaccatccc agcacagtta ctatgacgt ggcctggagg 13080
agcttgagac gcctccagc aagtoactct accagctctc actggttccc ctgcccctg 13140
ctgagatca ctatgagcgc accaccctg atggacatc agggagatg gacaccccc 13200
agaatggtag ggcacagcac catggctcag gcaccccag aatgagtgga agcctgggaa 13260
tggtagcaag gcttaaacaa aatcatctat gtattgagt attatgtgct cagtcatcat 13320
cacctgctg agggcttcca ggtatacag catttaatcc ccagaaccac tctgtgatt 13380
gagaacttta tggcaccac ttacagtg aggaaactga ggttagaga ggttaagta 13440
cttgcocaaa gtcatacatc tagaacgtga cacactggg agggatcaa acccaggttt 13500
ctctgactcc aaagctgttg caatcggcac catgtttaa cggcaccctg ggaacagga 13560
cctgagtggt ggtgagcaga aagctcagct aactgtgag aaacctgag aggtgggtg 13620
gtgtctctct aagttggga agccttgag aatagagat gggcctgga tgcacaggg 13680
ggctcagaga atggagtgac gatatctgg ggtgagagt gggagaggt ttggcactcc 13740
tttaggaag agcgcgtag gagtctggt gaagagaag gcctgtctgg gagggattg 13800
gagggtagct gcaaaaagga ggtgtagccc agcgcagag tcggctcggg aatggatgt 13860
gaggtgtgct gtcagtggt gtgcagtgcc tgtgcatgt tgaagtctc oatggcacc 13920
tgtggagggg gagagtgaac gagctaaccc ctgagatgga aagactctct aagttggagt 13980
tgtccctggg tcccaccac tccctcaact caaagctcc tgcctcccaa aagatggga 14040
ggtttcactc cctgctca ggcacagggc cctgtctaa cctcccagc cctaggtctc 14100
agagtccct caaccccac ccccccctc catgcccgat ctcatccc tctcatctt 14160
tttgtccc cccagagccg gctggccgga gcaggccctg aggcagagtg ccaggtatgt 14220
gggaactgct ctgggtctg ggtctgtg gactctgccc agcaccagc ctaccaccac 14280
cagtgccact gctctgctct gagccatgtt cgttccccca actctgctct gagctgtaga 14340
gcttggcacc tttgaggtt aacaacagag ctgtcccctc ctaccctgg actggcaga 14400
ggcacaagca tagtgggtg tgcccagggga gcccctgtcc caggcagtbl tgcctagcca 14460
tgtccctgg ggtggggg aggtcaactc ctggtctgt cctctgacaa ggcacagca 14520
gggaagctg tgacaggaat tactcatgccc ccagcgttc ccatggagac ccccgctgcc 14580
cagcaactac accgctact gctgatgtca ggcagccaac tctgttccc gtgggtgtc 14640
tggccagggc gctggggcaa ggcacaggggt ggtgctggt ttagggcca gagtgggtg 14700
gggagggct gcatgagct gcttgggat gtgagtggt gcctctatgt gaataccca 14760
caagaagct cgtccctcc cctggcttt aaagcaaggt ctgocaggag gaggtgggt 14820
toaggaccac cggagacatg tgaagctga ggggttctg aaggagcaa tgtaccat 14880
ttcatctgag gataggggtg cccactgtag tagattgtg tatccatgccc tctctgtg 14940
tgtgaggg agagagag agagttgatt gtgtcaatc atccaatgag gatggaggt 15000
tctcaacc cccctgagga tagatttca catttaagtc tgtctggaga tagtgagcc 15060
agtggtgaga tgaatgtgt ttgtgcacc tctctgaggg cagatttgg ggtgtgtaa 15120
gaagagcact gggggtagg tgcagctgga agaatgtgt ctatttagg ctgtgtgct 15180
catgctgta attccaacac tctgggaggg tggagcagc agattgctt aactcaggag 15240

```

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

5

tccaagacca	gacctgggcaa	catggcttaa	accocatctc	tacaaaaaaa	tataaaaaat	15300
tagecaggca	tggtagtgca	tgectatagt	cacagatatt	tggagctctg	aggtggggag	15360
atbtccctgag	ctcgggaaat	tgaggctgca	gtgagccaag	atcacaccac	tgcactccag	15420
octgggtgac	agagtgagaa	ccctgtcttg	aaaaaaaaaa	ggetaagcct	gggtggggtg	15480
gctcaatgct	gtaatcccaa	caacttggga	ggtcaaggtg	ggtggatcac	ctgaggtcag	15540
gagltcaaga	ccagcctggt	caacctgggtg	aaaccaccac	tctactaaaa	atccaaaaat	15600
taaccagata	tgggtggtgg	cgctgtaat	ccagctact	cggtgagctg	aggcaaaaaa	15660
atctctgaa	cccgggaggt	ggaggttgca	gtaagccgag	attgcccact	tgcactccag	15720
ctcgggtgac	aagagcaaga	ctccatctca	aaacaagaa	aaagaaaaag	aaaaagata	15780
gattatgtgt	gtgtgctgtg	agctgtgtac	agtaggccag	taggtcgtatg	gtgggagggc	15840
atrgtctctc	ttaggggtgt	gtgtgctgtg	gagttcagcg	gtcaggaagg	ggcgacactc	15900
octgtctctga	agtggggtgt	agatgcccag	ggagggccat	gaagcagcgc	tttgcagagg	15960
ctgtatgtct	gacaaattgtc	cttcccogct	ccctctaca	acactctgcc	ctttgectga	16020
tgtgcctcatg	acaggccaat	gtaccgggga	gtgcagttag	tttggccact	ctgacacatg	16080
ctgtatgctc	ggcccagtcac	ctcccagccg	ccggaccaag	agcagccccc	tcaactcttc	16140
caacctcgtg	cttaaccagg	accgaggagg	gcaggagcct	gggggcgccg	gcagccccag	16200
ccccccgaaa	gaccggaaca	ccaaaaaggg	ccccgtgccc	ctcctgcccc	ctcaactgac	16260
ctctcccaac	agtagecactg	atctcctgcaa	ggactggccc	accttggagg	aaatccccct	16320
gcccagagac	tgggaacttcc	caaccgacgc	caacccggca	cttgcaccga	cggccaagcg	16380
cgagctctac	ctgtggagccc	cttactggcc	ggccggcccc	octcccccaa	ctgcggccca	16440
gctcccaaat	ggcccatctcc	aggggctcca	ctctccacc	cttcagcctg	gacttccctg	16500
ccaggccccc	aagtgggggt	atcaactgacc	tcaatgaccac	gctggccctt	ctccccatga	16560
gggtccaggt	ctctccccct	catlctccatc	tcccagcccc	caggggcccc	ttccccctta	16620
tggggcttcc	cccagctgat	gcccagaagg	gctcctctgc	aatgactggg	ctccttcccc	16680
tgactccag	ggagcaccccc	ctcagatttg	gcagatgggt	gagtcaaggg	tgggcagcgt	16740
actctaacct	catgttttcc	ctcaatggccg	accagggcgg	ggatagcctg	cccaatttta	16800
gcccagagac	agggctgaaac	tgggtggagc	ctttcccctg	gagctcccag	aggaaactct	16860
tgaccactag	tggctccctg	aaagcttctt	gttaccaaaag	gtgggttagg	gacgggggtg	16920
ggatggagc	ggaggccttg	ttttcccctg	ctgctccctg	actggcccac	ctgctctgca	16980
catgcccacg	ctagctccca	tctgggcccc	catctccctg	tggtctatga	gtgtctgtat	17040
ataagacct	tgaaatgacg	tcccatttcc	tgctgatttt	gcaacttttc	tgtttgatgt	17100
cgatgtgtct	tgggggaccc	ctctgggggg	ggactgccc	tgtgccccct	ctccccctgc	17160
gcagtgcccc	ccaaccaggg	ctctatattg	tccatgttgt	aaataccccct	ggggccatgg	17220
tgggatgggg	gtgcagggcca	gggaacaac	gggtgggttg	gggtggggag	gggggttaaca	17280
tttgcctatc	agcagagctg	ggcttttatt	taatttttct	taaaaataca	aatctctatt	17340
tttttgaac	tgttgccctg	tgcctggggg	ggatccccgc	teaggtggc	ctccccatc	17400
caatgagaca	tcacagaggg	gcccctgagc	tgttgggggc	agctggacag	gggtgggatg	17460
actgtgacct	tggcctggll	gggtgagttg	ggagcaggaa	ggtttgctca	gggggtggct	17520
gggtgtgctc	ccgatatag	ggggcctgca	tctctccccc	tccctgcccc	ctcaaccccc	17580
agccccctgc	atgactgacc	cgtaagcctg	taaaaccacc	attgcccctg	tctcaggggg	17640
tgggagggct	gectcagggc	accctgggct	ccaggcccc	ttcttccagt	tgggctlccc	17700
tttctcaggg	tcaaggggtcc	catgggggag	gggttaggga	ggttgggggg	cagagaagcc	17760
cagtcagcca	tgatgggggtg	aagtctctct	cttccactca	gggggcacag	gtgtaagggg	17820
cgctctcag	agccccctgc	tcccactgtg	gcaactcaaa	agctcagccc	ctcttctctt	17880
ccagaaaccc	ccactgcctt	ggcccatacc	tctccagctc	cttagggggc	caggtgggga	17940
ggctggagac	tcaaggtatg	gcccctgctt	gacttagctc	aagcttgggg	aggtgggtcca	18000
agattccgag	cgggggggtac	aggctgcccg	ctcgtctggt	gctttgggga	gctgtgctgc	18060
tggggtcttg	actcttgtaac	ccagagagac	ccacccccac	cccggaaaag	ccaggggctc	18120
gaaagatcac	ctattttatc	tgccccctac	cccccaactg	gcttgggggtg	acagtgtctag	18180
gaagggagag	atgttttagc	tggtagccct	ggcaacagaa	gcccctctac	agaggggaaag	18240
ggtagaagt	ggatgggggtg	gcagcagcca	ggtctagggg	ttggccaaaag	gctcttctcc	18300
cttggggag	cccaggggat	ggccttgggg	cttgttaag	agacagcccc	tttcccctgc	18360
acaaatgggg	caggtgcaat	agctctggag	ttggttagta	tgggtgccca	gctggtggaa	18420
cagtgccctc	aaggattgtc	ctgggtcctg	gaggtcagga	ttcgggcaag	aagattgtat	18480
gagcccaatt	tgtctgtgtg	agaagtggtt	ccagacagcc	ggcattcctg	gggtcagttg	18540
actcccactg	gaagcccctc	gtggcctggg	tacctgccc	tgtctctaga	gacccttgag	18600
cactgagcag	aagagcagag	ggacattctg	cacaatggag	aagccaggaag	aaagaggggtg	18660
gcccagatgg	ctgggagagc	tggaaagccc	ttcccacag	caagacaga	gcccaccagc	18720
ccctgggtgg	ggccagggca	ctgagctctg	caccaactgg	gcactggaga	gatgaacca	18780
aaggtgggca	gggttggcg	acagcactgg	ggactatccc	tgtgggtctc	aggtctgtga	18840
agcccctccc	caatgectgt	gtcgcgtaca	gttttatgta	ccaatagggc	acatttggcc	18900
agagggagag	ccccctcaaa	cccagcctga	cccagctctg	gtctlccacc	aggggacctta	18960
gtcggctccc	atccccctac	ttcaggggcat	gtctctcctg	agggggaggg	tatatgggga	19020
catattctct	tcttagggctc	cttgaagcat	gtttccactt	ccgggggggg	gggaaattct	19080
ctgggatccc	ctccactctg	gggtctctct	agggccctatc	ctcccccttg	ggagctctccg	19140
gggaaatgt	gttcccctcg	agaccaccgg	ggagctctct	cccccaatca	cccagctctc	19200
ctggagagcc	tgtttctctc	ccagggttcc	tgggagtagt	taaggcaagt	caglltccggg	19260
ccatctctct	tcccagggaa	gggggctatc	tctgaaacac	gtctgggaag	ggatgtttct	19320
ggccctaccc	ccatctctcc	tatgggggtt	tctctgcccc	gcagcacttt	aggtatgagc	19380

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

6

```

tgggeatctc tgaattgtct ttctctctag gagccctggg atacctctct ctcccgaggg 19440
tgggeatctc tgaattgtct ttctctctag gagccctggg atacctctct ctcccgaggg 19500
tgggeatctc tgaattgtct ttctctctag gagccctggg atacctctct ctcccgaggg 19560
tgggeatctc tgaattgtct ttctctctag gagccctggg atacctctct ctcccgaggg 19620
tgggeatctc tgaattgtct ttctctctag gagccctggg atacctctct ctcccgaggg 19680
tgggeatctc tgaattgtct ttctctctag gagccctggg atacctctct ctcccgaggg 19740
tgggeatctc tgaattgtct ttctctctag gagccctggg atacctctct ctcccgaggg 19761

```

```

<210> 2
<211> 2828
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 2
cggggagggt atatactacg cttgaaaaa ccagagggtgc attggtggga tacagacata 60
taggatttgc aaaggatgat ctaagccaa gaacacattt tgctgtgcaa taacsaggtat 120
agaagatbtc ctaaagacc acctgggcaa tgcctcaatt tttagagaat ataaagtgga 180
tgttgagtct atactcataa gaaatttagt actatgaagc cttcttgaag gtaatccctct 240
aaagaataaa cectaagtat cttatccaag agtagtaagg acatatcttg aaagcattat 300
cattaccata cgtacaagcc cctgtcaacc tgggtattgc aatggcagtg tgcctgcatc 360
gataaagtct cctacgtggc atctccagtg gtgacttctc tgccagggta gactgtgta 420
cgatcatgtg ceattgggat gaggtagtct accattatga agaaaagact gtgtctagt 480
eggttttata taggtagggg tacagagtct ctatcgtgtg tagcgggta ggggtcagtg 540
taagggtttt tgggctaac ggtgtcccaa attgggctg tgtttctctt ggttcgtgccc 600
acttcccact gctcctctcc tcccgggaag gggcccggcc cngcccacac caaccctac 660
cctggcgtcg cagacacaa cccgttgatt tgtaagtatt tctgtctctt tctgtctctc 720
tctttctctg acccccacac ccccaccccc acccccctcc acccccggcg gagcatgccc 780
aggcacccgc cctaccctct ccggttcggt tctgttccgg tttgtttgct gagctgtcaa 840
tgaagaaccc gtgtaattat tcccagcctt tacaataaaa gtgtgaaaac cggaccctcc 900
tcagcttctt ccgggtcctc gggcctcgtt cccgtggaga gtgggagcta aatctggagg 960
ccttggagag ggtcggggga cgcaggggac aagagactga gaccgcactt ggtattaatc 1020
ggggctgggt tgggctaac gcttctgag gatagactcc tagtccgtae acctaaagt 1080
gaaccctgcc ggtacctctg ggcctgacct gctgtgggca cccctctccc gcaagaactc 1140
aggttgagga tgggtgggga ggtgaccgca gtagagtttt tctgtctgccc tgccttcttc 1200
cccggcgccc cgcaggagct gcaagctgta ccgggtgtat ccattcccgc tcccactctc 1260
ttggcaacga gtgtgaattg cgggaactga taggataagg ggcgggagac atctgtctgt 1320
ctcccagctt ctcccagctt caggaaacga ggttggaaat cgatttaggg gaaaggaacc 1380
gaaaaggctc cagctcgggt ctcccactgc gctcccctcc cccctccggc gctcgacggg 1440
cccgcctcct ctccgtccgg ctccgggta aacacccgct ccggagaggt cggaaaaacg 1500
agccctgata agccggttcc tggcccggcc tcccgggggg ttgtctctcc ctccgacct 1560
cccaccccc acaccggccc agcctcggcc gcttttggct agaccggcg cctagctccc 1620
taggcccgta ctgtgtgggc ctgcctccgg accccggggt ccgtccagcc gctgggatta 1680
gcccagccga gggactaat ccggatgagc ctctgttaaa cccgatgca cagcggggac 1740
ggcggggggt gctgcaacc ctteatccgt tcccagacc ggagcatcac ggggcataga 1800
gcccaccccc aggcctcttg ctgcttctgg agagaccgga gttggatctg cagtgtgggg 1860
cgttgggggg caggagatga agaaccgtag gcccggatct gaccgcggca gagcctggcg 1920
cgggttgaat ggggtgtgg gccaagagc agagatctct cgggcagtac tgaactctac 1980
cggcttaggt cagctcccta ctcagtctac aaccgaagcc cctacactat cctccagta 2040
cagaatcaca gaccctcccc ctaccagtgg gtgtggaacc cctcctaaa cctgagcct 2100
cactcatta ggaagggccc tgaatcagcg gggggggggc ccgactgtc tcccctctg 2160
acttgacccc acagtgaagg gtgaggagtt cctctctgta aggcctagcc caggaaaaga 2220
tgtctggagt taaggaaagt gggaggatgt tgggtggcca ctgggtacca gaatcctgtc 2280
ctcggctgat taactcattc tacaacacat tccctgagccc ctcccattgt ccagaccggc 2340
acaaggtact gacccccaa aatgacacac agtctctctg gaaaaggcag acaggttaac 2400
aatgaccaca tcttctgttc gggctcctct tagcgggaa attctggcag gggactaaa 2460
ggcctgtctc tctccaaagt ctagaggctt ctggaagggt gtgggtccc agctgagtt 2520
caaaggccaa atgagggata ggtactgag gaagggtca cctctcagg ctgaggagga 2580
gtactgtcca ggtctggag gtggaggagg aggtgaggtg gctcaggagg gcaaggagag 2640
tggagaaga agccaggggc cagaactaag gacctcctg tcaactaaa gtgcttgat 2700
tgaagggttg gagaggacc attacagat ttttagcctg taaaagaaa ggtcagatt 2760
acattctccc agattctgtg ttctccctt cctgcccaca ggttctctg gggatgcctg 2820
ggttggga 2828

```

```

<210> 3
<211> 2717
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

7

```

<400> 3
gcataagcca ctgtgccac ccttaaatc atctttaat gtaggaaat agaatagtg 60
tatttactt ggtccaagc ctccaatga ttagtattc cacagactc ctcttaagt 120
gttgaccagc ccagctccag gccctgaat ctgtatctc agacagtga tcttattta 180
gtgaagcttc tggctctgc atccaggaa gggtaacagg gagaggaaga taacaaggat 240
aagagggaac tatggctga atttaaact tgaataaat bttagaaga ttggagaagt 300
cgtttgctc tttttaagg aaactgcctc aagatagtt gtttatagag ctggatttt 360
ttttctctt atacttctat ccattctccc ctgctcttt tagaggtga tctatccat 420
acaacctga aatgggtga tatlgataa gttgctgat ttggcagtg ataticctg 480
gtgtgtttg gttcttctc tacttatgta tgaatatcat taatatata ttgaatttt 540
tgggtattc ttttgacaaa atctacatc agagacctt aagaaaaatc agaatccaat 600
ctattatagg tacataggg aagaagatt gtaaatagag aactggotta aggcaataa 660
aagttggaat ggttaaagt accttccagt tatcttggt actagtgtg tattttcta 720
agattctgaa agaggataat gagatatga attttagat ttgcaaaaag cacaggttt 780
tctggctgga aaatgtccag ctgaaggtga taattagtat gaatctctc catgggaatg 840
caatagagta agtgaaccac ttggagaaat gtaagtcnaa taagatgta tgcctattc 900
tggctatcc taatgattaa gagtaaaccc tggagctcc ataaactgt tgcctaaagt 960
gccataatct tttctgtat catagtgaat agcaagatga ataaactgt taagagaggt 1020
actttatata gaaatcattc agtctacatc ttgtactagg tgtgaagtg accatttca 1080
ctcttaaaac atttattagt gcttaagaaa atgctagag aaacataat ggaatgagt 1140
atgcctctt aggatctct caacattctt cagtctggaa aggtaaggc caaggaaga 1200
gtatgactaa tgtattagtc catcttgcat tgcctatagag aaactcctg gactgggtaa 1260
ttgttaaga aaagaggttt aattggctca tggttggca ggctatacag gaagcattgc 1320
atgtctgct tctggagagc ctcatccata gaacttttaa tcatggcaga aggcaagggt 1380
gaagcagggc gctctacatg gcaaggagag gttgcccggc ctgtcactt ttaaacagt 1440
ctcatgagaa ctctacata agaatagcac caaagggatg gtgctaacc atctatgag 1500
aatccccccc catgaccag tcaactccca ccagcccaca ctctaacgc tggggattac 1560
aattcgacat gagacttggg tgggaagcaa atccaaatca tacaactaa agttaacaga 1620
atcacgaagt gggcatagtg ttacttggtt tgttgttga tgcctggag cggagggggc 1680
atctctgggt atggaaaga gaaagtcaag ttcattgggt gaattgaaa catgaaatc 1740
tcatactctg aatgtgcat agattttaa aggtttaat aaatgatag atgatagct 1800
catatgaaa ggttaattta aggggtgggg gaactctga atgtcttag gacatgtca 1860
gtaaaggaga gtctcacc ccagagcaca latgtgatc actgtcaga taagggcag 1920
gatgaactgt tatgcttgg aattattggg ttaacttatt gaattgtgac ccatttaag 1980
agtggtctg cttagcgtct tttagcccca ctaactctt ccagctctc attcgacct 2040
ctcttggat tgttttgcta taactgaaa tttgggtgt cacaaacga actgtoact 2100
gtttccgcca aactgtggt ctgctaactc ccaggtgtg cagcattgga gacttctga 2160
ctcttctat ccccaactct ttcaactga aattcctctc ctgggtttg ctctaaagt 2220
tatctctag tcaaggccca accaaatctc actgcctct ttttcatg aagccttga 2280
taactgatag tctctttaa atctgaaaa atacccttc ccagctcagt taatattag 2340
tatctctact catcttggca ctactcaca gctccaatat tcaagtttt tctgacctc 2400
tcattgtgat gggagccct ttggaggtg tgaactgtct ttatactct catgatgct 2460
cacatgtgac aggcattgg tgaagactt ttgaacaga atgtttaa tggcattgg 2520
cctgaggaga tgattgtct gtaactctt ctaaaagtg ttttctct ttgtagttt 2580
catgtggaca aactctctc ggcctatgta taccctgat tacataaggt aactgaatt 2640
aaaactggat tctgacttt tctctgatg atgcatata tcttgttct tatctttgc 2700
aattaaattg ctacag 2717

```

```

<210> 4
<211> 4069
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 4
ctctattcga cactctctt ggattgttt gctataact gaaattggg atgtcaca 60
cgaaactgtc atctgtttc gccaaactgt ggttctgcta atctcccag ctggcagat 120
tggagacttg ctgactctt tcaatcccca ctcttttcca ctgaaattc ttctctggg 180
tttgctctaa gctcatgct tcaagttagg gccaaacaaa tctcactgc tctttttat 240
catgaagcct ttgatcactg atagttctt ttatatctg aaaaatcacc ctctccagta 300
cagttaatat ttgatctct tactcatctt ggcacttaet cacagctca taattcagt 360
ttctctgac ctctctatg tgaatggggag ccttttggg gtggtgactg tgccttaac 420
tctctatgat gctctcactg tggcagggct ggagtgccc gaagcggcc tctgattct 480
ggggcctccc aggatggagc cctgagggca cagccagac cctgggggg aacggctact 540
ctgcccctcc atgctgctag caactgctgt cctgctgct ccactcccag gccacgccc 600
ctgggtagtg tacaaggtgc cggaggaaca gcccccac accctcatt ggagctcgc 660
agccactat ggtttccag atgtggggca cctgtacaag ctagaggtgg gtgccccgta 720
ccttcgctg gatggcaaga cagtgacat tttccacc cagacctca tgcacctga 780

```

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

8

```

ggggctccgt gaatgccaga accagctccc tggatgaccc tgcctcctgg agtttgaggt 840
atctatcaca gacctggtgc agaatgcgag ccccggctg ctgaggggc agatagaagt 900
acaagacalc aatgcaaca caeccaaact cgcctcaact gtctcactc tggcctccc 960
tgagaacacc aacatcggct cactctccc catcccgct gcttcagacc gtgatgctgg 1020
tcccacgggt gtggcatcct atgagctgca ggtggcagag gaccagagg agaaagcaacc 1080
acagctcait gtgatgggca acctggaccg tgagcgtgg gactcctatg acctcaacc 1140
caaggtgcag gatggcgca ccccccaag cgccacagat gccttgctgc gtgtcaaccg 1200
gcttgacacc aatgcaaacg ccccgaagt tgagcggccc tctatgagg cgaactatc 1260
tgagaatagc cccataggcc actcggctcat ccaggtgaag gccaatgact cagacaagg 1320
tgccaatgca gaatcgaat acacatccca ccagcgcgc gaagtgtga ggcgtctct 1380
tcgatggac aggaacactg gacttatcac tggtagggc ccggtggac gtgaggacct 1440
aagcaacctg cgtcttcaag tgcctgtcaa ggaccagag cccaacca agagtgcacc 1500
tgcccagggt gttgtgacog tgaaggacat gaatgacaat gcccccacca ttgagatccg 1560
gggcataggc ctgagtactc atcaagatgg gatggtaac atctcagagg atgtggcaga 1620
ggagacagct gtggccctgg tgcaggtgtc tgaccgagat gaggagaga atgcagctgt 1680
caactgtgtg gtggcaggtg atgtgccctt ccagctgcgc caggccagtg agacaggcag 1740
tgacagcaag aagaagtatt tccctgcagac taccaccccg ctgactcac agaaagtcaa 1800
agactaaccc attgagatgg tggctgtgga ctctggcaac ccccactct ccagactaa 1860
ctcccacag gtgaggtgg tggacgtcaa tgacaagca cctgtctca ctacagatgt 1920
cactgaggtc gcttcccg aaacaacaa ccctgtgaa gtgattgtg agatacctg 1980
cagtgatgct gactctggct ctaatgtga gctggttac tctcggagg ctgagccggc 2040
tgtaagggc ctctcacca tctcaccga gactggagag atccagtgga agacatctct 2100
ggatcgggaa cagcgggaga gctatgagtt gaagtgtgt gcagctgacc ggggcagctc 2160
tagctccag ggcacagcca ctgtcctgt caatgtcgt gactgcaatg acaatgacc 2220
caaatctatg ctgagtgctt acaactctct agtgatggag aacatgcag cactgagctc 2280
agtggatg gtgacttca ttgatggaga caagggggg aatggccag ttgagctctc 2340
agtggagcag gacaacgggt actttgttat ccgaatggc acaggcca tctatccag 2400
ctgagcttca gatcgagac aacaagcac ctacacctc cagctgaag cagtgatgg 2460
tggctgccc cctcctcag cttaactgg tgcaccatc aatgtgtgg acgagaatga 2520
caacgaccc tatatcactg cccctctaa cactctcac aagctgctga cccccagac 2580
acgtcttgt gagacggtoa gccaggtggc agccagggac ttgactctg gtgtcaatg 2640
cgagctgac tacagcaatg caggtggcaa cctctatgga ctcttccaga ttgggtcaa 2700
tccaggtgct atcccctgg agaaagagat tgagcgcgc caactgggc taactgctc 2760
gctggtagag gtcagtgacc ggcgaagcc ccacgctat ggcaagcct tggctcactc 2820
ttatgccaat gagactctgg ccaaccgac gctcgtggag acctcctg gccaagcct 2880
ggacaccccg ctggatatg acattgctgg ggtccagaa tatgagcct ccaagcagc 2940
tggcaacatt ctcttgggtg tgggtgctgg tgtggtggc gtggcctgc tcaatgcctc 3000
ggcgttcttt gtgcgctact gcagacagcg ggagccaaa agtggttacc aggtggtaa 3060
gaggagacc aaggactgt atgccccaaa gccagtgcc aaggctcca agggaaacaa 3120
aagcaaaaggc aagaagagca agtccccaaa gccctgaaag ccagtggagg acgaggtga 3180
ggccggctg cagaagtccc tcaagtcaa cctgatgagc gatgcctg gggacgtcc 3240
cgcataccc ctgcccctca actaccacc aggcagcct gacctggcc gccactatc 3300
ctctaactcc caactgcctt ccatccagct gcagccccag tcacctcag cctcaagaa 3360
gcaccaggtg gtaacggacc tgccacctgc aaacacatc gtgggcacc gggacaccac 3420
gtccacgggc tctgagcagt actccgacta cagctaccgc accaaccctc ccaataacc 3480
cagcagcagc gtagggcagc ccttcagct cagcaaccc cagccctac cccaccctca 3540
ccacgagcc atctggacog aggtgtggga gtgatggag aggttactg tgctgccc 3600
tgttggggc cagctgagc cagcagtggt agtggggcc ttagtgcctc accgggaca 3660
cggataggc tgagtgaaga ttaagggagg gttgctgt tggctctc cctgcctct 3720
ccccactggg gagagacctg tgatttgca agtccctgga cctggacca gctactggc 3780
cttatgggtt ggggtggta ggcagtgag cgttaagtg gagggaaat ggttaagat 3840
ctactccaaa cctaggtctc tatgtcagac cagacctagg tgctctcta ggaggaaac 3900
agggagacct gggctcctgt ggaataactga gtggggagt tgcagggga gggcacctc 3960
ccaltgtccc tctgtgtgt atgtgcaat aacctctcc tcaccactag gctctgggg 4020
ctgggtccca catgccttg acctgacaa taaagtctc tatttttg 4069

```

```

<210> 5
<211> 4649
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 5
ctctatcga cattctcttt gggattgttt gctataactt gaaattggg atgtcaaaa 60
cgaaactgtc atctgtttcc gccaaactgt ggttctgcta atctccagg ctggcagcat 120
tggagactgt ctgacttctt tcatccccc ctcttttca ctgaaattcc tttcttgg 180
tttctctaa gtctatgct tcagctagg gccaacaaa tctcactgct tctctttat 240
catgagcct ttgatcactg atagtcttt ttatatctg ttaataccc cttccagta 300
cagttaatat ttgatctc tactcatctt ggcactta ctcaagctca taattcag 360

```

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

tttctctgtac	cttcttcacatg	tgatggggag	ccctttggag	gtgggtgactg	tgctttatac	420
ttctctcatgat	gctttcacatg	tgagcaggct	ggagtcgccc	gaggcggccc	ttctgatict	450
ggggcctccc	agatggagc	ccctgagca	cagcccagc	ctagggggc	aacctctact	540
ctgcccctcc	atctgctag	cactgctgct	ctgctggct	ccatcccag	gocaccgcc	600
tcgggtatgtg	tacaaggtgc	cgagggaca	gcccccacc	accctcattg	ggagcctcgc	660
agccgactat	ggttttccag	atgtggggca	ctgtacaag	ctagaggtgg	gtgcccctga	720
ccttcgcgtg	gatggcaaga	cagggtgcat	tttaccacc	gagacctcca	tcgacctga	780
ggggctccgt	gaatcccaga	accagctccc	tggtgatccc	tgcatcctgg	agtttgaggt	840
atctatcaaca	gactctgtgc	agaatggcag	ccccggcgtg	ctagagggcc	agatagaagt	900
acaagacatc	aatgacaaca	cacccacct	cgcttaccca	gctatcactc	tgccatccc	960
tgagaaacc	aaatcggct	cactctccc	catcccctg	gottccagcc	gtgatgctgg	1020
ttcccacggg	gtggcatcct	atgagctgca	gggtgcagag	gaccagagg	agaagcaacc	1080
acagctcatt	gtgatggcca	acctggaccg	tgagcgtcgg	gactcctatg	acctcaccat	1140
caaggtgcaag	gatggcggca	gcccccaag	cgccacgagt	gcccctgctc	gtgtcaccgt	1200
gcttgacacc	aatgacaacg	cccccaagtt	tgagcggccc	tccatgaggg	cgcactatc	1260
tgagaatagc	cccataggcc	actcggctcat	ccaggtgaag	gccatgact	cgaccacaag	1320
tgccaatgca	gaaatcgaat	acacattcca	ccaggcggcc	gaagtgtga	ggcgtctct	1380
tcgactggac	aggaacactg	gacttaccca	tggtccaggg	cggttgacc	tgaggacct	1440
aaagaccctg	cgctctctag	tgctgtctaa	ggaccggggc	acaaaccca	agagtcggc	1500
tgcccacggg	gttgtgaccg	tgaaagacat	gaatgacaat	gccccacca	ttgagatcg	1560
gggcataagg	ctagtcatc	atcaagatg	gatggctaac	atctccaggg	atgtggcaga	1620
ggagcaagct	gtggccctgg	tgacgggtc	tgaccagatg	gaggagaga	atgcagctgt	1680
ccactgtgtg	gtggcaggty	atgtcccctt	ccagctggc	caggccagt	agacaggcag	1740
tgacagcaag	aaagaagtatt	tcctgcagac	taaccaccgg	ctagactacg	agaaggtcaa	1800
agactacaac	atgagatgt	tggtctgtga	ctctggcaac	ccccactct	ccagcactaa	1860
ttccctcaag	gtgcaggtgg	tgatggaga	caagggggag	aatgcccagg	tgccgtcttc	1920
cactgagctc	gactctccgg	acttgttat	ccagaatgc	aaagccaca	tcctatccag	1980
cagtgatgct	gactctggct	ctaagtctga	gctggtttac	tcctctggag	ctgagccggc	2040
tgcttaaggc	ctcttcaaca	ttccaccoga	gactggagag	atccagtgga	agacat.ctct	2100
ggatcgggaa	cagcgggaga	gctatgagtt	gaagtggtg	gcagctgacc	ggggcagctc	2160
tagectccag	ggcacagcca	ctgtccttgt	caatgtgctg	gaclgcaatg	acaatgacc	2220
aaatltatg	ctgagtgct	acaacttctc	agtgatggag	aaatgcccag	cactgagctc	2280
agtgggcatg	gtgactgtca	gtgactgtga	caagggggag	aatgcccagg	tgccgtcttc	2340
agtgagcag	ggacaaggtg	acttgttat	ccagaatgc	aaagccaca	tcctatccag	2400
ctgagcttt	gatcgagagc	aaacaagcac	ctacacctc	cagtggaag	cagtgagtg	2460
tgggctccca	ctcgtctcag	cttaactgtg	tgtaaccatc	antgtctgg	acgagatga	2520
caagcagccc	tatatcatctg	ccccctctaa	caactctcac	aatgtctgga	ccccccagac	2580
acgtcttggg	gagacggta	gccaggtggc	agccgaggac	tttgactctg	gtgtcaalgc	2640
cgagctgac	tacagcattg	cagggtggca	cccttatgga	ctcttccaga	ttgggtcaaca	2700
ttcaggtgcc	atocacctgg	agaagggagat	tgagcggcgc	caccatgggc	tacaccggct	2760
gggtggcaag	gtccagtgac	ggcagcaagc	cccccgctat	ggcagagct	tggtccactc	2820
ttatgtcaat	gagactctgg	ccaaacgca	gctgctggag	acctctctg	ggcacagctc	2880
ggacaagccg	ctggatattg	acattgctgg	ggatccagaa	tatgagcct	ccaagcagcg	2940
tgccaacatt	ctctttgtgtg	tggtggctgg	tggtggctgg	gtggccttgc	tcactgccc	3000
ggcggttctt	gtgctctact	gcagacagcg	ggaggccaaa	agtggttacc	aggtggtaa	3060
gaagggagacc	aaggacctgt	atgcccccaa	gccccatggc	aaggctcca	agggaaacaa	3120
aagcaaggc	aagaagagca	agtccccaaa	gccccgtgaag	ccagtgagg	acgagatga	3180
ggccgggctg	cagaagctccc	tcaagttcaa	ctgctgagc	gatccccctg	gggacagctc	3240
ccgcalccac	ctgcccctca	actaaccaac	agggagcct	gactggggc	gcccactatg	3300
ctctaacctc	ccactgcoctt	ccatccagct	gcagcccag	tcacctccag	ctccaagaa	3360
gcccaggtg	gtaccggacc	tgcccactgc	aaacacattc	gtgggcccgc	gggacaccac	3420
gtcccagggc	ctctgagcagt	actccgacta	cagctaccgc	accaaccccc	ccaaatacc	3480
cagcaagcag	ttacctcacc	gcccgtcac	cttctggcc	accagccagg	cccaggagct	3540
caggcaacca	tcccagcaaca	gttactatga	cagtggcctg	gaggagtctg	agacgcctc	3600
cagcaagtea	tctcaggggc	ctcgaactcg	ttcccctggcc	ctgcoctgag	atcaactatga	3660
gcgcccacc	ctgtatggca	gcalagagaga	gatggagcac	cccagaaatg	acctctgccc	3720
tttgcctgat	gtgcccataga	caggcaatg	baocggggag	tgcaatgag	ttggcaactc	3780
tgacaatgc	tggaatcctg	gcaatcactc	tcccagcccg	cgagcaaga	gcagcgcctc	3840
caaaactctc	accttcatgc	cttaaccagga	ccgaggagg	caggagcctg	cgggcggcgg	3900
cagcccagcc	ccccgggaag	accggaacac	caaaacggcc	cccgtgcgct	tcctgcccctc	3960
ctacagtgcc	ttctcccaca	gtagccatga	ttcctgcaag	gactcggcca	ccttgagga	4020
aatccccctg	accagacact	cggacttccc	accgcagcc	acaocggcat	ctgcccagac	4080
ggccaagcgc	gagatctacc	tgtagacc	ctactggccg	gccccctcc	cccagcgcg	4140
gcccagctccc	aaatgcccact	tccagggct	cacltccac	ccctccagc	tgactctct	4200
gcccagggccc	aaatgcccact	atcaactgacc	tcacagccca	ggggcccctt	cccctttatg	4260
gggtccaggt	ccctcctcct	caattccatc	tcctctgcaa	tgactgggct	cttccctctg	4320
gggttctccc	cagctgatgc	ccaagagggc	tcctctgcaa	tgactgggct	cttccctctg	4380
acttccaggc	agcaccctct	cgatttgggc	agatgggtga	gtcaagggtg	ggcagcgtac	4440
tctcaactca	tgttttccct	catggccgac	caggcggggg	atagcatgcc	caattttlag	4500

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

10

```

cctgaagcag ggcctgaactg gggagccct ttcctggga gctcccagag gaaactcttg 4560
accacagtg gctccctgaa ggcctttgt taccaaaggt ggggtaggga cgggggtggg 4620
agtggagcgg aggccttgtt ttcccgtag

```

```

<210> 6
<211> 4684
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 6
ctctattcga cactctcttt ggattgtttt gctataactt gaaatttggg atgtccaaaa 60
cgaactgttc atctgtttcc gccaaactgt ggttctgcta atctcccagg ctggccagcat 120
tggagacttg ctgactcttt tcaatccccca ctcttttccac ctgaaatccc ttctcttggg 180
tttgctctaa gtccctatgct tcaagtcagg gccaaacaaa tctcaactgcc tctcttttat 240
cattgaagcct ttgatcactg taactcatott ggcacttact cacagctcca taaltccagt 300
cagttcaatat ttgatctctc taactcatott ggcacttact cacagctcca taaltccagt 360
ttctctgtac ctctctatgg tgatggggag cctcttggag gbgttgactg tgccttatac 420
tctctatgat gcttcacatg tggcagggcg gtagtgcccg gagggggccc tctgtattct 480
ggggcctccc aggatggagc cctgaggca cagcccaggc cctggggggc aacgctact 540
gtgcccctcc atgtctctag cactgctgct cctgtggctt ccatccccag gccacgccac 600
tcgggtagtg tacaaggtgc cggaggaaca gccacccaac acctcatg ggagcctcgc 660
agccgactat ggttttccag atgtggggca cctgtacaag ctgagagtgg gtgccccgta 720
ccttcgctg gatggcaaga cagggtgacat ttccaccacc gagacctcca tcgacctgta 780
ggggctccgt gaatgcgaga accagctccc tgggtatccc tgcatctcgt agtttggagt 840
atctatccaa gactctgtgc agaatggagc ccccggctg ctgagggccc agalagaagt 900
aooagacatc aatgacaaca ccccactt cgctccacca gctgatctc tggccatccc 960
tgagaacacc aacatcggt cactcttccc catcccctgt gcttcagacc gtgatgctgt 1020
tcccacagtg gtggcactct atgagctgca ggtggcagag gaccaggagg agaagcaacc 1080
acagctcaat gtgctgggca acctggaccg tgagcgttgg gactcctatg acctcaacc 1140
caagggtgag gatggcgga gcccccacag cggccacagt cccctgctgc gtgtaacct 1200
gcttgacacc aatgacaagc ccccacagtt tgagggccc tctatgagg ccgaactatc 1260
tgaatagtc ccaataggcc actccgtcac ccaggtgag gccaatgact cagaccaggt 1320
tgcacatgca gaatcgaaat acacatttcc caaggccccc gaagtgtgga ggcctgtct 1380
tcgactgac aggaacactg gaattatcac ttttcaggc ccggtggacc tggagacct 1440
aagaccctg cgcttctcag tgettcttaa ggaccagagc accaacccca agagtcccc 1500
tgcccagtg gtgtgacgc tgaaggacat gaatgacaat gcccccacca tggagatccg 1560
gggcataggg ctagtactc atcaagatgg gatggctaac atctcagagg atgtggcaga 1620
ggagacaact gtggcccttg tgcaggtgct tgaccagatg gagggagaga atgcagctg 1680
cactgtctgt gtggcagtg atgtccctt ccagctgccc caggccagt agacaggcag 1740
tgaacagaa agaaagtatt tctctgagac taccaccccc ctgactacc agaaagctca 1800
agactacacc attgagatg tggctgtgga ctctggcaac ccccactct ccagactaa 1860
ctcccagag gtgcaggtgg tggacgtcaa tgacaagcga cctgtctca ctcagagtgt 1920
cactgagctc gcttcccgg aaaaacaaa gctgtgtgaa gctgattgct agatcactgc 1980
cagtgtact gactctgctt ctaatgctga gctggtttac tctctggagc ctgagccggc 2040
tgctaaaggg ctcttccaca tctcaccga gactggagag atccagtgga agacatctct 2100
ggatcgggaa cagcgggaga gctatgagtt gaagtggtg gcagctgacc ggggcagttc 2160
tagctccag ggcacagcca ctgtcttct caatgtgctg gactgcaatg acaatgacc 2220
caaatctat ctgagtgctt acaactcttc agtgtatgg aacatgcaag cactgagctc 2280
agtggcctg gtgactgtca ttgatggaga caagggggg aatgcccagg tgcagctct 2340
agtggagcag gaacaagggt actttgttat ccagatggc acagggacca tctatccag 2400
cctgagcttt gatcgagagc acaaaagcac ctacacctc cagctgaag cagtggatgg 2460
tggctccca cctcgtcag cttaacttgg tglcaccct aatgtgctg acgagatga 2520
caacgcaacc tatatactg ccccttctaa cccctctcac aagctgctga ccccacagc 2580
acgtctctgt gacagctca gccaggtggc agccagagac tttgactctg gtgtcaatgc 2640
cgagctgac tacagatg caggtggcaa cccctatgga ctctccaga ttgggtcaea 2700
ttcaggtgcc atcaacctg agaaaggat tgagggggc caccatgggc taacacggct 2760
gggtggtaag gtcagtgacc cggcgaagc cccacgctat ggcacggct tggctcact 2820
ttatgtcaat gagactctgg ccaaccgac gctgctggag acctctctg gccacagct 2880
ggacaagccc ctgatatgt acatlgctg ggatccagaa tatgagcct ccaagagcg 2940
tggcaacatt ctcttgggt tgggtgctgg tgtggtggcc gtggccttg tcatcgccct 3000
ggcggctctt gtcgctact gcagacagcg gggggcaaaa agtggttacc aggtggttaa 3060
seagagagcc aaggaactgt atgcccctaa gccacgtggc aaggctcca agggaaacaa 3120
aagcaagcc aagaagaca agtcccctaa gccctgaa ggcagtgagg acyaggatga 3180
ggccggctg caaagctcc tcaagttcaa cctgatggc gatgencctg gggacagctc 3240
ccgatccac ctgcccctca actaccacc aggcagccct gactgggccc gceactatcg 3300
ctctaactcc ccaactgctt ccatccagct gcagcccagc tcaacctcag cctccaagaa 3360
gcaccaggtg gtacaggacc tgcaccctgc aaacacattc gtgggcaacc gggacacacc 3420
gtccacgggc tctgagactt actccgacta cagctacccg accaaccccc ccaaatcccc 3480

```

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

11

```

cagcaagcag ttaectcacc gccgcgtcac cttctcggcc accagccagg cccaaggagct 3540
gcaggagcca tcccagcaca gttactatga cagtggcctg gaggagcttg agacgcgcgc 3600
cagaagta tcccagggc ctgactcggc tccctcggcc ctgactgagc atcaactatga 3660
ggcaccacc cctgatggca gcataggaga gatggagcac cccgagaatg acctctgcc 3720
tttgcctgat gtcgccatga caggcacatg taccggggag tgcaatgagt ttggccactc 3780
tgacacatgc tggatgcctg gccagtcac tcccagccgc cggaccaaga gcagcgcctc 3840
caactctccc accttcacgc cttaccagga ccgaggaggg caggagcctg cgggcgcggg 3900
cagccccagc cccccggaag accggaacac caaacggccc cccgtgcgcc tctgcctc 3960
ctacagtccc ttotcccaca gtagccatga ttctcgaag gactcgycca ccttggagga 4020
aatccccctg acccagacct cggactctcc acccgcagcc acaccggcat ctgcccagac 4080
ggccaagcgc gagatctacc tgtgagccc ctactggcgc gcccccctcc cccagcgcg 4140
gcaagctccc aatgcccact tccagggcct cactctccac cccctcagcg tggactctct 4200
gccagggccc aagtgggggt atcactgacc tcatgaccac gctggcctt ctccatgca 4260
gggtccaggt cctctcccct catttccatc tcccagccca ggggcctct ccccttatg 4320
ggcttcccc agctgatgcc caagagggtc ctctgcaatg actgggctcc tcccctgac 4380
ttccaggagc caccctctcg atbtgggcag atggtggagt caagggctgg cagcgtactt 4440
ctaactcatt gtttcccctca tggcccagcca gggcggggat agcatgccca acttttagccc 4500
tgaagcaggg tgaactgggg agccccttcc cctgggagct cccagagaaa actcttgacc 4560
accagtggt cccgaaagg cttttgttac cccctcgggt tgggttcggt tccggtttgt 4620
ttgctgagct gccaatgaaa gacccgtgta attattcccg agctttacaa taaaagtgtg 4680
aaaa

```

```

<210> 7
<211> 1065
<212> FRQ
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 7
Met Val Met Gly Ser Pro Leu Glu Val Val Thr Val Leu Tyr Thr Pro
1 5 10 15
His Asp Ala Ser His Val Ala Gly Val Glu Cys Pro Glu Ala Ala Leu
20 25 30
Leu Ile Leu Gly Pro Pro Arg Met Glu Pro Leu Arg His Ser Pro Gly
35 40 45
Pro Gly Gly Gln Arg Leu Leu Pro Ser Met Leu Leu Ala Leu Leu
50 55 60
Leu Leu Leu Ala Pro Ser Pro Gly His Ala Thr Arg Val Val Tyr Lys
65 70 75 80
Val Pro Glu Glu Gln Pro Pro Asn Thr Leu Ile Gly Ser Leu Ala Ala
85 90 95
Asp Tyr Gly Phe Pro Asp Val Gly His Leu Tyr Lys Leu Glu Val Gly
100 105 110
Ala Pro Tyr Leu Arg Val Asp Gly Lys Thr Gly Asp Ile Phe Thr Thr
115 120 125
Glu Thr Ser Ile Asp Arg Glu Gly Leu Arg Glu Cys Gln Asn Gln Leu
130 135 140
Pro Gly Asp Pro Cys Ile Leu Glu Phe Glu Val Ser Ile Thr Asp Leu
145 150 155 160
Val Gln Asn Ala Ser Pro Arg Leu Leu Glu Gly Gln Ile Glu Val Gln
165 170 175
Asp Ile Asn Asp Asn Thr Pro Asn Phe Ala Ser Pro Val Ile Thr Leu
180 185 190
Ala Ile Pro Glu Asn Thr Asn Ile Gly Ser Leu Phe Pro Ile Pro Leu
195 200 205
Ala Ser Asp Arg Asp Ala Gly Pro Asn Gly Val Ala Ser Tyr Glu Leu

```


WO 03/008640

PCT/EP02/07847

13

580 585 590
 Gly Ser Pro Ser Leu Gln Gly Thr Ala Thr Val Leu Val Asn Val Leu
 595 600 605
 Asp Cys Asn Asp Asn Asp Pro Lys Phe Met Leu Ser Gly Tyr Asn Phe
 610 615 620
 Ser Val Met Glu Asn Met Pro Ala Leu Ser Pro Val Gly Met Val Thr
 625 630 635 640
 Val Ile Asp Gly Asp Lys Gly Glu Asn Ala Gln Val Gln Leu Ser Val
 645 650 655
 Glu Gln Asp Asn Gly Asp Phe Val Ile Gln Asn Gly Thr Gly Thr Ile
 660 665 670
 Leu Ser Ser Leu Ser Phe Asp Arg Glu Gln Gln Ser Thr Tyr Thr Phe
 675 680 685
 Gln Leu Lys Ala Val Asp Gly Gly Val Pro Pro Arg Ser Ala Tyr Val
 690 695 700
 Gly Val Thr Ile Asn Val Leu Asp Glu Asn Asp Asn Ala Pro Tyr Ile
 705 710 715 720
 Thr Ala Pro Ser Asn Thr Ser His Lys Leu Leu Thr Pro Gln Thr Arg
 725 730 735
 Leu Gly Glu Thr Val Ser Gln Val Ala Ala Glu Asp Phe Asp Ser Gly
 740 745 750
 Val Asn Ala Glu Leu Ile Tyr Ser Ile Ala Gly Gly Asn Pro Tyr Gly
 755 760 765
 Leu Phe Gln Ile Gly Ser His Ser Gly Ala Ile Thr Leu Glu Lys Glu
 770 775 780
 Ile Glu Arg Arg His His Gly Leu His Arg Leu Val Val Lys Val Ser
 785 790 795 800
 Asp Arg Gly Lys Pro Pro Arg Tyr Gly Thr Ala Leu Val His Leu Tyr
 805 810 815
 Val Asn Glu Thr Leu Ala Asn Arg Thr Leu Leu Glu Thr Leu Leu Gly
 820 825 830
 His Ser Leu Asp Thr Pro Leu Asp Ile Asp Ile Ala Gly Asp Pro Glu
 835 840 845
 Tyr Glu Arg Ser Lys Gln Arg Gly Asn Ile Leu Phe Gly Val Val Ala
 850 855 860
 Gly Val Val Ala Val Ala Leu Leu Ile Ala Leu Ala Val Leu Val Arg
 865 870 875 880
 Tyr Cys Arg Gln Arg Glu Ala Lys Ser Gly Tyr Gln Ala Gly Lys Lys
 885 890 895
 Glu Thr Lys Asp Leu Tyr Ala Pro Lys Pro Ser Gly Lys Ala Ser Lys
 900 905 910
 Gly Asn Lys Ser Lys Gly Lys Lys Ser Lys Ser Pro Lys Pro Val Lys
 915 920 925
 Pro Val Glu Asp Glu Asp Glu Ala Gly Leu Gln Lys Ser Leu Lys Phe
 930 935 940
 Asn Leu Met Ser Asp Ala Pro Gly Asp Ser Pro Arg Ile His Leu Pro

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

15

Ala Ser Asp Arg Asp Ala Gly Pro Asn Gly Val Ala Ser Tyr Glu Leu
210 215 220

Gln Val Ala Glu Asp Gln Glu Glu Lys Gln Pro Gln Leu Ile Val Met
225 230 235 240

Gly Asn Leu Asp Arg Glu Arg Trp Asp Ser Tyr Asp Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Val Gln Asp Gly Gly Ser Pro Pro Arg Ala Thr Ser Ala Leu Leu Arg
260 265 270

Val Thr Val Leu Asp Thr Asn Asp Asn Ala Pro Lys Phe Glu Arg Pro
275 280 285

Ser Tyr Glu Ala Glu Leu Ser Glu Asn Ser Pro Ile Gly His Ser Val
290 295 300

Ile Gln Val Lys Ala Asn Asp Ser Asp Gln Gly Ala Asn Ala Glu Ile
305 310 315 320

Glu Tyr Thr Phe His Gln Ala Pro Glu Val Val Arg Arg Leu Leu Arg
325 330 335

Leu Asp Arg Asn Thr Gly Leu Ile Thr Val Gln Gly Pro Val Asp Arg
340 345 350

Glu Asp Leu Ser Thr Leu Arg Phe Ser Val Leu Ala Lys Asp Arg Gly
355 360 365

Thr Asn Pro Lys Ser Ala Arg Ala Gln Val Val Val Thr Val Lys Asp
370 375 380

Met Asn Asp Asn Ala Pro Thr Ile Glu Ile Arg Gly Ile Gly Leu Val
385 390 395 400

Thr His Gln Asp Gly Met Ala Asn Ile Ser Glu Asp Val Ala Glu Glu
405 410 415

Thr Ala Val Ala Leu Val Gln Val Ser Asp Arg Asp Glu Gly Glu Asn
420 425 430

Ala Ala Val Thr Cys Val Val Ala Gly Asp Val Pro Phe Gln Leu Arg
435 440 445

Gln Ala Ser Glu Thr Gly Ser Asp Ser Lys Lys Lys Tyr Phe Leu Gln
450 455 460

Thr Thr Thr Pro Leu Asp Tyr Glu Lys Val Lys Asp Tyr Thr Ile Glu
465 470 475 480

Ile Val Ala Val Asp Ser Gly Asn Pro Pro Leu Ser Ser Thr Asn Ser
485 490 495

Leu Lys Val Gln Val Val Asp Val Asn Asp Asn Ala Pro Val Phe Thr
500 505 510

Gln Ser Val Thr Glu Val Ala Phe Pro Glu Asn Asn Lys Pro Gly Glu
515 520 525

Val Ile Ala Glu Ile Thr Ala Ser Asp Ala Asp Ser Gly Ser Asn Ala
530 535 540

Glu Leu Val Tyr Ser Leu Glu Pro Glu Pro Ala Ala Lys Gly Leu Phe
545 550 555 560

Thr Ile Ser Pro Glu Thr Gly Glu Ile Gln Val Lys Thr Ser Leu Asp
565 570 575

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

16

Arg Glu Gln Arg Glu Ser Tyr Glu Leu Lys Val Val Ala Ala Asp Arg
 580 585 590
 Gly Ser Pro Ser Leu Gln Gly Thr Ala Thr Val Leu Val Asn Val Leu
 595 600 605
 Asp Cys Asn Asp Asn Asp Pro Lys Phe Met Leu Ser Gly Tyr Asn Phe
 610 615 620
 Ser Val Met Glu Asn Met Pro Ala Leu Ser Pro Val Gly Met Val Thr
 625 630 635 640
 Val Ile Asp Gly Asp Lys Gly Glu Asn Ala Gln Val Gln Leu Ser Val
 645 650 655
 Glu Gln Asp Asn Gly Asp Phe Val Ile Gln Asn Gly Thr Gly Thr Ile
 660 665 670
 Leu Ser Ser Leu Ser Phe Asp Arg Glu Gln Gln Ser Thr Tyr Thr Phe
 675 680 685
 Gln Leu Lys Ala Val Asp Gly Gly Val Pro Pro Arg Ser Ala Tyr Val
 690 695 700
 Gly Val Thr Ile Asn Val Leu Asp Glu Asn Asp Asn Ala Pro Tyr Ile
 710 715 720
 Thr Ala Pro Ser Asn Thr Ser His Lys Leu Thr Pro Gln Thr Arg
 725 730 735
 Leu Gly Glu Thr Val Ser Gln Val Ala Glu Asp Phe Asp Ser Gly
 740 745 750
 Val Asn Ala Glu Leu Ile Tyr Ser Ile Ala Gly Gly Asn Pro Tyr Gly
 755 760 765
 Leu Phe Gln Ile Gly Ser His Ser Gly Ala Ile Thr Leu Glu Lys Glu
 770 775 780
 Ile Glu Arg Arg His His Gly Leu His Arg Leu Val Val Lys Val Ser
 785 790 795 800
 Asp Arg Gly Lys Pro Arg Tyr Gly Thr Ala Leu Val His Leu Tyr
 805 810 815
 Val Asn Glu Thr Leu Ala Asn Arg Thr Leu Leu Glu Thr Leu Leu Gly
 820 825 830
 His Ser Leu Asp Thr Pro Leu Asp Ile Asp Ile Ala Gly Asp Pro Glu
 835 840 845
 Tyr Glu Arg Ser Lys Gln Arg Gly Asn Ile Leu Phe Gly Val Val Ala
 850 855 860
 Gly Val Val Ala Val Ala Leu Leu Ile Ala Leu Ala Val Leu Val Arg
 865 870 875 880
 Tyr Cys Arg Gln Arg Glu Ala Lys Ser Gly Tyr Gln Ala Gly Lys Lys
 885 890 895
 Glu Thr Lys Asp Leu Tyr Ala Pro Lys Pro Ser Gly Lys Ala Ser Lys
 900 905 910
 Gly Asn Lys Ser Lys Gly Lys Lys Ser Lys Ser Pro Lys Pro Val Lys
 915 920 925
 Pro Val Glu Asp Glu Asp Glu Ala Gly Leu Gln Lys Ser Leu Lys Phe
 930 935 940

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

17

Asn Leu Met Ser Asp Ala Pro Gly Asp Ser Pro Arg Ile His Leu Pro
 945 950 955 960
 Leu Asn Tyr Pro Pro Gly Ser Pro Asp Leu Gly Arg His Tyr Arg Ser
 965 970 975
 Asn Ser Pro Leu Pro Ser Ile Gln Leu Gln Pro Gln Ser Pro Ser Ala
 980 985 990
 Ser Lys Lys His Gln Val Val Gln Asp Leu Pro Pro Ala Asn Thr Phe
 995 1000 1005
 Val Gly Thr Gly Asp Thr Thr Ser Thr Gly Ser Glu Gln Tyr Ser Asp
 1010 1015 1020
 Tyr Ser Tyr Arg Thr Asn Pro Pro Lys Tyr Pro Ser Lys Gln Leu Pro
 1025 1030 1035 1040
 His Arg Arg Val Thr Phe Ser Ala Thr Ser Gln Ala Gln Glu Leu Gln
 1045 1050 1055
 Asp Pro Ser Gln His Ser Tyr Tyr Asp Ser Gly Leu Glu Ser Glu
 1060 1065 1070
 Thr Pro Ser Ser Lys Ser Ser Ser Gly Pro Arg Leu Gly Pro Leu Ala
 1075 1080 1085
 Leu Pro Glu Asp His Tyr Glu Arg Thr Thr Pro Asp Gly Ser Ile Gly
 1090 1095 1100
 Glu Met Glu His Pro Glu Asn Asp Leu Arg Pro Leu Pro Asp Val Ala
 1105 1110 1115 1120
 Met Thr Gly Thr Cys Thr Arg Glu Cys Ser Glu Phe Gly His Ser Asp
 1125 1130 1135
 Thr Cys Trp Met Pro Gly Gln Ser Ser Pro Ser Arg Arg Thr Lys Ser
 1140 1145 1150
 Ser Ala Leu Lys Leu Ser Thr Phe Met Pro Tyr Gln Asp Arg Gly Gly
 1155 1160 1165
 Gln Glu Pro Ala Gly Ala Gly Ser Pro Ser Pro Glu Asp Arg Asn
 1170 1175 1180
 Thr Lys Thr Ala Pro Val Arg Leu Leu Pro Ser Tyr Ser Ala Phe Ser
 1185 1190 1195 1200
 His Ser Ser His Asp Ser Cys Lys Asp Ser Ala Thr Leu Glu Glu Ile
 1205 1210 1215
 Pro Leu Thr Gln Thr Ser Asp Phe Pro Pro Ala Ala Thr Pro Ala Ser
 1220 1225 1230
 Ala Gln Thr Ala Lys Arg Glu Ile Tyr Leu
 1235 1240

<210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 cttgccttag gcttatctcc ctt

23

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

18

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 gctcggaat gtcagctact tt 22

<210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 ggtcatctgg tgcctttgg 19

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 ccagcctaac aatgctctcc tt 22

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 agtgacaag gtgccggagg aa 22

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 agctcatagg atgccacacc gt 22

<210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 gtacactacc cgagtggcgt g 21

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 cctctactg gctcctccag c 21

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

	19	
agctggcccc cataactcaac		20
<210> 18		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 18		
cytcactgg ctctctctcc		20
<210> 19		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 19		
tcccgccat ggaaca		16
<210> 20		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 20		
gacttggcat ctcagaaca agag		24
<210> 21		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 21		
ctcccacat gcatggtagg		20
<210> 22		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 22		
gcatgctctg gggcatgt		18
<210> 23		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 23		
tcctcttttt ctgacaatca ccc		23
<210> 24		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 24		
aaggacaggc cagggcag		18
<210> 25		
<211> 22		
<212> DNA		

WO 03/008640		PCT/EP02/07847
	20	
<213> Homo sapiens		
<400> 25		
ttctggcagt tttcccca ag		22
<210> 26		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 26		
gagctatttg ggctgcaggt		20
<210> 27		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 27		
tcaagcacgg tgacacgc		18
<210> 28		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 28		
gccccggct gctaga		16
<210> 29		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 29		
tgggaccagc atcacgg		17
<210> 30		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 30		
cagccgacta tggtttcca g		21
<210> 31		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 31		
gatgcagga tcaccaggy		19
<210> 32		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 32		
cttgcagcct tctgattct g		21

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

21

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 cttgacacca atgacaacgc c 21

<210> 34
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 tcagaggttc ccccagctt 19

<210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 tagtgagacc cttctcccc a 21

<210> 36
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 ctttgcagg aagaggcaaa atg 23

<210> 37
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 agtgagctg agttgaaca aag 23

<210> 38
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 ccaagctgcc tagtgctg 19

<210> 39
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 39
 atacatgect cctcccctag g 21

<210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 40

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

22

cactttggct tgaggacca	20
<210> 41	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 41	
cagccccagc tcctttcc	18
<210> 42	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 42	
tgggcccggt ttctcat	17
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 43	
gggtacaat ggcgaggtct	20
<210> 44	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 44	
agtctactcc aaacctaggt ctctatgtca	30
<210> 45	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 45	
tgggaccag ccccag	16
<210> 46	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 46	
gcacacggat taggctgagt g	21
<210> 47	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 47	
cctaccacc ccaacca	18
<210> 48	
<211> 25	
<212> DNA	

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

23

<213> Homo sapiens
 <400> 48
 gagcagtact cegactacag ctacc 25

<210> 49
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 49
 tggcccccaa cacgg 15

<210> 50
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 50
 tccccgcatac cacctg 16

<210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 aatgtgtttg caggtggcag 20

<210> 52
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 52
 ggaggccaaa agtggttaaa c 21

<210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 tcatacctcgt cctccactgg 20

<210> 54
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 ggcacagcct tggccatc 19

<210> 55
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 55
 ttgccacgct gcttgag 18

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

24

<210> 56
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 gtcttggtga gacggtcagc c 21

<210> 57
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 gtggcgccgc tcaatct 17

<210> 58
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 caacggtgac tttgttatcc agaa 24

<210> 59
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 59
 aagctgagcg aggtggga 18

<210> 60
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 60
 gagagctatg agttgaaggt ggtg 24

<210> 61
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 61
 ctggcatggt ctccatcact gag 23

<210> 62
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 62
 acaa-gcacc tgtcttctact cag 23

<210> 63
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 63

WO 03/008640	25	PCT/EP02/07847
agatggtgaa gaggccctta gc		22
<210> 64		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 64		
gcagtgatg tgcccttcc		19
<210> 65		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 65		
ggagttagtg ctggagagtg gg		22
<210> 66		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 66		
caagagtgcc cgtgccc		17
<210> 67		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 67		
gtctctctg ccacatcctc tg		22
<210> 68		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 68		
ccctgatcta aaccatctct gttctc		26
<210> 69		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 69		
ctgtccatgc gaagaagacg c		21
<210> 70		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 70		
tgtccatct ccaatagttg cc		22
<210> 71		
<211> 28		
<212> DNA		

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

26

<213> Homo sapiens
 <400> 71
 caatacatag atgattcgtt taaggcct 28

<210> 72
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 72
 atgggtgtgg gcctgt . 17

<210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 73
 gacactgcat gaccagcagg 20

<210> 74
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 74
 actgggctcc ttccttgac 20

<210> 75
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 75
 cctgcttca gggctaaaat t 21

<210> 76
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 76
 ccaaatggcc cattccag 18

<210> 77
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 77
 gatggaaatg aggggagagg ac 22

<210> 78
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 78
 acacaaaaac ggcccc 17

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

27

<210> 79
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 79
 gtgtggctgc ggggtgg 16

<210> 80
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 80
 ccgctccctc ctacagacct 20

<210> 81
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 81
 cggttttggt gttccggtc 19

<210> 82
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 82
 tgccctgtgag ttcagcggg 19

<210> 83
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 83
 atccctggcg ctgcy 15

<210> 84
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 84
 cccgattaat accagtgcgg 20

<210> 85
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 85
 tcccaacca ggcctcc 17

<210> 86
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 86

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

28

aaagggcgtg tctctcca	19
<210> 87	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 87	
cttagttctg gccctgcct	20
<210> 88	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 88	
ctacaacat ttcctgagcc cc	22
<210> 89	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 89	
gccagaattt cgggtcaa	19
<210> 90	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 90	
caacccttcc taaacctgag gc	22
<210> 91	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 91	
tctcacct tcaactgtggg	20
<210> 92	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 92	
ccttgctgct ttcggagaga	20
<210> 93	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 93	
ggagaccgag gctgagacct	20
<210> 94	
<211> 20	
<212> DNA	

WO 03/008640

PCT/EP02/07847

29

<213> Homo sapiens
<400> 94
agctgacgcg ttctgaggat

20

【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
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/008640 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, A61K 38/17, 39/395, 48/00, A61P 11/06
- (21) International Application Number: PCT/EP02/07847
- (22) International Filing Date: 15 July 2002 (15.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/305,649 16 July 2001 (16.07.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except AT, US): NOVARTIS AG [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).
- (71) Applicant (for AT only): NOVARTIS PHARMA GMBH [AT/AT]; Brunner-Strasse 59, A-1230 Vienna (AT).
- (71) Applicants (for all designated States except US): WAKE FOREST UNIVERSITY HEALTH SCIENCES [US/US]; Medical Center Boulevard, Winston Salem, NC 27157 (US). RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN [NL/NL]; Broersstraat 5, NL-9712 CP Groningen (NL).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): WHITTAKER, Paul, Andrew [GB/GB]; Novartis Hørsham Research Centre, Wimbleshurst Road, Hørsham, West Sussex RH12 5AB (GB). MEYERS, Deborah, Alexis [US/US]; Wake Forest University, Medical Center Boulevard, Winston Salem, NC 27157 (US). POSTMA, Dirkje, Sjoukje [NL/NL]; University of Groningen, Hanzeplein 1, NL-9713 GZ Groningen (NL). BLEECKER, Eugene, Roland [US/US]; Wake Forest University, Medical Center Boulevard, Winston Salem, NC 27157 (US).
- (74) Agents: GROS, Florent et al.; Novartis AG, Corporate Intellectual Property, Patent & Trademark Department, CH-4002 Basel (CH).
- (81) Designated States (national): AI, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LT, LU, LV, MA, MD, ME, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- Published: — with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 7 August 2003

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

WO 03/008640 A3

(54) Title: ASTHMA-ASSOCIATED GENE

(57) Abstract: The invention relates to the use of an asthma-associated gene, designated AAGA, the protein molecule encoded by AAGA and related molecules in diagnostic and prognostic screening of patient populations, to polymorphisms in AAGA, and to the use of the protein encoded by AAGA or a variant thereof as a therapeutic target.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/07847
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 A61K38/17 A61K39/395 A61K48/00 A61P11/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 00289 A (DOHENY EYE INST) 4 January 1996 (1996-01-04) see SEQ ID N°94 page 71 -page 75; example 3	1-29
X	SANO K ET AL: "Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 12, no. 6, 1993, pages 2249-2256, XP002087750 ISSN: 0261-4189 see deduced amino sequence of human pc42, L11370	1-29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim 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 member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 June 2003		Date of mailing of the international search report 23/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl, Fax. (+31-70) 340-2016		Authorized officer Loubradou-Bourges, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internet Application No
PCT/EP 02/07847

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MEYERS D A ET AL: "EVIDENCE FOR A LOCUS REGULATING TOTAL SERUM IGE LEVELS MAPPING TO CHROMOSOME 5" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, Vol. 23, no. 2, 15 September 1994 (1994-09-15), pages 464-470, XP000616442 ISSN: 0888-7543 abstract ---	1-29
A	BLEECKER E R ET AL: "EVIDENCE FOR LINKAGE OF TOTAL SERUM IGE AND BRONCHIAL HYPERRESPONSIVENESS TO CHROMOSOME 5Q: A MAJOR REGULATORY LOCUS IMPORTANT IN ASTHMA" CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, LONDON, GB, vol. 25, no. SUPPL 2, 1 November 1995 (1995-11-01), pages 84-88, XP000616464 ISSN: 0954-7894 abstract -----	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. PCT/EP 02/07847	
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 22-23 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1.	<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 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.:
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 Application No. PCT/EP 02 07847

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claim 17 relates to a variant of a polynucleotide defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the property that this variant is associated with bronchial hyperresponsiveness. The claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the products as defined in present claim 18.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internet Application No
PCT/EP 02/07847

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9600289	A	04-01-1996	US 5798224 A	25-08-1998
			AU 699135 B2	26-11-1998
			AU 2872495 A	19-01-1996
			BR 9506058 A	05-08-1997
			CN 1134172 A , B	23-10-1996
			CZ 9600482 A3	13-11-1996
			EP 0719330 A1	03-07-1996
			FI 960888 A	26-02-1996
			HU 75825 A2	28-05-1997
			JP 9505740 T	10-06-1997
			NO 960767 A	26-04-1996
			PL 313256 A1	24-06-1996
			RU 2197525 C2	27-01-2003
			SK 25296 A3	05-02-1997
			WO 9600289 A1	04-01-1996
			US 6262237 B1	17-07-2001
			US 5708143 A	13-01-1998
			US 5891706 A	06-04-1999

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 6
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/68	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), 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, E
E, ES, FI, GB, GD, GE, GH, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LT, LU, LV, MA, MD, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL
, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71) 出願人 504018105

レイクスユニフェルジテイト・フローニンゲン

Rijksuniversiteit Groningen

オランダ、エヌエル - 9 7 1 2 セーペー・フローニンゲン、ブルーールストラート 5 番

(74) 代理人 100062144

弁理士 青山 稔

(74) 代理人 100067035

弁理士 岩崎 光隆

(74) 代理人 100064610

弁理士 中嶋 正二

(74) 代理人 100072730

弁理士 小島 一晃

(72) 発明者 ポール・アンドリュウ・ウィテカー

イギリス、アールエイチ 1 2 ・ 5 エイビー、ウエスト・サセックス、ホーシャム、ウィンブルハースト・ロード、ノバルティス・ホーシャム・リサーチ・センター

(72) 発明者 デボラ・アレクシス・マイヤーズ

アメリカ合衆国 2 7 1 5 7 ノースカロライナ州ウinston・セイレム、メディカル・センター・ブルバード、ウェイク・フォレスト・ユニバーシティ

(72) 発明者 デイルクイエ・ショウクイエ・ポストマ

オランダ、エヌエル - 9 7 1 3 ヘーゼット・フローニンゲン、ハンゼプレイン 1 番、ユニバーシテイ・オブ・フローニンゲン

(72) 発明者 ユージーン・ローランド・ブリーカー

アメリカ合衆国 2 7 1 5 7 ノースカロライナ州ウinston・セイレム、メディカル・センター・ブルバード、ウェイク・フォレスト・ユニバーシティ

F ターム(参考) 2G045 AA35 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02

4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA09 HA14 HA17

4B063 QA08 QA13 QA19 QQ43 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34

4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA01 BA22 BA35 CA53 MA01 MA13

MA17 MA22 MA23 MA28 MA32 MA35 MA37 MA52 MA59 MA63

MA66 NA14 ZA592

4C085 AA13 AA14 AA38 BB11 CC02 CC21 DD33 DD63 DD86 DD88

	EE01	FF03	FF20	GG02	GG08					
4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA01	MA04	MA13	MA17	MA22	MA23
	MA28	MA32	MA35	MA37	MA52	MA59	MA63	MA66	NA14	ZA59
4H045	AA10	AA30	BA10	CA40	EA20	EA50	FA74			

专利名称(译)	哮喘相关基因		
公开(公告)号	JP2004536603A	公开(公告)日	2004-12-09
申请号	JP2003514955	申请日	2002-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司 格罗宁根大学		
申请(专利权)人(译)	诺华股份公司 维克森林大学健康科学 湖区海胆下跌迪泰特格罗宁根		
[标]发明人	ポールアンドリュウウイテカー デボラアレクシスマイヤーズ ディルクイエショウクイエポストマ ユージーンローランドブリーカー		
发明人	ポール・アンドリュウ・ウイテカー デボラ・アレクシス・マイヤーズ ディルク・イエ・ショウクイエ・ポストマ ユージーン・ローランド・ブリーカー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K48/00 A61P11/06 C07K14/47 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K2039/505 A61P11/06 C12Q1/6883 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P11/06 C07K14/47 C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084 /AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA35 4C084/CA53 4C084/MA01 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA32 4C084 /MA35 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA59 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA38 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC21 4C085/DD33 4C085 /DD63 4C085/DD86 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/FF03 4C085/FF20 4C085/GG02 4C085/GG08 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA13 4C086 /MA17 4C086/MA22 4C086/MA23 4C086/MA28 4C086/MA32 4C086/MA35 4C086/MA37 4C086/MA52 4C086/MA59 4C086/MA63 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA59 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小島 一晃		
优先权	60/305649 2001-07-16 US		
其他公开文献	JP2004536603A5 JP4428478B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及称为AAGA的哮喘相关基因，AAGA和相关分子编码的蛋白质分子在患者群体的诊断和预后筛选，AAGA的多态性和AAGA编码的蛋白质或其变体中的用途。用作治疗靶点。

【表1】

GRNSCANで予測された エキソン	ヌクレオチド位置†		エキソンの大きさ (bp)
	配列番号1	配列番号2	
1	1053-1889	-	837
2	5031-7226	-	2196
3	12987-13206	-	220
4	16002-16396	-	395
5	-	1695-1847	153

†示された座標は本来のゲノム配列の逆補体に関するものである。