

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-503112

(P2005-503112A)

(43) 公表日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(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	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 1/00	4 B 0 2 9
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 3/06	4 B 0 6 3
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 9/00	4 B 0 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 258 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-562742 (P2002-562742)	(71) 出願人	301005050 インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160
(86) (22) 出願日	平成14年2月6日 (2002.2.6)	(74) 代理人	100089266 弁理士 大島 陽一
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月5日 (2003.8.5)	(72) 発明者	ダス、デボブリヤ アメリカ合衆国カリフォルニア州94087・サニーベイル・パーキントンアベニュー 1267
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/003813		
(87) 国際公開番号	W02002/063005		
(87) 国際公開日	平成14年8月15日 (2002.8.15)		
(31) 優先権主張番号	60/266, 910		
(32) 優先日	平成13年2月6日 (2001.2.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/276, 891		
(32) 優先日	平成13年3月16日 (2001.3.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/276, 855		
(32) 優先日	平成13年3月16日 (2001.3.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂質結合分子

(57) 【要約】

本発明は、ヒトの脂質関連分子 (L I P A M) 群および、L I P A Mを同定しコードするポリヌクレオチド群を提供する。本発明はまた、発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニストおよびアンタゴニストをも提供する。本発明はまた、L I P A Mの異常発現に関連する種々の障害を、診断、治療、または予防する方法をも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) 乃至 (f) からなる群から選択した単離されたポリペプチド。

(a) SEQ ID NO:1-9 (配列番号 1 乃至 9) からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5-6 および SEQ ID NO:9 からなる群から選択した或るアミノ酸配列と少なくとも 90% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

(c) SEQ ID NO:2-4 および SEQ ID NO:7 からなる群から選択した或るアミノ酸配列と少なくとも 91% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

(d) (c) SEQ ID NO:8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 99% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド 10

(e) SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片

(f) SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片

【請求項 2】

SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択したアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。 20

【請求項 4】

請求項 2 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5】

SEQ ID NO:10-18 (配列番号 10 乃至 18) を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有する、請求項 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。 30

【請求項 8】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。

【請求項 9】

請求項 1 のポリペプチドを生産する方法であって、

(a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件下で、請求項 1 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換される細胞を培養する過程と、

(b) そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程とからなり、前記組換えポリヌクレオチドが、請求項 1 に記載の前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーター配列を含むことを特徴とする方法。 40

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つことを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載のポリペプチドと特異結合するような単離された抗体。

【請求項 12】

以下の (a) 乃至 (g) からなる群から選択した単離されたポリヌクレオチド。

(a) SEQ ID NO:10-18 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(b) SEQ ID NO:10-16、SEQ ID NO:18 からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配 50

列に対して少なくとも90%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(c) SEQ ID NO:17のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも91%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(d) (a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(e) (b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(f) (c)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(g) (a)~(f)のRNA等価物

【請求項13】

請求項12に記載のポリヌクレオチドの少なくとも60の連続したヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。 10

【請求項14】

請求項12に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を持つ少なくとも20の連続したヌクレオチドを持つプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程、とを含み、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドあるいはその断片との間でハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で、プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることを特徴とする方法。 20

【請求項15】

前記プローブが少なくとも60の連続したヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項16】

請求項12に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、 30

(b) 前記の増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項17】

請求項1のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを有することを特徴とする組成物。

【請求項18】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-9からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項17の組成物。

【請求項19】 40

機能的LIPAMの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項17に記載の組成物を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項20】

請求項1に記載のポリペプチドのアゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項21】 50

請求項20に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする組成物。

【請求項22】

機能的なLIPAMの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療を要する患者への請求項21の組成物の投与を含む治療方法。

【請求項23】

請求項1に記載のポリペプチドのアンタゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアンタゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。 10

【請求項24】

請求項23に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする組成物。

【請求項25】

機能的なLIPAMの過剰な発現に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療を要する患者への請求項24の組成物の投与を含む治療方法。

【請求項26】

請求項1に記載のポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物に混合させる過程と、

(b) 請求項1のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項1のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程を含む方法。 20

【請求項27】

請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドの活性が許容される条件下で、請求項1のポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物に混合させる過程と、

(b) 請求項1に記載のポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、 30

(c) 試験化合物の存在下での請求項1のポリペプチドの活性を、試験化合物の不存在下での請求項1のポリペプチドの活性と比較する過程を含み、試験化合物の存在下での請求項1のポリペプチドの活性の変化が、請求項1のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示するような方法。

【請求項28】

請求項5の配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、該標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現改変を検出する過程と、 40

(c) 可変量の前記化合物の存在下と前記化合物の不存在下で、前記標的ポリヌクレオチドの発現を比較する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項29】

試験化合物の毒性を算定する方法であって、

(a) 核酸を含む生物学的サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、

(b) 処理した前記生物学的サンプルの核酸と、請求項12のポリヌクレオチドの少なくとも20の連続するヌクレオチドを持つプローブをハイブリダイズさせる過程であって、このハイブリダイゼーションが、前記プローブと前記生物学的サンプル中の標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項12のポリヌクレオチドまたはその断片のポ 50

リヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドである、前記過程と、

(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量する過程と、

(d) 前記処理された生物学的サンプル中のハイブリタイゼーション複合体の量を、処理されていない生物学的サンプル中のハイブリタイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、前記処理された生物学的サンプル中のハイブリタイゼーション複合体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示するような方法。

【請求項30】

生体サンプル中のLIPAMの発現に関連する症状または疾患に対する診断試験法であって、

(a) 前記生物学的サンプルと請求項11の抗体との混合を、前記抗体が前記ポリペプチドに結合し、抗体とポリペプチドとの複合体を形成するのに適した条件下で行う過程と、

(b) 前記複合体を検出する過程とを含み、前記複合体の存在が、前記生物学的サンプル中の前記ポリペプチドの存在と相関することを特徴とする方法。

【請求項31】

前記抗体が、

(a) キメラ抗体

(b) 単鎖抗体

(c) Fab断片

(d) F(ab')₂断片

(e) ヒト化抗体、のいずれかである抗体。

【請求項32】

請求項11に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを含む組成物。

【請求項33】

被検者におけるLIPAMの発現に関連する症状又は疾患の診断方法であって、請求項32に記載の組成物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項34】

前記抗体が標識されることを特徴とする請求項32に記載の組成物。

【請求項35】

被検者におけるLIPAMの発現に関連する症状又は疾患の診断方法であって、請求項34に記載の組成物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項36】

請求項11に記載の抗体の特異性を有するポリクローナル抗体を調製する方法であって、

(a) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体を単離する過程と、

(c) 前記単離された抗体を前記ポリペプチドでスクリーニングし、それによって、SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異結合するポリクローナル抗体を同定する過程とを含むような方法。

【請求項37】

請求項36に記載の方法で産出したポリクローナル抗体。

【請求項38】

請求項37に記載のポリクローナル抗体及び適切なキャリアーを含む組成物。

【請求項39】

請求項11に記載の抗体の特異性を有するモノクローナル抗体を作製する方法であって、

(a) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、

(c) 前記抗体産出細胞と不死化した細胞とを融合して、モノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞を形成する過程と、

(d) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、

(e) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異結

10

20

30

40

50

合するようなモノクローナル抗体を前記培養物から単離する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項40】

請求項39に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項41】

請求項40に記載のモノクローナル抗体及び適切なキャリアーを含む組成物。

【請求項42】

Fab発現ライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項11に記載の抗体。

【請求項43】

組換え免疫グロブリンライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項11に記載の抗体。

【請求項44】

サンプル中のSEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドを検出する方法であって、

(a) 請求項11に記載の抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、前記抗体と1サンプルとをインキュベートする過程と、

(b) 特異結合を検出する過程とを含み、該特異結合が、SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドがサンプル中に存在することを標示することを特徴とする方法。

【請求項45】

SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを精製する方法であって、

(a) 請求項11に記載の抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、前記抗体と1サンプルとをインキュベートする過程と、

(b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を含む精製ポリペプチドを得る過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項46】

マイクロアレイの少なくとも1つが請求項13に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするマイクロアレイ。

【請求項47】

ポリヌクレオチドを含むサンプルの発現プロファイルを作製する方法であって、

(a) サンプル中のポリヌクレオチドを標識化する過程と、

(b) ハイブリダイゼーション複合体が形成されるのに適した条件下で請求項46のマイクロアレイの要素とサンプル中の標識化ポリヌクレオチドとを接触させる過程と、

(c) サンプル中のポリヌクレオチドの発現を定量する過程とを含む方法。

【請求項48】

或る固体基板上の固有の物理的位置に付着された種々のヌクレオチド分子を有するアレイであって、少なくとも1つの前記ヌクレオチド分子が、或る標的ポリヌクレオチドの少なくとも30の連続したヌクレオチド群と特異的にハイブリダイズ可能な最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列を含み、前記の標的ポリヌクレオチドが請求項12に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするアレイ。

【請求項49】

請求項48に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドの少なくとも30の連続したヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

【請求項50】

請求項48に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドの少なくとも60の連続したヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

請求項48に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 2】

請求項48に記載のアレイで、マイクロアレイであることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 3】

請求項48に記載のアレイで、前記のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの最初の配列を含むヌクレオチド分子にハイブリダイズした前記の標的ポリヌクレオチドを有することを特徴とするアレイ。

【請求項 5 4】

請求項48に記載のアレイで、リンカーが少なくとも1つの前記のヌクレオチド分子と前記の固体基板を連結していることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 5】

請求項48に記載のアレイで、基板上的固有の物理的位置の各々が複数のヌクレオチド分子を含み、任意の単一の固有の物理的位置でのその複数のヌクレオチド分子は同一の配列を有し、基板上的固有の物理的位置の各々は、基板上的別の固有の物理的位置でのヌクレオチド分子の配列とは異なる配列を有するヌクレオチド分子を含むことを特徴とするアレイ。

【請求項 5 6】

SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 5 7】

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 5 8】

SEQ ID NO:3のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 5 9】

SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 0】

SEQ ID NO:5のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 1】

SEQ ID NO:6のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 2】

SEQ ID NO:7のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 3】

SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 4】

SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 5】

SEQ ID NO:10のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6 6】

SEQ ID NO:11のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6 7】

SEQ ID NO:12のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6 8】

SEQ ID NO:13のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6 9】

SEQ ID NO:14のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7 0】

SEQ ID NO:15のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7 1】

SEQ ID NO:16のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

【請求項 7 2】

SEQ ID NO:17のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7 3】

SEQ ID NO:18のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、脂質結合分子の核酸配列およびアミノ酸配列に関する。本発明はまた、これらの配列を利用した、癌、神経障害、自己免疫/炎症疾患、胃腸障害、心血管障害、および脂質代謝障害の、診断・治療・予防に関する。本発明は更に、脂質結合分子の、核酸配列およびアミノ酸配列の発現における外来化合物の効果についての評価に関する。

10

【背景技術】

【0002】

脂質は、クロロフォルムやエーテルなど無極性溶媒に溶性の、非水溶性で油性又は脂肪性の物質である。中性脂肪(トリアシルグリセロール類)は、主要な燃料源とエネルギー貯蔵の役割を果たす。

脂肪酸は、1つのカルボキシル基と1つの長い無極性の炭化水素の尾をもった、長鎖の有機酸である。長鎖脂肪酸は、生物膜の構成単位である、糖脂質、燐脂質、及びコレステロールの重要な成分であり、生物学的な燃料分子であるトリグリセリド類の重要な成分でもある。燐脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、コレステロールのような脂質は、重要な、細胞膜の構造要素である脂質とタンパク質はさまざまな方法で会合している。糖脂質は、細胞や細胞膜の中でタンパク質を運ぶ小胞体を形成する。脂質とタンパク質の間の相互作用は、細胞信号伝達および細胞増殖などのさまざまなプロセスに参与するタンパク質と糖脂質を特定の膜および細胞内の標的位置に誘導する上で役割をもっている。さまざまなタンパク質が脂質の生合成、輸送および取り込みに関連している。さらに、信号伝達とタンパク質標的化に参与する主要なタンパク質は翻訳後に脂質由来基を付加されている(Stryer, L. (1995) Biochemistry, W.H. Freeman and Company, New York NY、Lehninger, A. (1982) Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc. New York NY、及び、ペーリンガーマンハイムのウェブサイト「<http://www.expasy.ch/cgi-bin/searchbiochemindex>」のExpASy「Biochemical Pathways」インデックス)。

20

30

【0003】

リン脂質

リン脂質の主要な1クラスとして、グリセロールのバックボーン、2つの脂肪酸鎖、及び1つのリン酸化したアルコールからなる、ホスホグリセリド類がある。ホスホグリセリドは細胞膜の成分である。主要なホスホグリセリドとしては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ジホスファチジルグリセロールがある。ホスホグリセリド合成に参与する多くの酵素は膜に結合している(Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, VCH Publishers Inc., New York NY, 494-501ページ)。ホスファチジン酸は、ホスファチジン酸シチジル転移酵素(ExpASy ENZYME EC 2.7.7.41)によってCDPジアシルグリセロールへ変換される。ジアシルグリセロール基の、CDPジアシルグリセロールからセリンへの転移によってホスファチジルセリンを生じ、また、イノシトールへの転移によってホスファチジルイノシトールを生じる。これらの転移は、それぞれCDPジアシルグリセロールセリンO-ホスファチジル転移酵素、及びCDPジアシルグリセロールイノシトール3ホスファチジル転移酵素(ExpASy ENZYME EC 2.7.8.8、ExpASy ENZYME EC 2.7.8.11)によって触媒される。ホスファチジルセリン デカルボキシラーゼは、ピルビン酸の補助因子を用いて、ホスファチジルセリンからホスファチジルエタノールアミンへの変換を触媒する(Voelker, D.R. (1997) Biochim. Biophys. Acta 1348:236-244)。ホスファチジルコリンは、食物に由来するコリンを用いて、ジアシルグリセロール コリンホスホトランスフェラーゼ(ExpASy ENZYME 2.7.8.2)に触媒される、CDPコリンと1, 2ジアシルグリセ

40

50

ロールとの反応によって形成される。

【0004】

他のホスホグリセリドは小胞体輸送プロセスに関与していることが示されている。ホスファチジルイノシトール伝達タンパク質 (PITP) は遍在性細胞質内タンパク質であり、リン脂質を小胞体およびゴルジ内の合成部位から他の細胞膜に輸送する過程に関与していると考えられている。さらに最近、PITPはポリホスホイノシチド合成機構の必須成分であり、そのため表皮成長因子と f-Met-Leu-Phe による適正なシグナル伝達およびエキソサイトーシスに必要であることが示されている。PITPがポリホスホイノシチド合成において役割を持っていることが、PITPが細胞内小胞体輸送に関与している理由かもしれない (Liscovitch, M. 他 (1995) *Cell* 81:659-662)。

10

【0005】

copineは膜輸送において機能すると考えられているリン脂質結合タンパク質である。copineは脂質小胞体凝集を促進する。copineは膜活性に関連するC2ドメインと、膜内在性タンパク質と細胞外タンパク質の間の相互作用を仲介してカルシウム結合と調節に関連するアネキシンタイプのドメインを含んでいる (Creutz, C.E. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:13931402)。他のC2含有タンパク質としてはシナプトタグミン (synaptotagmin) があるが、このファミリーは小胞体の輸送に関与している。シナプトタグミンの脳脊髄液内の濃度は早期発現のアルツハイマー病において減少していることが見出されている (Gottfries, C.G. 他 (1998) *J. Neural Transm.* 105:773-786)。

20

【0006】

ホスファチジルイノシトール伝達タンパク質Sec14は *in vitro* で膜二重層の間のホスファチジルイノシトールとホスファチジルコリンの交換を触媒するが、このタンパク質はゴルジ複合体からの小胞の発芽に必須である。Sec14はリン脂質結合ドメインに相当する疎水性ポケットを形成するカルボキシル末端ドメインを持っている (Sha, B. 他 (1998) *Nature* 391:506510)。Sec14は細胞レチナルデヒド結合タンパク質 (CRAL) /トリプル機能ドメイン (TRIO) ファミリーに属している (InterPro Entry IPR001251, <http://www.ebi.ac.uk/interpro>)。

【0007】

スフィンゴ脂質

スフィンゴ脂質は、長鎖アミノアルコールであるスフィンゴシンを持つ膜脂質の重要な1クラスである。スフィンゴ脂質は、1つの長鎖脂肪酸、1つの極性ヘッドグループのアルコール、及びスフィンゴシン又はスフィンゴシン誘導体から成る。スフィンゴ脂質の3つのクラスには、スフィンゴミエリン、セレブロシド、及びガングリオシドがある。ヘッドグループとしてホスホコリン又はホスホエタノールアミンを持つスフィンゴミエリン類は、神経細胞を取り巻くミエリン鞘に豊富に存在する。グルコース又はガラクトースのヘッドグループを持つガラクトセレブロシド類は、脳に特徴的である。他のセレブロシドは非神経組織に見つられる。ヘッドグループが複数の糖ユニットを含むガングリオシドは脳に豊富に存在するが、非神経組織にも見られる。

30

【0008】

糖脂質

糖脂質も、動物細胞の原形質膜の重要な成分である。最も単純な糖脂質は脂質成分のほかにならずか一つのグルコースまたはガラクトース糖残基を含むセレブロシドである。ガングリオシドは脊椎動物の神経系に豊富に存在する糖スフィンゴ脂質原形質膜成分である。ガングリオシドは最も複雑な糖脂質であり、セラミド (アセチル化スフィンゴシン) がオリゴ糖部分に結合したもので、少なくとも一つの酸性糖残基 (シアル酸) を含んでいる (すなわちNアセチルノイラミン酸またはNグリコリルノイラミン酸)。糖残基はUDPグルコース、UDPガラクトース、NアセチルガラクトサミンおよびCMP-Nアセチルノイラミン酸ドナーを通じて順次セラミドに付加される。15以上のガングリオシドが同定されていて、そのうちG_{M1}とG_{M2}がもっともよく調べられている (Stryer, L. (1988) *Biochemistry*, W.H. Freeman および Co., Inc., New York, 552-554ページ)。

40

50

【0009】

ガングリオシドは細胞表面相互作用、細胞分化、神経炎の発生、膜貫通シグナル伝達のトリガーと調節、シナプス仲介 (mediatiosynaptic) 機能、神経修復、神経突起伸長および神経死において重要な役割を果たしていると考えられている (Hasegawa, T. 他 (2000) J. Biol. Chem. 275:80078015)。原形質膜にガングリオシドが存在することはこれらのイベントを指揮するために重要であるが、その後でシアリダーゼによって糖基が除去されること (脱シアリ化) も神経分化の調節に重要であるらしい。

【0010】

異なる膜輸送ステップには特定の可溶性Nエチルメレイミド感受性因子結合タンパク質 (SNAP) 受容体 (SNARE) タンパク質が必要である。SNAREタンパク質Vti1aはゴルジマーカと共局在化されていて、Vti1bは線維芽細胞株のトランスゴルジおよびゴルジのエンドソームマーカのネットワークと共局在化されている。脳に特異的なVti1aのスプライス変異体が神経末端から単離されたクラスリンでコーティングされた小胞および小さなシナプス小胞で豊富に見られる。Vti1aベータおよびシナプトブレビン (synaptobrevin) はシナプス小胞のライフサイクルを通じてその不可欠な部分である。Vti1aベータはシナプス小胞のリサイクルと生成中にSNARE複合体で機能する (Antonin, W. 他 (2000) J. Neurosci. 20:57245732)。

10

【0011】

シアリダーゼは糖スフィンゴ脂質の分解の最初のステップを触媒し、ガングリオシドから糖を除去する。これらの酵素は細胞質ゾル、リソソームマトリックス、リソソーム膜、および原形質膜に存在する (Hasegawa, T. 他 (2000) J. Biol. Chem. 275:80078015)。シアリダーゼの特徴は膜貫通ドメイン、ArgIlePro ドメイン、および3つのAspボックス配列が含まれる (Wada, T. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 261:2127)。

20

【0012】

正常な神経発生においては、大脳皮質の錐体ニューロンは神経細胞が皮質マントルに移動した直後に樹状突起発芽の単一バーストに関与する。樹状突起発生中の細胞は G_{M2} ガングリオシドの発現の増加によって特徴付けられるが、 G_{M2} ガングリオシドの発現は樹状突起が成熟すると減少する。初期のバーストの後では新しい一次樹状突起は出てこないということを示唆する証拠がある。

【0013】

コレステロール

1個のアルコールが一端に付いた、4個の融合した環状炭化水素から成るコレステロールは、コレステロールが組み込まれた膜の流動性を弱める。さらに、コレステロールは、コルチゾール、プロゲステロン、エストロゲン、及びテストステロンなど、ステロイドホルモンの合成に使用される。コレステロールから誘導される胆汁酸塩は、脂質の消化を促進する。皮膚内のコレステロールは、身体から過剰に水が蒸発するのを防ぐ障壁を形成する。コレステロール生合成の中間生成物群に由来する、ファルネシル基とゲラニルゲラニル基は、Rasなどシグナル伝達タンパク質、及びタンパク質ターゲティングタンパク質 (Rabなど) に、翻訳後に付加される。これらの修飾は、これらのタンパク質の活性に重要である (Guyton, A.C. (1991) Textbook of Medical Physiology, W.B. Saunders Company, Philadelphia PA, 760-763ページ; Stryer, 前出, 279-280, 691-702, 934の各ページ)。

30

40

【0014】

哺乳動物は、de novo生合成と食物の両方に由来するコレステロールを得る。肝臓は、哺乳類におけるコレステロール生合成の主要な部位である。生合成を達成するには、メバロン酸経路として知られる一連の酵素的ステップを経由する。律速段階は、ヒドロキシメチルグルタリルコエンザイムA (HMG-CoA) からメバロン酸への、HMG-CoAレダクターゼによる転換である。ロバスタチン (lovastatin) 剤はHMG-CoAレダクターゼの強力な阻害剤であり、患者への投与が、血清コレステロール値を下げるために成される。de novo生合成または食物に由来するコレステロールは、体液内を、リポタンパク質粒子の形で輸送され

50

る。これらのリポタンパク質粒子は、また、トリアシルグリセロール類をも輸送する。粒子は、極性脂質群とアポリポタンパク質群との殻によって囲まれた疎水性脂質群のコアを持つ。そのタンパク質の各成分が疎水性脂質に溶解性を提供し、また細胞標的化シグナル群を有する。リポタンパク質には、乳状脂粒、乳状脂粒残滓粒子、超低密度リポ蛋白 (VLDL)、中間密度リポ蛋白 (IDL)、低密度リポ蛋白 (LDL)、及び高密度リポ蛋白 (HDL) が含まれる (Meyers、前出; Stryer、前出 691-702ページ)。血漿中の HDL レベルと早発性冠動脈心疾患の危険性には、強い逆相関関係がある。ApoLは、膵臓内で発現される 1 種の HDL アポリポタンパク質である (Duchateau, P.N. 他 (1997) *J. Biol. Chem.* 272:25576-25582)。

【0015】

肝臓および腸以外の殆どの細胞は、コレステロールを血中から取り込み、細胞自体では合成しない。細胞表面 LDL 受容体類に LDL 粒子が結合し、LDL 粒子は次にエンドサイトーシスによって取り込まれる (Meyers, 前出)。LDL 受容体の欠除は、家族性高コレステロール血症疾患を生じ、血漿コレステロールレベルを増加させ、最終的にはアテローム性硬化をもたらす (Stryer, 前出、691-702ページ)。

【0016】

コレステロールの取り込みと生合成とに關与するタンパク質類は、細胞内コレステロール値に応じて厳密に調節される。ステロール調節エレメント結合タンパク質 (SREBP) は、1 種のステロール応答性転写因子である。正常なコレステロール条件下では、SREBP は、小胞体膜内に残留する。コレステロール値が下がると、SREBP の調節された切断が起こり、この切断により、このタンパク質の細胞外ドメインを放出する。この切断されたドメインは次に核まで輸送され、核において LDL 受容体遺伝子の転写を活性化し、また、コレステロール合成の酵素群をコードする遺伝子群の転写をも活性化する。これらの活性化は、これらの遺伝子の上流にあるステロール調節エレメント (SRE) に結合することによって行う (Yang, J. 他 (1995) *J. Biol. Chem.* 270:12152-12161)。コレステロールの取り込みと生合成との調節は、また、オキシステロール結合タンパク質 (OSBP) を介しても生じる。オキシステロールはコレステロールの異化作用中に形成される酸化生成物であり、ステロイド生合成の調節に關与している。OSBP は 1 種の高親和性の細胞内受容体であって、多様なオキシステロールが結合する。オキシステロールはコレステロール合成を下方調節し、コレステロールのエステル化を刺激する (Lagace, T.A. 他 (1997) *Biochem. J.* 326:205-213)。

【0017】

上澄みタンパク質因子 (SPF) はスクワレンのエポキシ化とスクワレンのラノステロールへの変換を刺激するが、これはコレステロールの生合成を増強する細胞質ゾルスクワレン伝達タンパク質である。スクワレンをスクワレン 2, 3 オキシドに変換する膜結合酵素であるスクワレンエポキシダーゼは、コレステロールのホメオスタシスの維持に重要な役割を果たす。SPF はアルファトコフェロール伝達タンパク質、細胞レチナル結合タンパク質、酵母ホスファチジルイノシトール伝達タンパク質 (Sec14p) およびイカのレチナル結合タンパク質等の細胞質ゾル脂質結合/伝達タンパク質のファミリーに属している。

【0018】

脂質代謝酵素

長鎖脂肪酸は、エイコサノイド生産の基質ともなり、数種の複雑な炭水化物類とタンパク質類の機能的な修飾にも重要である。炭素数が 16 及び 18 の脂肪酸が最も一般的である。脂肪酸の合成は細胞質内で起こる。第一ステップでは、アセチル CoA と重炭酸からマロニル CoA を合成する。残りの各反応を触媒する酵素群は、多機能酵素、脂肪酸合成酵素 (FAS) と呼ばれる単一ポリペプチド鎖に共有結合している。FAS は、アセチル CoA とマロニル CoA とからのパルミチン酸の合成を触媒する。FAS は、アセチルトランスフェラーゼ、マロニルトランスフェラーゼ、ケトアセチルシンターゼ、アシルキャリアタンパク質、ケトアシル還元酵素、脱水酵素、エノイルレダクターゼ、及びチオエステラーゼの活性を持つ。FAS 反応の最終的産物は

10

20

30

40

50

炭素数16の脂肪酸であるパルミチン酸である。小胞体 (ER)の付属酵素群による、パルミチン酸のさらなる伸長と不飽和化によって、個々の細胞に必要な様々の長鎖脂肪酸を生じる。この付属酵素としては、NADHチトクロム b₅還元酵素、チトクロム b₅、及び不飽和化酵素が含まれる。

【0019】

細胞内では、脂肪酸は細胞質内の脂肪酸結合タンパク質類によって輸送される (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) *134650 Fatty Acid-Binding Protein 1, Liver; FABP1)。エンドゼピン及びアシルCoA結合タンパク質としても知られるジアゼパム結合阻害剤 (DBI)は、内因性のガンマアミノ酪酸 (GABA)受容体のリガンドで、GABAの効果を下方調節すると考えられる。DBIは長鎖及び中鎖をもつアシルCoAエステルと非常に強い親和性で結合し、これはアシルCoAエステルの細胞内キャリアとして機能している可能性がある (OMIM *125950 ジアゼパム結合阻害剤; DBI; PROSITE PDOC00686 アシルCoA結合タンパク質シグネチャ)。

10

【0020】

肝臓に貯蔵された脂肪と、脂肪トリグリセリド (adipose triglyceride)類とは、加水分解されて血液中に放出され、運ばれ得る。遊離脂肪酸は、アルブミンによって血液中を運ばれる。

トリグリセリドとも中性脂肪とも呼ばれるトリアシルグリセロール類は、動物内の主要なエネルギー貯蔵体である。トリアシルグリセロールは、3つの脂肪酸鎖の付いたグリセロールのエステルである。グリセロール-3リン酸は、グリセロールリン酸脱水素酵素によってジヒドロキシアセトンリン酸から、又はグリセロールキナーゼによってグリセロールから生成される。脂肪酸CoA類は、脂肪アシルCoA合成酵素によって脂肪酸から生成される。グリセロール-3リン酸は、グリセロールリン酸アシルトランスフェラーゼによって2個の脂肪アシルCoAでアシル化され、ホスファチジン酸を生じる。ホスファチジン酸ホスファターゼは、ホスファチジン酸をジアシルグリセロールに変換し、このジアシルグリセロールは次にジグリセリド アシルトランスフェラーゼによってトリアシルグリセロールへアシル化される。ホスファチジン酸ホスファターゼとジグリセリド アシルトランスフェラーゼは、小胞体 (ER)膜に結合したトリアシルグリセロール合成酵素複合体を形成する。

20

【0021】

ミトコンドリアとペルオキシソームとのベータ酸化酵素は、CoA活性化された脂肪酸から2個の炭素のユニットを次々に除くことによって、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸を分解する。主要なベータ酸化経路は飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の両方を分解するが、補助経路は不飽和脂肪酸の分解に必要な付加的ステップを行う。ミトコンドリアとペルオキシソームのベータ酸化経路は同様の酵素を使用するが、異なる基質特異性と機能をもつ。ミトコンドリアは短鎖、中鎖、長鎖の脂肪酸を酸化して、細胞のためのエネルギーを産生する。ミトコンドリアのベータ酸化は心筋と骨格筋の主要なエネルギー源となっている。飢餓、持久運動、及び糖尿病の場合のようにグルコースレベルが低くなった時は、肝臓でのベータ酸化がケトン体を末梢の循環へ提供する (Eaton, S. 他 (1996) Biochem. J. 320:345-357)。ペルオキシソームは中鎖、長鎖、超長鎖の脂肪酸、ジカルボン脂肪酸、分岐脂肪酸、プロスタグランジン、生体異物、胆汁酸中間物を酸化する。ペルオキシソームのベータ酸化

30

40

【0022】

3つのクラスの脂質代謝酵素をさらに詳細に考察する。その3つのクラスとは、リパーゼ、ホスホリパーゼ、及びリポキシゲナーゼである。

【0023】

50

リパーゼ

トリグリセリドは、リパーゼによって脂肪酸とグリセロールへ加水分解される。脂肪細胞は、貯蔵されたトリアシルグリセロールを分解するリパーゼを持ち、脂肪酸を燃料として必要とする他の組織へ輸送するために、脂肪酸を放出する。リパーゼは、動物、植物、及び原核生物に広範囲に分布する。トリアシルグリセロールリパーゼともトリブチラーゼとも知られる、トリグリセリドリパーゼ (ExPASy ENZYME EC 3.1.1.3) は、トリグリセリドのエステル結合を加水分解する。高等脊椎動物には、胃、肝臓、膵臓の各リパーゼを含む、少なくとも3種類の組織特異的アイソザイムが存在する。これらの3つのタイプのリパーゼは、構造的に互いに密接に関連しており、リポ蛋白リパーゼにも構造的に密接に関連している。胃、肝臓、膵臓の各リパーゼで最も保存された部分は、1つのセリン残基を中心とした辺りにあり、そのセリン残基は原核生物のリパーゼにも存在する。このセリン残基での突然変異は、これらリパーゼを不活性にする。胃、肝臓、膵臓の各リパーゼは、リポ蛋白トリグリセリドとリン脂質を加水分解する。腸内の胃リパーゼは食物脂肪の消化と吸収を助ける。肝臓リパーゼは、肝臓組織の内皮表面に結合して、そこで作用する。肝臓リパーゼは、また血漿脂質の調整にも主要な役割を果たしている。効率的な食物脂質の加水分解のために、膵臓リパーゼにはコリパーゼと呼ばれる小さいタンパク質補助因子が必要である。コリパーゼはリパーゼのC末端の非触媒ドメインに結合し、それによって活性型コンフォメーションを安定化させ、全体的な疎水性結合サイトを大きく増加させる。これらの酵素の欠失はヒトにおいて同定されており、すべては病理レベルの循環リポタンパク質粒子に関連している (Gargouri, Y. 他 (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1006:255-271; Connelly, P.W. (1999) *Clin. Chim. Acta* 286:243-255; van Tilbeurgh, H. 他 (1999) *Biochim Biophys Acta* 1441:173-184)。

【0024】

清澄化因子 (clearing factor) リパーゼ、ジグリセリドリパーゼ、又はジアシルグリセロールリパーゼとも知られる、リポ蛋白リパーゼ (ExPASy ENZYME EC 3.1.1.34) は、循環血漿中のリポ蛋白中に存在する、トリグリセリドとリン脂質を加水分解する。そのリポ蛋白としては、乳状脂粒、超低密度と中間密度のリポ蛋白質、及び高密度リポ蛋白質 (HDL) が含まれる。リポ蛋白リパーゼ (LPL) は、膵臓リパーゼと肝臓リパーゼと共に、高度の一次配列相同性を共有している。リポ蛋白リパーゼと肝臓リパーゼは、どちらもグリコサミノグリカンを介して毛細血管の内皮細胞につながり留められており、静脈注射によるヘパリン投与によって放出され得る。LPLは主に脂肪細胞、筋細胞、マクロファージによって合成される。LPLの触媒作用はアポリポ蛋白質C-IIによって活性化され、1M塩化ナトリウムのような高イオン強度条件下で抑制される。ヒトのLPL欠損は、代謝病 (例えばトリグリセリド過剰血、HDL欠損症、及び肥満など) の一因となる (Jackson, R.L. (1983), *The Enzymes* (Boyer, P.D. 編集) Vol. XVI, 141-186ページ, Academic Press, New York NY; Eckel, R.H. (1989) *New Engl. J. Med.* 320:1060-1068)。

【0025】

ホスホリパーゼ

膜リン脂質の加水分解を触媒する酵素グループであるホスホリパーゼは、リン脂質中の切断される結合によって分類される。ホスホリパーゼはPLA1、PLA2、PLB、PLC、及びPLDのファミリーに分類される。ホスホリパーゼは、エイコサノイド生合成に利用されるアラキドン酸を作ることによって、多くの炎症反応に関与する。詳細には、アラキドン酸は、リソ血小板活性化因子 (lyso-platelet-activating factor) やエイコサノイドのような、炎症の、生物活性のある脂質媒介物へプロセスされる。膜のリン脂質からアラキドン酸合成は、エイコサノイドの4種類の主要なクラス (プロスタグランジン、プロスタシクリン、トロンボキサン、ロイコトリエン) の合成の律速段階である。これらのエイコサノイドは脂肪酸由来の炭素数20の分子である。エイコサノイドはシグナル分子で、痛覚、発熱及び炎症に関与している。すべてのエイコサノイドの前駆体はアラキドン酸で、アラキドン酸はホスホリパーゼA₂によってリン脂質から、また、ジアシルグリセ

10

20

30

40

50

ロールリパーゼによってジアシルグリセロール類から生成される。ロイコトリエン類は、リポキシゲナーゼの作用によってアラキドン酸から産出される(Kaiser, E. 他 (1990) Clin. Biochem. 23:349-370)。さらに、ロイコトリエン-B4は、或るフィードバックループにおいて機能することが知られており、そのフィードバックループがさらにPLA2活性を増加させる(Wijkander, J他 (1995) J. Biol. Chem. 270:26543-26549)。

【0026】

分泌性のホスホリパーゼA₂ (PLA₂)スーパーファミリーは、多数の異種の酵素より成っており、その共通の特徴はホスホグリセリドのsn-2脂肪酸アシルエステル結合を加水分解することである。グリセリン脂質の加水分解によって、遊離脂肪酸とリゾリン脂質が放出される。PLA₂活性は、生物活性のある脂質、ヒドロキシ脂肪酸、及び血小板活性化因子の、生合成の前駆体を産生する。PLA₂は蛇毒の成分として記述されたのを始めとして、後には多くの種で特徴づけられている。PLA₂は従来、アミノ酸配列、2価陽イオン要求性、及びジスルフィド結合の位置を基に、いくつかの主要なグループとサブグループに分類されてきた。グループI、II、及びIIIのPLA₂は、低分子量をもつ分泌型のCa²⁺依存性タンパク質から構成されている。グループIVのPLA₂は主に、85キロダルトンのCa²⁺依存性細胞質内ホスホリパーゼである。最後に、多数のCa²⁺非依存性のPLA₂が記述されており、それらがグループVを構成する(Davidson, F.F. 及び E.A. Dennis (1990) J. Mol. Evol. 31:228238; Dennis, E.F. (1994) J. Biol. Chem. 269:13057-13060)。

10

【0027】

非常に良く特徴付けられた、当初のPLA₂は、蛇毒と蜂毒において見られるグループI、II、IIIのPLA₂であった。これらの毒のPLA₂は、共通の触媒機序、同じCa²⁺要求性、及び保存された1次構造と3次構造を含めた多くの特徴を哺乳動物のPLA₂と共有する。獲物の消化の役割に加え、毒のPLA₂は、動物組織で神経毒性、筋毒性、抗凝血性、及び炎症誘発性の効果を示す。この多様な病態生理学的効果は、様々な細胞および組織上の、これらの酵素への特異的で高親和性の受容体群の存在による(Lambeau, G. 他 (1995) J. Biol. Chem. 270:5534-5540)。

20

【0028】

グループI、IIA、IIC、及びVからのPLA₂は哺乳類と鳥類の細胞で記述されており、当初は組織分布によって分類されたが、その区別はもはや絶対的ではない。グループIのPLA₂は膵臓で発見され、グループIIAとIICは炎症に関連する組織(例えば、滑膜)に、またグループVは心臓組織に由来した。膵臓のPLA₂は食物脂質の消化機能を果たす。また、細胞増殖、平滑筋収縮、及び急性肺損傷で、ある種の役割を果たすと提起されている。グループIIの炎症PLA₂は、炎症過程の強力な媒介物であり、炎症障害をもつ患者の血清と滑液に高度なレベルで発現されている。グループIIの炎症PLA₂は、アッセイされたほとんどのヒト細胞タイプで見つかっており、敗血症ショック、腸癌、慢性関節リウマチ、上皮過形成などの広範囲の病理学的過程で発現される。グループVのPLA₂は脳組織からクローンされており、心臓組織で強度に発現される。或るヒトPLA₂が胎児の肺から最近クローンされ、その構造的特性に基づくと、グループXと呼ばれる、哺乳類PLA₂の新しいグループの最初のメンバーとなる様相である。他のPLA₂群は種々のヒト組織と細胞株からクローンされており、PLA₂の広い多様性を示唆している(Chen, J. 他 (1994) J. Biol. Chem. 269:2365-2368; Kennedy, B.P. 他 (1995) J. Biol. Chem. 270: 22378-22385; Komada, M. 他 (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 168:1059-1065; Cupillard, L. 他 (1997) J. Biol. Chem. 272:15745-15752、Nalefski, E.A. 他 (1994) J. Biol. Chem. 269:18239-18249)。

30

40

【0029】

リゾホスホリパーゼ、レシチナーゼB、又はリゾレシチナーゼとも知られる、ホスホリパーゼB (PLB) (ExpASY ENZYME EC 3.1.1.5)は、細胞内の脂質を代謝し、広範囲に分布する酵素であり、多くのアイソフォームがある。約15~30kDの小さいアイソフォームは加水分解酵素として機能し、60kDを越える大きなアイソフォームは加水分解酵

50

素とアシル基転移酵素の両方の機能をする。PLBの特別の基質であるリゾホスファチジルコリンは、形成された時又は細胞内に輸送された時に、細胞膜の溶解を起こさせる。PLBは、アシルカルニチン、アラキドン酸、及びホスファチジン酸など、脂質因子によって調節される。これらの脂質因子は、炎症応答など多くの経路での重要なシグナル伝達分子である (Anderson, R. 他 (1994) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 125:176-183; Selle, H. 他 (1993); *Eur. J. Biochem.* 212:411-416)。

【0030】

ホスホリパーゼC (PLC) (ExPASy ENZYME EC 3.1.4.10) は、膜貫通シグナル伝達に重要な役割を果たしている。ホルモン、成長因子、神経伝達物質、及び免疫グロブリンなど、多くの細胞外シグナル分子は、それぞれに対応する細胞表面受容体に結合し、PLCを活性化する。或る活性化したPLCの役割は、形質膜の少量の成分であるホスファチジリンイノシトール-4,5-2リン酸 (PIP₂) の加水分解を触媒し、ジアシルグリセロールとイノシトール1,4,5-3リン酸 (IP₃) を産生することである。IP₃とジアシルグリセロールは、それぞれの生化学的経路でセカンドメッセンジャーとして働き、一連の細胞内反応を誘発する。IP₃は細胞内の貯蔵庫からCa²⁺を放出させ、ジアシルグリセロールはタンパク質キナーゼC (PKC) を活性化させる。両経路は、分泌、神経作用、代謝、及び増殖など、細胞過程を調節する膜貫通シグナル伝達メカニズムの一部である。

10

【0031】

いくつかの異なるPLCのアイソフォームが同定されており、PLC-、PLC-、PLC-と分類されている。サブタイプは、PLC-1のようにギリシャ文字の後にアラビア数字を加えることによって名付けられる。PLCは62~68kDaの分子量をもち、そのアミノ酸配列は2つの領域で相当の類似性を示す。Xと名づけられた、この最初の領域には約170アミノ酸を有し、2番目のY領域は約260アミノ酸を含んでいる。

20

【0032】

PLCの3つのアイソフォームの触媒作用は、Ca²⁺に依存する。PLC中のCa²⁺の結合部位は、2カ所の保存領域の1つであるY領域に位置すると考えられている。ホスファチジリンイノシトール (PI)、ホスファチジリンイノシトール4-1リン酸 (PIP)、及びホスファチジリンイノシトール4,5-2リン酸 (PIP₂) など、共通にイノシトールを含有するリン脂質の、これらのアイソフォームのいずれかによる加水分解は、環状及び非環状のイノシトールリン酸を生じる (Rhee, S.G. 及び Y.S. Bae (1997) *J. Biol. Chem.* 272:15045-15048)。

30

【0033】

すべての哺乳類PLCには、約100アミノ酸の長さで、両親媒性ヘリックスの側面に位置する2枚の逆平行のシートから成る、プレックストリン (pleckstrin) 相同性 (PH) ドメインがある。PHドメインは、Gタンパク質のサブユニット又はPIP₂のいずれかと相互作用して、PLCを膜の表面に導く (PROSITE PDOC50003)。

【0034】

レシチナーゼD、リポホスホジエステラーゼII、及びコリンホスファターゼとも知られる、ホスホリパーゼD (PLD) (ExPASy ENZYME EC 3.1.4.4) は、ホスファチジルコリン他のリン脂質の加水分解を触媒してホスファチジン酸を産生する。PLDは、膜小胞の輸送、細胞骨格ダイナミクス、及び膜貫通シグナル伝達に重要な役割を果たしている。さらに、PLDの活性化が細胞分化及び成長に関与する (Liscovitch, M. (2000) *Biochem. J.* 345:401-415の概説を参照)。

40

【0035】

PLDは、哺乳類細胞内で、ホルモン、神経伝達物質、成長因子、サイトカイン、タンパク質キナーゼCの活性化剤、及びGタンパク質共役受容体結合アゴニストなど、多様な刺激に応じ活性化される。少なくとも2種類の哺乳類PLD、PLD1とPLD2が同定されている。PLD1はタンパク質キナーゼCによって、また、共に小さいGTPaseであるARFとRhoAとによって活性化される (Houle, M.G. 及び S. Bourgoin (1999) *Bi*

50

ochim. Biophys. Acta 1439:135-149)。P L D 2 は、オレイン酸など不飽和脂肪酸によって選択的に活性化され得る (Kim, J.H. (1999) FEBS Lett. 454:4246)。

【 0 0 3 6 】

リポキシゲナーゼ

リポキシゲナーゼ (ExpASY ENZYME EC 1.13.11.12) は非ヘム鉄を含有する酵素で、リポ蛋白など数種の多価不飽和脂肪酸の二原子酸素添加を触媒する。リポキシゲナーゼは、植物、真菌、及び動物に広範囲に見られる。いくつかの異なるリポキシゲナーゼが知られており、それぞれが特徴のある酸化作用をもっている。動物では、炭素-3、5、8、11、12、15の位置でアラキドン酸の二原子酸素添加を触媒する特異的なリポキシゲナーゼ群がある。これらの酵素は、これらが二原子酸素添加するアラキドン酸の位置によって名前がついている。動物のリポキシゲナーゼは、約75~80 kDaの分子量をもつ一本鎖のポリペプチド鎖をもつ。リポキシゲナーゼはN末端バレルドメインと非ヘム鉄の一原子を含んだ大きな触媒ドメインをもつ。この鉄を含んだ酵素 (ferric enzyme) が酸化されて活性状態になることが、触媒に必要である (Yamamoto, S. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1128:117-131; Brash, A.R. (1999) J. Biol. Chem. 274:2367923682)。様々のリポキシゲナーゼ阻害剤が存在し、阻害メカニズムによって5種類の主要カテゴリに分類される。これらのカテゴリには、抗酸化剤、鉄キレート剤、基質類似体、リポキシゲナーゼ活性化タンパク質阻害剤、そして最後に上皮成長因子受容体阻害剤が含まれる。

10

【 0 0 3 7 】

e-L O X - 3 又は A l o x e 3 とも知られる 3 - リポキシゲナーゼが最近、マウス表皮からクローンされた。A l o x e 3 はマウスの 1 1 番染色体にあり、A l o x e 3 の推定アミノ酸配列は 1 2 - リポキシゲナーゼの配列群と 5 4 % 同一である (Kinzig, A. (1999) Genomics 58:158-164)。

20

【 0 0 3 8 】

アラキドン酸：酸素5-オキシドレダクターゼとしても知られる5-リポキシゲナーゼ (5-L O X、ExpASY ENZYME: EC 1.13.11.34) は、主に白血球、マクロファージ、マスト細胞に見られる。5-LOXはアラキドン酸を始めに5-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸 (5-H P E T E) へ、次にロイコトリエン (LTA4 (5,6オキシド7,9,11,14エイコサテトラエン酸)) に変換する。ロイコトリエン A 4 ヒドロラーゼによる、ロイコトリエン A 4 の続いての変換により、強力な好中球化学誘引物質ロイコトリエン B 4 が産生される。または、ロイコトリエン C 4 シンターゼによる L T A 4 のグルタチオン抱合と下流代謝によって、特に喘息の、気道反応性と粘液分泌に影響するシステニルロイコトリエンに至る。多くのリポキシゲナーゼは、活性のために他の補助因子またはタンパク質を必要としない。対照的に、哺乳動物の5-LOXは、カルシウムとATPを必要とし、また5-LOX 活性化タンパク質 (FLAP) の存在下で活性化される。FLAP自体がアラキドン酸に結合する。また、5-LOXに基質を供給する (Lewis, R.A. 他 (1990) New Engl. J. Med. 323:645655)。5-LOXとFLAPの発現レベルは、多因性 (原発性) 肺高血圧症を患う患者の肺で増加するのが見られる (Wright, L. 他 (1998) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157:219229)。

30

【 0 0 3 9 】

12 - リポキシゲナーゼ (12 - L O X、ExpASY ENZYME: EC 1.13.11.31) は、アラキドン酸に酸素添加して、1 2 - ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸 (1 2 - H P E T E) を形成する。哺乳類の 1 2 - リポキシゲナーゼ類は、その発現の原型の組織をとって命名される (従って、白血球タイプ、血小板タイプ、または表皮タイプ)。血小板タイプの 1 2 - L O X は表皮標本と類表皮細胞中で最も多いアイソフォームであることが発見されている。白血球タイプの 1 2 - L O X は最初にブタの白血球で非常に良く特徴付けられ、免疫化学アッセイで哺乳類の組織に、かなり広範囲な分布を示すことが発見された。組織分布に加え、白血球タイプの 1 2 - L O X は、アラキドン酸基質から 1 2 - H P E T E (ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸) を産生する能力に加え 1 5 - H P E T E を産生する能力で血小板タイプの酵素と区別できる。白血球タイプ 1 2 - L O X は 1 5 リポキシゲナーゼ (1 5 - L O X) に高度に関連している。その両者は二重特異性リポキシゲナーゼで

40

50

あり、高等哺乳類では、その1次構造が約85%一致している。白血球タイプ12-LOXは気管上皮、白血球、およびマクロファージに見つけられる(Conrad, D.J. (1999) Clin. Rev. Allergy Immunol.17:7189)。

【0040】

15-リポキシゲナーゼ(15-LOX、ExpASY ENZYME: EC 1.13.11.33)は、ヒトの網赤血球、気管表皮、及びエオシン好性白血球に見つかっている。15-LOXは哺乳類、特にウサギとヒトのアテローム動脈硬化病変部に検知されている。リポ蛋白の酸化修飾の他に、この酵素はアテローム動脈硬化病変部での炎症反応に重要である。15-LOXはサイトカインIL-4によってヒトの単球内に誘導されることが示されており、このIL-4は炎症過程に関与することが知られている(Kuhn, H. および S. Borngaber (1999) Adv. Exp. Med. Biol. 447:528)。

10

【0041】

活性部位にGDSL様モチーフを持つさまざまな脂質分解酵素が同定されている。このファミリーのメンバーとしてはリパーゼ/アシルヒドロラーゼ、熱不安定性ヘモリシンおよびウサギのホスホリパーゼ(AdRabB)等が挙げられる(Interpro entry IPR001087, <http://www.sanger.ac.uk>)。AdRabBの相同体としてモルモットの腸ホスホリパーゼBがあるが、これはグリセロリン脂質のアシルエステル結合を順次加水分解することにより外酵素として脂質の消化に寄与するカルシウム依存性のホスホリパーゼである。ホスホリパーゼBは雄の生殖においても役割を持っている(Delagebeaudeuf, C. 他 (1998) J. Biol. Chem. 273:13407-13414)。

20

【0042】

脂質結合分子と病気

脂質と脂質結合タンパク質とは、ヒトの複数の疾患と障害とにおいて役割を持つ。乳、前立腺、卵巣、直腸および子宮内膜等の腫瘍では長鎖脂肪酸の合成が増加する。

【0043】

動脈疾患であるアテローム性硬化では、動脈壁の内側に脂肪性病変が形成される。これらの病変は動脈の柔軟性を失わせ、血塊形成を助長する(Guyton、前出)。血漿中のHDLレベルと早発性冠動脈心疾患の危険性には、強い逆相関関係がある。LDL受容体の欠除は、家族性高コレステロール血症疾患を生じ、血漿コレステロールレベルを増加させ、最終的にはアテローム性硬化をもたらす(Stryer、前出、691-702ページ)。オキシステロールはヒトのアテローム斑に存在し、斑の発生に能動的な役割を果たすと考えられている(Brown, A.J. (1999) Atherosclerosis 142:1-28)。

30

リパーゼ、ホスホリパーゼ、及びリポキシゲナーゼは、アテローム性動脈硬化、肥満、関節炎、喘息、及び癌など、複雑な疾患に、またウォルマン病やタイプ1高リポ蛋白血症など、単一遺伝子欠損に寄与していると考えられる。

【0044】

脂肪症すなわち脂肪肝は肝臓にトリグリセリドが蓄積することを特徴とし、アルコール依存症、糖尿病、肥満および長期間の非経口的栄養法などさまざまな条件に伴って発生する。脂肪症は線維症および肝硬変に至ることがある。

【0045】

ニーマンピック病のAタイプとBタイプでは、スフィンゴミエリン分解酵素の欠陥により、スフィンゴミエリン(ある種のスフィンゴ脂質)と他の脂質群が中枢神経系に蓄積し、神経変性と肺病を起こさせる。ニーマンピック病のCタイプは、コレステロールの輸送の欠陥から起こり、スフィンゴミエリンとコレステロールとをリソソームに蓄積させ、スフィンゴミエリン分解酵素の活性を二次的に減少させる。大発作、失調症、以前に学んだ発語能力の損失等の神経症状が生後1~2年で現れる。推定上の或るコレステロール感知ドメインを持つNPCタンパク質での或る突然変異が、ニーマンピック病タイプCの1マウスモデルで見つかった(Fauci、前出、2175ページ; Loftus, S.K. 他 (1997) Science 277:232-235)。

40

【0046】

50

テイ-サックス病は常染色体の劣性、進行性神経変性疾患であり、ヘキササミニダーゼA酵素の欠乏に起因する脳内のG_{M2}ガングリオシドの蓄積によって生じる(Igdoura, S.A. 他 (1999) Hum. Mol. Genet. 8:11116)。この病気の特徴的な経過は発育の遅れに始まり、麻痺、痴呆、失明に至り、そして通常は生まれて2, 3年目に死亡する。テイ-サックス病の確証的な証拠は検死解剖で中央神経系のニューロンが風船のように膨れていることで得られる(Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 272800, 8/4/2000, WWW URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>)。テイ-サックス病の場合、皮質錐体ニューロンは2回目の樹状突起発生を行う(Walkley, S.U. 他 (1998) Ann. N.Y. Acad. Sci. 845:18899)。

【0047】

その他の病気もシアリダーゼ活性の欠陥に関連している。G_{M1}ガングリオシドーシスとモルキオB病は表現型こそ異なるものの、いずれもベータガラクシダーゼの欠損から生じる。シアリドーシスはノイラミニダーゼの欠損から生じるが、症状はガングリオシドーシスと似ている。シアリダーゼ欠損の表現型が重複している理由はおそらくこれらの酵素がリソソーム内で複合体として存在するためであろう(Callahan, J.W. (1999) Biochim. Biophys. Acta 1455:85103)。

【0048】

PLA類は、様々な疾患過程に関与すると考えられる。例えば、PLAは膵臓、心臓組織、炎症に関連する組織に見つけられている。膵臓のPLAは食物脂質の消化機能を果たす。また、細胞増殖、平滑筋収縮、及び急性肺損傷で、ある種の役割を果たすと提起されている。炎症PLAは、炎症過程の強力な媒介物であり、炎症障害をもつ患者の血清と滑液に高度なレベルで発現される。炎症PLAは、ほとんどのヒト細胞タイプで見られ、敗血ショック、腸癌、慢性関節リウマチ、上皮過形成などの広範囲の病理学的過程で発現される。

【0049】

ヒトの組織でのPLBの役割が様々な研究で調べられてきた。PLB類によるリゾホスファチジルコリンの加水分解は、赤血球膜における溶解を起こす(Selle, 前出)。同様に、Endresen, M.J.他(1993; Scand. J. Clin. Invest. 53:733-739)は、子かん前症の複数の女性で、PLBによるリゾホスファチジルコリンの増加した加水分解が、遊離脂肪酸を血清中に放出させることを報告した。腎臓の研究では、PLBがNa⁺, K⁺-ATPaseをシクロスポリンAの細胞毒性作用と細胞融解性作用とから保護することが示された(Anderson, 前出)。

【0050】

リパーゼ、ホスホリパーゼ、及びリポキシゲナーゼは、アテローム性動脈硬化、肥満、関節炎、喘息、及び癌など、複雑な疾患に、またウォルマン病やタイプ1高リポ蛋白血症など、単一遺伝子欠損に寄与していると考えられる。

【0051】

新規の脂質結合分子、およびそれらをコードするポリヌクレオチド群の発見により、新規の組成物を提供することで当分野の要望に応えることができる。これらの新規の組成物は、癌、神経障害、自己免疫/炎症の障害、胃腸障害、心血管障害、および脂質代謝障害の診断・予防・治療において有用であり、また、脂質結合分子の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の影響についての評価にも有用である。

【発明の開示】

【発明の効果】

【0052】

(発明の概要)

本発明は、総称して「LIPAM」、個別にはそれぞれ「LIPAM-1」、「LIPAM-2」、「LIPAM-3」、「LIPAM-4」、「LIPAM-5」、「LIPAM-6」、「LIPAM-7」、「LIPAM-8」および「LIPAM-9」と呼ぶ、脂質結合分子である精製されたポリペプチドを提供する。或る実施態様において本発明は、(a) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列が

10

20

30

40

50

らなるポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片を含む群から選択した実質上単離されたポリペプチドを提供する。一実施態様では、SEQ ID NO:1-9のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。

【0053】

また、本発明は(a) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を持つ或る天然アミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリヌクレオチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、該ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1-9からなる群から選択した或るポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:10-18からなる群から選択される。

【0054】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片からなる群から選択したポリペプチドをコードするようなポリヌクレオチドと機能的に連結したプロモーター配列を有する組換えポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。別の実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体を提供する。

【0055】

また、本発明は、(a) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片から構成される群から選択したポリペプチドを製造する方法を提供する。製造方法は、(a) 組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、(b) そのように発現したポリペプチドを回収する過程とを有し、組換えポリヌクレオチドはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーター配列を有する。

【0056】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片から構成される群から選択されたポリペプチドに特異結合するような単離された抗体を提供する。

【0057】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:10-18からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO:10-18からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(c) (a) に相補的なポリヌクレオチド、(d) (b) に相補的なポリヌク

レオチド、および (e) (a) ~ (d) の RNA 等価物からなる群から選択された単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドは少なくとも 60 の連続したヌクレオチドを有する。

【 0058 】

本発明は更に、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する一方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは、(a) SEQ ID NO:10-18 からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO:10-18 からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも 90 % の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(c) (a) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(d) (b) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、および (e) (a) ~ (d) の RNA 等価物、からなる群から選択した、或るポリヌクレオチドの配列を持つ。検出方法は、(a) サンプル中の前記の標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を含む、少なくとも 20 の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて該サンプルをハイブリダイズする過程と、(b) ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、プローブと標的ポリヌクレオチドあるいはその断片の間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、プローブは標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。一実施態様では、プローブは少なくとも 60 の連続したヌクレオチドを含む。

10

【 0059 】

本発明はまた、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは、(a) SEQ ID NO:10-18 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO:10-18 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも 90 % の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(c) (a) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(d) (b) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、および (e) (a) ~ (d) の RNA 等価物からなる群から選択された配列のポリヌクレオチドを有する。検出方法は、(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、(b) 前記の増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含む。

20

30

【 0060 】

本発明は更に、或る有効量のポリペプチドと薬物として許容し得る或る賦形剤とからなる、或る組成物を提供する。有効量のポリペプチドは、(a) SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも 90 % の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択した或るアミノ酸配列を含むポリペプチドの生物学的活性断片、および (d) SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択される。一実施態様では、上記の組成物は、SEQ ID NO:1-9 からなる一群から選択された或るアミノ酸配列を持つ。更に本発明は、この組成物を機能的 LIPAM の発現の低下に関連した疾患や症状の治療を必要とする患者に投与方法を提供する。

40

【 0061 】

本発明はまた、(a) SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも 90 % の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および (d) SEQ ID NO:1-9 からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) 該ポリペプチドを有するサンプルを或る化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のア

50

ゴニスト活性を検出する過程からなる。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、機能的LIPAMの発現の低下に関連した疾患や症状の治療を必要とする患者への、この組成物の投与を含む方法を提供する。

【0062】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性につき、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) 該ポリペプチドを含むサンプルを或る化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程からなる。一実施態様で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の、機能的LIPAMの過剰発現に関連した疾患や症状の治療を必要とする患者への投与方法を提供する。

10

【0063】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片を含む群から選択されたポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物と混合させる過程と、(b) 試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによってポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

20

【0064】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択したアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-9からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドの活性を調節する或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) 該ポリペプチドの活性にとり許容し得る条件下で、該ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と混合する過程と、(b) 該ポリペプチドの活性をこの試験化合物の存在下で算定する過程と、(c) この試験化合物の存在下での該ポリペプチドの活性をこの試験化合物の不存在下での該ポリペプチドの活性と比較する過程からなり、この試験化合物の存在下での該ポリペプチドの活性の変化は、該ポリペプチドの活性を調節する化合物を標示する。

30

40

【0065】

更に本発明は、SEQ ID NO:10-18からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つ標的ポリヌクレオチドの発現を改変する効果につき、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a) この標的ポリヌクレオチドを有するサンプルを或る化合物に曝露する過程と、(b) この標的ポリヌクレオチドの発現の改変を検出する過程と、(c) 可変量のこの化合物の存在下でのこの標的ポリヌクレオチドの発現と、この化合物の不在下での発現とを比較する過程とからなる。

【0066】

本発明は更に、試験化合物の毒性の算定方法を提供する。この方法には、以下の過程がある。(a) 核酸群を有する生体サンプルを試験化合物で処理する過程。(b) 処理済み生

50

体サンプルの核酸群をハイブリダイズする過程。この過程には、次のようなプローブを用いる。(i) SEQ ID NO:10-18からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(ii) SEQ ID NO:10-18からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(iii) (i)に相補的な配列を持つポリヌクレオチド、(iv) (ii)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v) (i)~(iv)のRNA等価物、からなる群から選択した或るポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチドからなるプローブである。ハイブリダイゼーションは、上記プローブと生体サンプル中の標的ポリヌクレオチドとの間に特異的ハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で生じる。上記標的ポリヌクレオチドは、(i) SEQ ID NO:10-18からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(ii) SEQ ID NO:10-18からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(iii) (i)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(iv) (ii)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v) (i)~(iv)のRNA等価物、からなる群から選択する。或いは、標的ポリヌクレオチドは、上記(i)~(v)からなる群から選択したポリヌクレオチド配列の断片と、(c)ハイブリダイゼーション複合体の量を定量する過程と、(d)処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量を、非処理の生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程を含み、処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量との差は、試験化合物の毒性を意味する。

10

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0067】

(本発明の記載について)

本発明のタンパク質、ヌクレオチド配列及び方法について説明するが、その前に、説明した特定の装置、材料及び方法に本発明が限定されるものではなく、改変し得ることを理解されたい。また、ここで使用する専門用語は特定の実施例を説明する目的で用いたものに過ぎず、特許請求の範囲にのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図したものではないことも併せて理解されたい。

【0068】

請求の範囲及び明細書中で用いている単数形の「或る」及び「その(この)」の表記は、文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数ものを指す場合もあることに注意しなければならない。従って、例えば「或る宿主細胞」と記されている場合にはそのような宿主細胞が複数あることもあり、「或る抗体」と記されている場合には単数または複数の抗体、及び、当業者に公知の抗体の等価物等についても言及しているのである。

30

【0069】

本明細書中で用いる全ての専門用語及び科学用語は、特に定義されている場合を除き、当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書で説明するものと類似あるいは同等の任意の装置、材料及び方法を用いて本発明の実施または試験を行うことができるが、ここでは好適な装置、材料、方法について説明する。本発明で言及する全ての刊行物は、刊行物中で報告されていて且つ本発明に関係があるであろう細胞、プロトコル、試薬及びベクターについて説明及び開示する目的で引用しているものである。本明細書のいかなる開示内容も、本発明が先行技術の効力によってこのような開示に対して先行する権利を与えられていないことを認めるものではない。

40

【0070】

(定義)

用語「LIPAM」は、天然、合成、半合成、或いは組換え体などの、全ての種(特にウシ、ヒツジ、ブタ、ネズミ、ウマ及びヒトを含む哺乳動物)から得られる実質的に精製されたLIPAMのアミノ酸配列を指す。

【0071】

用語「アゴニスト」は、LIPAMの生物学的活性を強めたり、模倣する分子を指す。アゴニ

50

ストの例としては、タンパク質、核酸、糖質、小分子その他の任意の化合物や組成物の内、LIPAMと直接に相互作用することによって、或いはLIPAMが関与する生物学的経路の種々の構成成分に作用することによってLIPAMの活性を調節するものを含みうる。

【0072】

用語「対立遺伝子変異配列」は、LIPAMをコードする、別の形の遺伝子を指す。対立遺伝子変異体は、核酸配列における少なくとも1つの突然変異から作製し得る。また、変異RNAまたはポリペプチドからも作製し得る。ポリペプチドの構造または機能は、変異することもしないこともある。遺伝子は、天然の対立遺伝子変異体を全く有しないか、1個若しくは数個の天然の対立遺伝子変異体を有し得る。一般に対立遺伝子変異体を生じさせる通常の突然変異性変化は、ヌクレオチドの自然欠失、付加または置換に帰するものである。これら各変化は、単独或いは他の変化と共に、所定の配列内で1回若しくは数回生じ得る。

10

【0073】

LIPAMをコードする「変容した/改変された」核酸配列には、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、あるいは置換がありながら、LIPAMと同じポリペプチド、あるいはLIPAMの機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドをもたらす配列もある。この定義には、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列にとり正常な染色体の遺伝子座ではない位置での、対立遺伝子変異配列群への不適當或いは予期しないハイブリダイゼーションを含み、また、LIPAMをコードするポリヌクレオチドの或る特定オリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な或いは検出困難な多型性を含む。コードされるタンパク質も「変容する/改変される」ことがあり、また、サイレント変化を生じて機能的には等価なLIPAMと成るような、アミノ酸残基の欠失、挿入、あるいは置換を持ち得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にLIPAMの活性が保持される範囲で、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性、についての類似性に基づいて成され得る。例えば、負に帯電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸があり、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンがある。親水性値が近似している非荷電極性側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギンとグルタミン、セリンとトレオニンがある。親水性値が近似している非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、フェニルアラニンとチロシンがある。

20

【0074】

用語「アミノ酸」及び「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質配列、或いはそれらの任意の断片を指し、天然の分子及び合成分子を含む。「アミノ酸配列」が天然のタンパク質分子の配列を指す場合、「アミノ酸配列」及び類似の用語は、アミノ酸配列を記載したタンパク質分子に関連する完全で元のままのアミノ酸配列に限定するものではない。

30

【0075】

用語「増幅」は、核酸配列の複製物を作製することに関連する。増幅は通常、当業者によく知られたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いて行う。

【0076】

用語「アンタゴニスト」は、LIPAMの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子を指す。アンタゴニストとしては、LIPAMと直接に相互作用するか或いはLIPAMが関与する生物学的経路の諸成分に作用してLIPAMの活性を調節する、抗体などのタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

40

【0077】

「抗体」の語は、エピトープの決定基と結合することができる、そのままの免疫グロブリンやその断片、例えばFa、F(ab')₂及びFv断片を指す。LIPAMポリペプチドと結合する抗体類は、免疫化抗原として、無傷のポリペプチド群を用いて、または、当該の小ペプチド群を持つ断片群を用いて作製可能である。動物(マウス、ラット、ウサギ等)を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、RNAの翻訳、または化学合成によって得られるポリペプチドまたはオリゴペプチドに由来し得るもので、好みに応じてキ

50

キャリアタンパク質に抱合することも可能である。通常用いられるキャリアーであってペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びスカシガイのヘモシアニン (KLH) 等がある。その結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。

【0078】

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

【0079】

用語「アプタマー」は、特定の分子標的に結合する核酸またはオリゴヌクレオチドを指す。アプタマーは *in vitro* の進化過程 (例えば米国特許番号第5,270,163号に記載された SEL EX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment)) から由来するもので、そのような過程は大きな組み合わせライブラリから標的特異的なアプタマー配列を選択する。アプタマー組成は、2本鎖または1本鎖であってもよく、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチド誘導體、または他のヌクレオチド様分子を含み得る。アプタマーのヌクレオチド成分は、修飾された糖基 (例えばリボヌクレオチドの2'-OH基が2'-Fまたは2'-NH₂で置換し得る) を有することが可能で、そのような糖基はヌクレアーゼへの抵抗性または血液中でのより長い寿命などの望ましい性質に改善し得る。循環系からアプタマーが除去される速度を遅くするために、アプタマーを高分子量キャリアー等の分子に抱合させることができる。アプタマーは、たとえば光活性化または架橋剤によって各々のリガンドと特異的に架橋させることができる。(Brody, E.N. および L. Gold (2000) J. Biotechnol. 74:5-13等を参照。)

【0080】

「intramer」の用語は *in vivo* で発現されるアプタマーを意味するたとえば、ワクシニアウイルスに基づくRNA発現系は、白血球の細胞質で特定のRNAアプタマーが高レベルで発現するために使用されている (Blind, M. 他 (1999) Proc. Natl Acad. Sci. USA 96:3606-3610)。

【0081】

「spiegelmer」の語はL-DNA、L-RNAその他の左旋性ヌクレオチド誘導體またはヌクレオチド様分子を含むアプタマーを指す。左旋性のヌクレオチドを含むアプタマーは右旋性ヌクレオチドに作用する天然の酵素による分解に対して耐性がある。

【0082】

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

【0083】

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

10

20

30

40

50

【 0 0 8 4 】

用語「相補的」は、塩基対合によってアニールする2つの一本鎖核酸配列間の関係を指す。例えば、「5'-AGT-3'」は、その相補配列「3'-TCA-5'」との対を形成する。

【 0 0 8 5 】

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

【 0 0 8 6 】

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

【 0 0 8 7 】

用語「保存的なアミノ酸置換」は、元のタンパク質の特性を殆ど変えない置換を指す。即ち、置換によってそのタンパク質の構造や機能が大きくは変わらず、そのタンパク質の構造、特にその機能が保存される。下表は、タンパク質中で元のアミノ酸と置換できて、保存アミノ酸置換と認められるアミノ酸を示している。

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

【 0 0 8 8 】

保存アミノ酸置換では通常、（ a ）置換領域におけるポリペプチドのバックボーン構造、

例えば シートや 螺旋構造、(b)置換部位における分子の電荷または疎水性、及び/または(c)側鎖の大部分を保持する。

【0089】

用語「欠失」は、1個以上のアミノ酸残基が欠如するアミノ酸配列の変化、或いは1個以上のヌクレオチドが欠如する核酸配列の変化を指す。

【0090】

用語「誘導体」は、化学修飾されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基またはアミノ基による水素の置換は、ポリヌクレオチド配列の化学修飾に含まれ得る。ポリヌクレオチド誘導体は、天然分子の生物学的または免疫学的機能を少なくとも1つは保持しているポリペプチドをコードする。ポリペ

10

【0091】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を発生し得る、ポリヌクレオチドやポリペプチドに共有結合或いは非共有結合するレポーター分子や酵素を指す。

【0092】

「示差発現」は少なくとも2つの異なったサンプルを比較することによって決められる、増加(上方調節)、あるいは減少(下方調節)、または欠損遺伝子またはタンパク発現の欠損を指す。このような比較は例えば、治療後サンプルと未治療のサンプルまたは病態の

20

【0093】

「エキソンシャフリング」は、異なるコード領域(エキソン)の組換えを意味する。1つのエキソンがコードされたタンパク質の1つの構造的または機能的ドメインを代表し得るため、安定したサブストラクチャーを再分類することによって、新しいタンパク質が組立てられることが可能であり、新しいタンパク質機能の進化を促進できる。

【0094】

用語「断片」は、LIPAMの、またはLIPAMをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列(parent sequence)と配列は同一であるが親配列より長さが短いものを指す。断片は、定義された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、5~1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さであり得る。断片は、分子の特定領域から選択的に選択し得る。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示すような最初の250または500アミノ酸(またはポリペプチドの最初の25%または50%)から選択された或る長さの連続したアミノ酸を含み得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施例では、配列表、表及び図面を含む明細書に裏付けされた任意の長さであ

30

40

【0095】

SEQ ID NO:10-18の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO:10-18を明確に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を含む。SEQ ID NO:10-18のある断片は、例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術、またはSEQ ID NO:10-18を関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法に有用である。SEQ ID NO:10-18の断片の正確な長さ及び断片に対応するSEQ ID NO:10-18の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0096】

SEQ ID NO:1-9のある断片は、SEQ ID NO:10-18のある断片によってコードされる。SEQ ID NO:1-9のある断片には、SEQ ID NO:1-9を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域

50

が含まれている。例えば、SEQ ID NO:1-9 のある断片は、SEQ ID NO:1-9を特異認識する抗体を産出するための免疫原性ペプチドとして有用である。SEQ ID NO:1-9 のある断片の正確な長さ、及びその断片に対応するSEQ ID NO:1-9 の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0097】

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

【0098】

「相同性」の語は、2つ以上のポリヌクレオチド配列または2つ以上のポリペプチド配列の配列類似性、または配列同一性を意味する。 10

【0099】

ポリヌクレオチド配列についての用語「一致率」または「一致性%」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる、2つ以上のポリヌクレオチド配列間の一致する残基の百分率のことである。このようなアルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するために比較する配列において、標準化された再現性のある方法でギャップを挿入するので、2つの配列をより有意に比較できる。

【0100】

ポリヌクレオチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて 20
決定できる。このプログラムは、LASERGENE ソフトウェアパッケージ(一組の分子生物学的分析プログラム)(DNASTAR, Madison WI)の一部である。このCLUSTAL Vは、Higgins, D. G.およびP.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153、Higgins, D.G. 他 (1992) CABIOS 8:189-191に記載されている。ポリヌクレオチド配列をペアワイズアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定される。「weighted」残基重み付け表がデフォルトで選択される。一致率は、アラインメントされたポリヌクレオチド配列間の「類似性パーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

【0101】

或いは、一般的に用いられ且つ自由に入手できる配列比較アルゴリズム一式が、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) から 30
提供されており(Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)、これはメリーランド州ベセスダにあるNCBI及びインターネット(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を含む幾つかの情報源から入手可能である。このBLASTソフトウェア一式には、既知のポリヌクレオチド配列と様々なデータベースの別のポリヌクレオチド配列とのアラインメントに用いられる「blastn」を含む、様々な配列分析プログラムが含まれる。「BLAST 2 Sequences」と呼ばれるツールが入手可能であり、2つのヌクレオチド配列の直接のペアワイズで比較するために用いられる。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html>にアクセスして、対話形式で利用ができる。「BLAST 2 Sequence 40
s」ツールは、blastn 及び blastp(以下に記載)の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、ギャップ及びデフォルト設定に設定された他のパラメータと共に用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するために、デフォルトパラメータとして設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12(2000年4月21日)を用いてblastnを実行してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

【0102】

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

10

【0103】

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

【0104】

ポリペプチド配列に用いられる用語「一致率」または「一致性%」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる2つ以上のポリペプチド配列間の一致する残基の百分率のことである。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の酸性度及び疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を（従って機能も）保存する。

20

【0105】

ポリペプチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組み込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる（既に説明したのでそれを参照されたい）。CLUSTAL Vを用いて、ポリペプチド配列をペアワイズアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、「diagonals saved」=5と設定される。PAM250マトリクスが、デフォルトの残基重み付け表として選択される。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリペプチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。

30

【0106】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用いてもよい。例えば、2つのポリペプチド配列をペアワイズで比較する場合、「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12（2000年4月21日）のblastpをデフォルトパラメータに設定して用い得る。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

40

Word Size: 3

Filter: on

一致率は、ある定義された配列の全長（例えば特定のSEQ IDナンバーで定義された配列）で測定し得る。或いは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きな配列から得られた断片（例えば少なくとも15、20、30、40、50、70、または150の連続したヌクレオチドの断片）の長さと比較して一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、或る長さであってその長さに対して一致率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

【0107】

50

「ヒト人工染色体 (HAC)」は、約 6 kb ~ 10 Mb のサイズの DNA 配列を含み得る、安定した染色体複製の分離及び維持に必要な全てのエレメントを含む直鎖状の微小染色体である。

【0108】

用語「ヒト化抗体」は、もとの結合能力を保持しつつよりヒトの抗体に似せるために、非抗原結合領域のアミノ酸配列が変えられた抗体分子を指す。

【0109】

「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件下で、ある一本鎖ポリヌクレオチドがある相補的な一本鎖と塩基対を形成するアニーリングのプロセスである。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相補性を共有することを示すものである。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、更にストリンジェントな条件では、非特異結合（即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合）が減少する。核酸配列のアニーリングに対する許容条件は、本技術分野における当業者が慣例的に決定できる。許容条件はハイブリダイゼーション実験の間は一定でよいが、洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異性も得るように実験中に変更することができる。アニーリングが許容される条件は、例えば、温度が 68 で、約 6 × SSC、約 1 % (w/v) の SDS、並びに約 100 µg/ml のせん断して変性したサケ精子 DNA が含まれる。

【0110】

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

【0111】

本発明のポリヌクレオチド間の高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションでは、約 0.2 × SSC 及び約 0.1 % の SDS の存在の下、約 68 で1時間の洗浄過程を含む。別法では、65、60、55、42 の温度で行う。SSC 濃度は、約 0.1 % の SDS 存在下で、約 0.1 ~ 2 × SSC の範囲で変化し得る。通常は、ブロッキング剤を用いて非特異ハイブリダイゼーションを阻止する。このようなブロッキング剤には、例えば、約 100 ~ 200 µg/ml の変性サケ精子 DNA がある。特定条件下で、例えば RNA と DNA のハイブリダイゼーションに有機溶剤、例えば約 35 ~ 50 % v/v の濃度のホルムアミドを用いることもできる。洗浄条件の有用なバリエーションは、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、ヌクレオチド間の進化的な類似性を示唆し得る。このような類似性は、ヌクレオチド及びヌクレオチドにコードされるポリペプチドに対する類似の役割を強く示唆している。

【0112】

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

【0113】

用語「挿入」或いは「付加」は、1個以上のアミノ酸残基或いはヌクレオチドがそれぞれ

10

20

30

40

50

追加されるアミノ酸配列或いは核酸配列の変化を指す。

【0114】

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

【0115】

用語「免疫原性断片」は、例えば哺乳動物など生物に導入すると免疫応答を引き起こし得る、LIPAMのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を指す。用語「免疫原性断片」にはまた、本明細書で開示するまたは当分野で既知のあらゆる抗体生産方法に有用な、LIPAMのあらゆるポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片をも含む。

10

【0116】

用語「マイクロアレイ」は、基板上の複数のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物の構成を指す。

【0117】

用語「エレメント」または「アレイエレメント」は、マイクロアレイ上に固有の指定された位置を有する、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物を指す。

【0118】

用語「調節」または「活性を調節」は、LIPAMの活性を変化させることを指す。例えば、調節によって、LIPAMのタンパク質活性の増減が、或いは結合特性の、またはその他の生物学的特性、機能的特性或いは免疫学的特性の変化が起き得る。

20

【0119】

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

【0120】

「機能的に連結した」は、第1の核酸配列と第2の核酸配列が機能的な関係にある状態を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合には、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に連結している。同一のリーディングフレーム内で2つのタンパク質コード領域を接続する必要がある場合、一般に、機能的に連結したDNA配列は非常に近接するか、或いは連続的に隣接し得る。

30

【0121】

「ペプチド核酸(PNA)」は、末端がリシンで終わるアミノ酸残基のペプチドのバックボーンに結合した、少なくとも約5ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドを含む、アンチセンス分子または抗遺伝子剤を指す。末端のリシンは、この組成物に溶解性を与える。PNAは、相補的一本鎖DNAまたはRNAに優先的に結合して転写の伸長を停止するものであり、ポリエチレングリコール化して細胞におけるPNAの寿命を延長し得る。

【0122】

LIPAMの「翻訳後修飾」としては、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、蛋白分解的切断、及びその他の当分野で既知の修飾を含み得る。これらのプロセスは、合成的或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、LIPAMの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なることとなる。

40

【0123】

「プローブ」とは、核酸配列の内、LIPAMやそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードし、同一配列や対立遺伝子核酸配列、または関連する核酸配列の検出に用いる配列を指す。プローブは、単離されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであって、検出可能な標識またはレポーター分子に結合したものである。典型的な標識には、放射性アイソトープ、リガンド、化学発光試薬及び酵素がある。「プライマー」とは、相補的な塩

50

基対を形成して標的のポリヌクレオチドにアニーリング可能な、通常はDNAオリゴヌクレオチドである短い核酸である。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に沿って延長し得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による核酸配列の増幅（及び同定）に用い得る。

【0124】

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

10

【0125】

プローブ及びプライマーの調製及び使用方法については、Sambrook, J. 他 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY、Ausubel, F.M. 他, (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY、Innis他 (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego CA等を参照されたい。PCRプライマー対は、その目的のためのコンピュータプログラム、例えばPrimer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA)を用いるなどして既知の配列から得ることができる。

20

【0126】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野でよく知られているソフトウェアを用いて行う。例えばOLIGO 4.06ソフトウェアは、各100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチド及び最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロベースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得たものを分析するのにも有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム（テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能）は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、従ってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Primer3プライマー選択プログラム（Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research（マサチューセッツ州ケンブリッジ）より入手可能）によって、ユーザーは、プライマー結合部位として避けたい配列を指定できる「非プライミングライブラリ（mispriming library）」を入力できる。Primer3は特に、マイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドの選択に有用である。（後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれの情報源から得てユーザー固有のニーズを満たすように変更してもよい。）PrimerGenプログラム（英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト-リソースセンターから一般向けに入手可能）は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計し、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域または最小保存領域の何れかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。従って、このプログラムは、固有であって保存されたオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばPCRまたはシーケンシングプライマーとして、マイクロアレイエレメントとして、或いは核酸のサンプルにおいて完全または部分的相補的ポリヌクレオチドを同定する特異プローブとして有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記の方法に限定されるものではない。

30

40

【0127】

本明細書における「組換え核酸」は天然の配列ではなく、2つ以上の配列の離れたセグメントを人工的に組み合わせた配列である。この人為的組合せはしばしば化学合成によって

50

達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばの Sambrookらの文献（前出）に記載されているような遺伝子工学的的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部を付加、置換または欠失した変異核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモーター配列に機能的に連結した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、例えばある細胞を形質転換するために使用されるベクターの一部とすることが可能である。

【0128】

或いはこのような組換え核酸は、ウイルスベクターの一部であって、例えばワクシニアウイルスに基づくものであり得る。そのようなワクシニアウイルスは哺乳動物に接種され、その組換え核酸が発現されて、その哺乳動物ないで防御免疫応答を誘導するように使用することができる。

10

【0129】

「調節因子」は、通常は遺伝子の非翻訳領域に由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロン及び5'及び3'の非翻訳領域（UTR）を含む。調節因子は、転写、翻訳またはRNA安定性を調節する宿主タンパク質またはウイルスタンパク質と相互作用する。

【0130】

「レポーター分子」は、核酸、アミノ酸または抗体の標識に用いられる化学的または生化学的な部分である。レポーター分子には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、補助因子、阻害因子、磁気粒子及びその他の当分野で既知の成分がある。

20

【0131】

本明細書において、DNA配列に対する「RNA等価物」とは、基準となるDNA配列と同じ直鎖の核酸配列から構成されるが、窒素性塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖のバックボーンがデオキシリボースではなくリボースからなる。

【0132】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。LIPAM、LIPAMをコードする核酸群、またはその断片群を含むと推定されるサンプルとしては、体液と、細胞や細胞から単離した染色体や細胞内小器官（オルガネラ）や膜からの抽出物と、細胞と、溶液中に存在するまたは基板に固定されたゲノムDNA、RNA、cDNAと、組織と、組織プリントなどがあり得る。

30

【0133】

用語「特異的結合」及び「特異的に結合する」は、タンパク質若しくはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、若しくは任意の天然若しくは合成の結合組成物との間の相互作用を指す。この相互作用は、タンパク質の特定の構造（例えば抗原決定基即ちエピトープ）であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存していることを意味している。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、結合していない標識した「A」及び抗体を含む反応液に、エピトープAを含むポリペプチド或いは結合していない無標識の「A」が存在すると、抗体と結合する標識Aの量が減少する。

【0134】

用語「実質的に精製された」は、自然の環境から取り除かれてから、単離或いは分離された核酸配列或いはアミノ酸配列であって、自然に結合している組成物が少なくとも約60%除去されたものであり、好ましくは約75%以上の除去、最も好ましくは90%以上除去されたものを指す。

40

【0135】

「置換」とは、一つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドをそれぞれ別のアミノ酸またはヌクレオチドに置き換えることである。

【0136】

用語「基板」は、任意の好適な固体或いは半固体の支持物を指し、膜及びフィルター、チップ、スライド、ウェハ、ファイバー、磁気または非磁気ビード、ゲル、チューブ、プレート、ポリマー、微小粒子、毛細管が含まれる。基板は、壁、溝、ピン、チャンネル、孔等

50

、様々な表面形態を有することができ、基板表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0137】

「転写イメージ」または「発現プロファイル」は、所定条件下での所定時間における特定の細胞の種類または組織による集合的遺伝子発現のパターンを指す。

【0138】

「形質転換」とは、外来DNAが受容細胞に導入されるプロセスのことである。形質転換は、本技術分野で知られている種々の方法に従って自然条件または人工条件下で生じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核宿主細胞または真核宿主細胞に挿入する任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。限定するものではないが形質転換方法には、ウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法がある。「形質転換された細胞」には、導入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主染色体の一部として複製可能である安定的に形質転換された細胞が含まれる。さらに、限られた時間に一過的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

10

【0139】

ここで用いる「遺伝形質転換体」とは任意の生物体であり、限定するものではないが動植物を含み、生物体の1若しくは数個の細胞が、ヒトの関与によって、例えば本技術分野でよく知られている形質転換技術によって導入された異種核酸を有する。核酸の細胞への導入は、直接または間接的に、細胞の前駆物質に導入することによって、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によって或いは組換えウイルスの導入によって行う。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種或いは試験管内受精を指すものではなく、組換えDNA分子の導入を指すものである。本発明に基づいて予期される遺伝形質転換体には、バクテリア、シアノバクテリア、真菌及び動植物がある。本発明の単離されたDNAは、本技術分野で知られている方法、例えば感染、形質移入、形質転換またはトランス接合（transconjugation）によって宿主に導入することができる。本発明のDNAをこのような生物体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrookら（1989）等の参考文献に与えられている。

20

【0140】

特定の核酸配列の「変異体」は、核酸配列1本全部の長さに対して特定の核酸配列と少なくとも40%の相同性を有する核酸配列であると定義する。その際、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9（1999年5月7日）を用いてblastnを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体（前述）、「スプライス」変異体、「種」変異体または「多型性」変異体として説明し得る。スプライス変異体は参照分子とかなりの相同性を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソンの選択的スプライシングによって通常、より多くまたはより少数のヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメインを有するか或いは参照分子に存在するドメインが欠落していることがある。種変異体は、種によって異なるポリヌクレオチド配列である。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互にかなりのアミノ酸相同性を有する。多型性変異体は、与えられた種の個体間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列中での変異である。多型変異配列はまた、ポリヌクレオチド配列の1つのヌクレオチドが異なる「1塩基多型性」（SNP）も含み得る。SNPの存在は、例えば特定の個体群、病状または病状性向を示し得る。

30

40

【0141】

特定のポリペプチド配列の「変異体」は、ポリペプチド配列の1本の長さ全体で特定のポリペプチド配列に対して少なくとも40%の相同性を有するポリペプチド配列として画定される。ここで、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9（1999年5月7日）を用いてblastpを実行する。このようなポリペプチド対は、所

50

定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示し得る。

【0142】

(発明)

本発明は、新規のヒトの脂質結合分子(LIPAM)群と、LIPAMをコードするポリヌクレオチド群との発見および、これらの組成を、癌、神経障害、自己免疫/炎症疾患、胃腸障害、心血管障害、及び脂質代謝の障害の、診断、治療並びに予防に利用する方法の発見に基づく。

【0143】

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

【0144】

表2は、GenBankタンパク質(genpept)データベースに対するBLAST分析によって同定されたような、本発明のポリペプチドとの相同性を有する配列を示している。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号(ポリペプチドSEQ ID NO:)およびそれに対応するIncyteポリペプチド配列番号(IncyteポリペプチドID)を示す。列3は、GenBankの最も近い相同体のGenBankの識別番号(GenBank ID NO:)を示す。列4は、各ポリペプチドとその相同体との間の一致を表す確率スコアを示す。列5は、該当箇所には適当な引用を示すとともにGenBank相同体1つ以上の注釈(annotation)を示し、これらはすべて本明細書では参考文献に含まれる。

【0145】

表3は、本発明のポリペプチドの様々な構造的特徴を示す。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドのポリペプチド配列識別番号(SEQ ID NO:)およびそれに対応するIncyteポリペプチド配列番号(IncyteポリペプチドID)を示す。列3は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列4および列5はそれぞれ、GCG配列分析ソフトウェアパッケージのMOTIFSプログラム(Genetics Computer Group, Madison WI)によって決定された、リン酸化およびグリコシル化の可能性のある部位を示す。列6は、シグネチャ配列、ドメイン、およびモチーフを含むアミノ酸残基を示す。列7は、タンパク質の構造/機能の分析のための分析方法を示し、該当箇所にはさらに分析方法に利用した検索可能なデータベースを示す。

【0146】

表2及び表3は共に、本発明の各々のポリペプチドの特性を要約しており、それらの特性は、請求の範囲に記載されたポリペプチド群が脂質結合分子であることを確立している。例えば、SEQ ID NO:1はM336残基~R989残基でヒトの細胞質ゾルホスホリパーゼA2ベータ(GenBank ID gg4886978)と43%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された。(表2参照)。BLAST確率スコアは $1.6e-161$ であり、これは観察されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。別の例では、SEQ ID NO:3はM1残基~Y644残基でラットのホスホリパーゼCデルタ4(GenBank ID g4894788)と41%の同一性を有することがBLASTによって示され、確率スコアは $2.5e-126$ であった。(表2参照)。SEQ ID NO:3はまた、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼCのXとYドメインおよびC2ドメインを有する。これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。BLIMPS分析から得たデータは、SEQ ID NO:3がホスホリパーゼCであることを裏づける証拠を更に提供する。別の例で

10

20

30

40

50

は、SEQ ID NO:5 はM1残基～N316残基でヒトのホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1(GenBank ID g4090960)と40%の同一性を有することがBLASTによって示され、確率スコアは $3.1e-63$ であった。(表2参照)。また、SEQ ID NO:5 はリパーゼドメインを持っているが、これはHMMベースのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された。(表3参照)。BLIMPS解析よりのデータは、SEQ ID NO:5 がリパーゼである、さらに実証的な証拠を提供する。別の例では、SEQ ID NO:6 はC41残基～I491残基で45%、K582残基～K899残基で39%、S541残基～G603残基で33%、S519残基～L571残基で22%の同一性をマウスのホスホリパーゼC-L2L2 (GenBank ID g6705987)に対して持っていることがBLASTによって示された。確率スコアはC41残基～I491残基で $1.1e-164$ 、K582残基～K899で $1.1e-164$ 、S541残基～G603残基で $1.0e-56$ 、S519残基～L571残基で $1.1e-55$ だった。(表2参照)。また、SEQ ID NO:6 はホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ活性部位ドメインを持っているが、これはHMMベースのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された。(表3参照)。BLIMPS及びMOTIFS解析よりのデータは、SEQ ID NO:6がホスホリパーゼであることをさらに確認する証拠を提供する。別の例では、SEQ ID NO:7 はM1残基～K1294残基でマウスのM-RdgB2 レチナル変性タンパク質Bサブタイプ2(GenBank ID g5771350)に対して90%の同一性を有することがBLASTによって示され、確率スコアは0.0であった。(表2参照)。また、SEQ ID NO:7 はホスファチジルイノシトール伝達タンパク質ドメインを持っているが、これはHMMベースのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された。(表3参照)。BLIMPS、MOTIFS、及びBLAST解析よりのデータは、SEQ ID NO:7 がホスファチジルイノシトール伝達タンパク質であるという、さらに確認的な証拠を提供する。別の例では、SEQ ID NO:9 はR387残基～T546残基で81%、T181残基～Q358残基で69%、A2～D191残基で61%の同一性をマウスのTAGLベータ(GenBank ID g6651241)に対して持っていることがBLASTによって示され、確率スコアは $3.8e-188$ であった。(表2参照)。BLAST解析よりのデータは、SEQ ID NO:9がタンパク質ペプチドグリカン認識前駆体である、さらに実証的な証拠を提供する。SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:8は同じような方法で解析し、注釈を付けた。SEQ ID NO:1-9の解析用のアルゴリズム及びパラメータを表7に記載した。

【0147】

表4に示すように、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列は、cDNA配列またはゲノムDNA由来のコード(エキソン)配列を用いて、或いはこれら2種類の配列を任意に組み合わせることで構築した。列1は本発明の各ポリヌクレオチドに対するポリヌクレオチド配列識別番号(ポリヌクレオチドSEQ ID NO)および対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(Incyte ID)、および塩基対の各ポリヌクレオチド配列の長さを示している。列2は、本発明の全長ポリヌクレオチド配列を構築するために使われたcDNA配列および/またはゲノム配列のヌクレオチド開始位置(5')と終了位置(3')を示し、またSEQ ID NO:10-18を同定するための、またはSEQ ID NO:10-18と関連するポリヌクレオチド配列とを区別するための技術(例えば、ハイブリダイゼーション技術または増幅技術)で有用なポリヌクレオチド配列の断片のヌクレオチド開始位置(5')と終了位置(3')を示す。

【0148】

表4の列2で記述されたポリヌクレオチド断片は、具体的にはたとえば組織特異的なcDNAライブラリまたはプールされたcDNAライブラリに由来するIncyte cDNAを指す場合がある。或いは列2に記載したポリヌクレオチド断片は、完全長ポリヌクレオチド配列の構築(アセンブリ)に寄与したGenBank cDNAまたはESTを指す場合もある。更に、列2に記載したポリヌクレオチド断片は、ENSEMBL(The Sanger Centre、英国ケンブリッジ)データベースに由来する配列を同定する場合もある(すなわち「ENST」の命名を含む配列)。あるいは、列2に記載したポリヌクレオチド断片は、NCBI RefSeq Nucleotide Sequence Recordsデータベースに由来する場合もあり(すなわち「NM」または「NT」の命名を含む配列)、またNCBI RefSeq Protein Sequence Recordsに由来する場合もある(すなわち「NP」の命名を含む配列)。または列2に記したポリヌクレオチド断片は、「エキソンスティック(exon-stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNAおよびGenscan予測工

10

20

30

40

50

キソン群の両方からなる集合を指す場合がある。例えば、ポリヌクレオチド配列の内、FL_XXXXXX_N₁_N₂_YYYYY_N₃_N₄として同定される配列は「スティッチされた」配列であり、その内、XXXXXXは該アルゴリズムが適用される配列のクラスターの識別番号であり、YYYYYは該アルゴリズムが作成する予測の数であり、N_{1,2,3...}がある場合には、解析中に手動で編集された特定のエキソン群を表す（実施例 5参照）。または、列 2 のポリヌクレオチド断片は「エキソストレッチング（exon-stretching）」アルゴリズムにより結び合わせたエキソンの集合を指す場合もある。例えば、ポリヌクレオチド配列の内、FLXXXXXX_gAAAAA_gBBBBB_1_Nとして同定される配列は「ストレッチ」配列の識別番号である。ここでXXXXXXはIncyteプロジェクト識別番号、gAAAAAは「エキソストレッチング」アルゴリズムを適用したヒトゲノム配列のGenBank識別番号、gBBBBBは一番近いGenBankタンパク質相同体のGenBank識別番号、またはNCBI RefSeq識別番号、Nは特定のエキソンを指す（実施例 5を参照）。あるRefSeq配列が「エキソストレッチング」アルゴリズムのためのタンパク質相同体として使用された場合では、RefSeq識別番号（「NM」、「NP」、または「NT」によって表される）が、GenBank識別（即ち、gBBBBB）の代わりに使用される場合もある。

10

【0149】

或いは、接頭コードは、手動で編集された構成配列、ゲノムDNA配列から予測された構成配列、または組み合わせられた配列解析方法から由来する構成配列を同定する。次の表は、構成配列の接頭コードと、接頭コードに対応する配列分析方法の例を列記する（実施例 4と5を参照）。

20

接頭コード	解析タイプやプログラムの例
GNN, GFG, ENST	例えば、GENSCAN (Stanford University, CA, USA) または FGENES (Computer Genomics Group, The Sanger Centre, Cambridge, UK)を用いたゲノム配列からのエキソン予測
GBI	手動で編集されたゲノム配列の解析
FL	スティッチまたはストレッチゲノム配列(<u>実施例 5</u> 参照)
INCY	EST 配列のゲノムへのマッピングからの全長転写とエキソンの予想エキソンと転写を予想するために、ゲノム位置と EST 構成データが組み合わせられる。

30

【0150】

場合によっては、最終コンセンサスポリヌクレオチド配列を確認するために、表 4 に示すような配列カバレッジと重複するIncyte cDNAカバレッジが得られたが、該当するIncyte cDNA識別番号は示さなかった。

【0151】

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

40

【0152】

本発明には、また、LIPAMの変異配列群をも含む。好適なLIPAM変異配列は、LIPAMの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有し、かつ該LIPAMアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、更には少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する配列である。

50

【0153】

本発明には、また、LIPAMをコードするポリヌクレオチド群も含まれる。特定の実施態様において、本発明は、LIPAMをコードする、SEQ ID NO:10-14からなる一群から選択された1配列を持つポリヌクレオチド配列を提供する。SEQ ID NO:10-18のポリヌクレオチド配列には、配列表に示したように等価RNA配列をも含むが、そこでは窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくリボースで構成される。

【0154】

本発明は、また、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列をも含む。詳細には、このような変異体ポリヌクレオチド配列は、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列との少なくとも約70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも約85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を持つこととなる。本発明の特定の実施形態では、SEQ ID NO:10-18からなる一群から選択された1核酸配列との少なくとも約70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも約85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有する、SEQ ID NO:10-18からなる一群から選択された1配列を持つポリヌクレオチド配列の変異配列を提供する。上記したポリヌクレオチド変異配列は何れも、LIPAMの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有するアミノ酸配列をコードし得る。

【0155】

更に別の例では、本発明の或るポリヌクレオチド変異配列は、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列のスプライス変異配列である。或るスプライス変異配列はLIPAMをコードするポリヌクレオチド配列との顕著な配列同一性を持つ部分複数を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソン群の選択的スプライシングによって生ずる、配列の数ブロックの付加または欠失により、通常、より多数またはより少数のポリヌクレオチドを有することになる。或るスプライス変異配列には、約70%未満、または約60%未満、あるいは約50%未満のポリヌクレオチド配列同一性が、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列との間で全長に渡って見られるが、このスプライス変異配列のいくつかの部分には、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列の各部との、少なくとも約70%、あるいは少なくとも約85%、または少なくとも約95%、なおまたは100%の、ポリヌクレオチド配列同一性を有することとなる。上記したスプライス変異配列は何れも、LIPAMの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有する或るアミノ酸配列をコードし得る。

【0156】

遺伝暗号の縮重により、LIPAMをコードする種々のポリヌクレオチド配列が作り出され、中には、既知のいかなる天然遺伝子のポリヌクレオチド配列群とも最小の類似性しか有しない配列もあることは、当業者には理解されよう。したがって本発明には、可能コドン選択に基づく組合せの選択によって産出し得るようなありとあらゆる可能性のあるポリヌクレオチド配列変異体を網羅し得る。これらの組合せは、天然LIPAMのポリヌクレオチド配列に適用されるような標準トリプレット遺伝暗号を基に作られるものであり、このような変異は全て明確に開示されているものと考えられたい。

【0157】

LIPAMとその変異配列とをコードするヌクレオチド配列は一般に、好適に選択されたストリンジェンシー条件下で天然LIPAMのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、非天然コドン群を含めるなどの実質的に異なるコドン使用を有する、LIPAM或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作り出すことは、有益であり得る。宿主が特定のコードンを利用する頻度に基づいて、特定の真核宿主又は原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようにコードンを選択することが可能である。コードされるアミノ酸配列を改変せず、LIPAMおよびその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に改変する別の理由には、天然配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備えるRNA転写物を作ることもある。

10

20

30

40

50

【0158】

本発明にはまた、LIPAMとLIPAM誘導体とをコードする、DNA配列またはそれらの断片を、完全に合成化学によって作製する過程をも含む。作製後、当分野で公知の試薬類を用いて、この合成配列を任意の多くの入手可能な発現ベクター及び細胞系中に挿入し得る。更に、合成化学を用いて、LIPAMまたはその任意の断片をコードする配列に突然変異を誘発し得る。

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:10-18 及びそれらの断片とハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列が含まれる(例えば、Wahl, G.M.及びS.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407、Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511等を参照)。アニーリング及び洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載されている。

10

【0159】

DNAシーケンシングの方法は当分野では公知であり、本発明のいずれの実施例もDNAシーケンシング方法を用いて実施可能である。DNAシーケンシング方法には酵素を用いることができ、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Applied Biosystems)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech, Piscataway NJ)を用いることができる。或いは、例えばELONGASE増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg MD)において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼを併用することができる。好適には、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200サーマルサイクラー (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800サーマルサイクラー (Applied Biosystems)等の装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373 或いは 377 DNAシーケンシングシステム (Applied Biosystems)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) または当分野でよく知られている他の方法を用いてシーケンシングを行う。結果として得られた配列を当分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する(例えば、Ausubel, F.M. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, 7.7ユニット、Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY, 856-853ページを参照)。

20

【0160】

当分野で周知の、PCR法をベースにした種々の方法と、部分的ヌクレオチド配列とを利用して、LIPAMをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節エレメントなど、上流にある配列を検出し得る。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する方法である(例えば、Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic.* 2:318-322を参照)。別の方法に逆PCR法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列を含む制限酵素断片から得る(例えば、Triglia, T. 他 (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:8186を参照)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これはヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片をPCR増幅する方法に参与している。(Lagerstrom, M.他 (1991) *PCR Methods Applic* 1:111-119等を参照)。この方法では、PCRを行う前に複数の制限酵素の消化及びライゲーション反応を用いて未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、未知の配列を検索するために用い得る別の方法については当分野で知られている(Parker, J.D.他 (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:3055-3060等を参照)。更に、PCR、ネステッドプライマー及びPROMOTERFINDERライブラリ (Clontech, Palo Alto CA)を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、ライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部を見付けるのに有用である。全てのPCRベースの方法に対して、市販されているソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、温度約68~72で鋳型に対してアニ

30

40

50

ーリングするようにプライマーを設計し得る。

【0161】

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

【0162】

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

10

【0163】

本発明の別の実施態様では、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列群またはその断片群を組換えDNA分子類にクローニングして、適切な宿主細胞内に、LIPAM、その断片群または機能的等価物を発現させ得る。遺伝暗号固有の縮重により、実質的に同じ或いは機能的に等価の或るアミノ酸配列をコードする別のDNA配列群を産生し、これらの配列をLIPAMの発現に利用し得る。

20

【0164】

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

30

【0165】

本発明のヌクレオチドは、MOLECULARBREEDING(Maxygen Inc., Santa Clara CA. 米国特許第5,837,458号、Chang, C.-C.他(1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797、Christians, F.C.他(1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264、Cramer, A. 他(1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319に記載)等のDNAシャッフリング技術の対象となり、LIPAMの生物学的特性、例えば生物活性、酵素力、或いは他の分子や化合物との結合力等を変更または向上させ得る。DNAシャッフリングは、遺伝子断片のPCRを介する組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを作製するプロセスである。ライブラリはその後、その遺伝子変異体を所望の特性に同定するような選択またはスクリーニングにかける。次にこれらの好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリング及び選択/スクリーニングを行ってもよい。従って、人工的な育種及び急速な分子の進化によって多様な遺伝子が作られる。例えば、ランダムポイント突然変異を有する単一の遺伝子の断片を組み換えて、スクリーニングし、その後所望の特性が最適化されるまでシャッフリングすることができる。或いは、所定の遺伝子を同種または異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子と組み換え、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝多様性を、指図された制御可能な方法で最大化させることができる。

40

【0166】

別の実施態様によれば、LIPAMをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて

50

、全体或いは一部を合成可能である（例えば、Caruthers, M.H.他（1980）*Nucleic Acids Symp. Ser. 7:215223*; および Horn, T. 他（1980）*Nucleic Acids Symp. Ser. 7:22523*を参照）。別法として、化学的方法を用いてLIPAM自体またはその断片を合成することが可能である。例えば、種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる（たとえば、Creighton, T.（1984）*Proteins, Structures and Molecular Properties*, WH Freeman, New York NY, 55-60ページ; Roberge, J.Y. 他（1995）*Science* 269:202204を参照。）自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ（Applied Biosystems）を用いて達成し得る。更に、LIPAMのアミノ酸配列または任意のその一部を、直接合成の際に改変することにより、および/または他のタンパク質からの配列群または任意のその一部と組み合わせることにより、或る天然ポリペプチドの配列を有するポリペプチド、または変異体ポリペプチドを作製し得る。

10

【0167】

このペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィを用いて実質的に精製し得る（Chiez, R.M.およびF.Z. Regnier（1990）*Methods Enzymol.* 182:392-421などを参照）。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシーケンシングによって確認することができる（前出のCreighton, 28-53ページ等を参照）。

【0168】

生物学的に活性なLIPAMを発現させるために、LIPAMをコードするヌクレオチド配列またはそれらの誘導体を好適な発現ベクターに挿入することができる。好適な発現ベクターとは、好適な宿主に挿入されたコーディング配列の転写と翻訳との制御に必要なエレメント群を持つベクターである。必要なエレメントの例には、該ベクターに、またLIPAMをコードするポリヌクレオチド配列群における調節配列（エンハンサー、構成型および発現誘導型のプロモーター、5'および3'の非翻訳領域など）が含まれる。このような要素は、長さ及び特異性が様々である。特定の開始シグナル類によって、LIPAMをコードする配列の、より効果的な翻訳を達成することも可能である。このようなシグナルには、ATG開始コドンと、コザック配列などの近傍の配列が含まれる。LIPAMをコードする配列、およびその開始コドンや、上流の調節配列が、好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写制御シグナルや翻訳制御シグナルは必要ない場合もある。しかしながら、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、インフレームのATG開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現ベクターに含まれるようにすべきである。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である。（Scharf, D. 他（1994）*Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162.等を参照）。

20

30

【0169】

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

40

【0170】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、LIPAMをコードする配列を保持および発現し得る。限定するものではないがこのような発現ベクター/宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌などの微生物等や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌や、ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMVまたはタバコモザイクウイルスTMV）または細菌発現ベクター（例えばTiプラスミドまたはpBR322プラスミド）で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系がある。（前出のSambrook、前出のAusubel、Van Heeke, G. and S.M. Schuster（1989）

50

J. Biol. Chem. 264:5503-5509、; Engelhard, E.K. ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V. ら (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945、Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6:307-311、; 『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, 191-196ページ、Logan, J. and T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659、Harrington, J.J. ら (1997) Nat. Genet. 15:345-355等を参照)。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ輸送することができる (Di Nicola, M. 他 (1998) Cancer Gen. Ther. 5(6):350-356、Yu, M. 他 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(13):6340-6344、Buller, R.M. 他 (1985) Nature 317(6040):813-815; McGregor, D.P. 他 (1994) Mol. Immunol. 31(3):219-226、Verma, I.M. 及び N. Somia (1997) Nature 389:239-242等を参照)。本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

10

20

30

40

50

【0171】

細菌系では、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて多数のクローニングベクターおよび発現ベクターを選択し得る。例えば、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列の慣例的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) または PSPORT1 プラスミド (Life Technologies) などの多機能の大腸菌ベクターを用いることができる。ベクターのマルチクローニング部位に、LIPAMをコードする配列をライゲーションすると lacZ 遺伝子が破壊され、組換え分子を持つ形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更にこれらのベクターは、クローニングされた配列における *in vitro* 転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう (例えば、Van Heeke, G. および S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509を参照)。例えば、抗体の産生のためなどに多量のLIPAMが必要な場合は、LIPAMの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力な誘導SP6バクテリオファージプロモーターまたは誘導T7バクテリオファージプロモーターを含むベクターが使用できる。

【0172】

酵母発現系を用いてLIPAMを産生し得る。因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモーター等の構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多数のベクターが、出芽酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) またはピキア酵母 (*Pichia pastoris*) に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の分泌か細胞内への保持のどちらかを誘導し、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列を組み込む。(例えば、Ausubel, 1995, 前出、Bitter, G.A. 他 (1987) Methods Enzymol. 153:516-544、及び Scorer, C. A. 他 (1994) Bio/Technology 121:181-184.を参照)。

【0173】

植物系もLIPAMの発現に使用可能である。LIPAMをコードする配列の転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独或いはTMV (Takamatsu, N. (1987) EMBO J 6:307-311) 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて用いられるような、CaMV由来の35Sおよび19Sプロモーターによって駆動し得る。或いは、RUBISCOの小サブユニット等の植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを用いてもよい (例えば、Coruzzi, G. 他 (1984) EMBO J. 3:1671-1680; Broglie, R. 他 (1984) Science 224:838-843; および Winter, J. 他 (1991) Results Probl. Cell Differ. 17:85-105を参照) これらの構成物は、直接DNA形質転換または病原体を媒介とする形質移入によって、植物細胞内に導入可能である。(『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, 191-196ページ等を参照)。

【0174】

哺乳動物細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。アデノウイルスを発現ベクターとして用いる場合、後期プロモーターと3連リーダー配列とを持つアデノウイルス転写/翻訳複合体に、LIPAMをコードする配列を結合し得る。アデノウイルスゲ

ノムの非必須E1またはE3領域へ挿入することにより、宿主細胞内でLIPAMを発現する感染ウイルスを得ることができる(例えば、Logan, J. および T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659を参照)。更に、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサー等の転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させ得る。SV40またはEBVをベースにしたベクターを用いてタンパク質を高レベルで発現させることもできる。

【0175】

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

【0176】

哺乳動物系内の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、細胞株におけるLIPAMの安定した発現が望ましい。例えば、LIPAMをコードする配列を細胞株に形質転換するために、発現ベクター類と、同じ或いは別のベクター上の選択可能マーカー遺伝子とを用い得る。用いる発現ベクターは、複製のウイルス起源、および/または内因性の発現エレメント群を持ち得る。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約1 ~ 2日間細胞を増殖させることができる。選択可能マーカーの目的は選択培地への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーが存在することにより、導入された配列をうまく発現するような細胞の成長及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖可能である。

【0177】

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものではないがこのような選択系には、 tk^{-} 単純細胞のために用いられるヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子と、 apr^{-} 細胞のために用いられるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある(例えば、Wigler, M. 他 (1977) Cell 11:223-232; 及びLowy, I. 他 (1980) Cell 22:817-823を参照)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を用いることができる。例えばdhfrはメトトレキセートに対する耐性を与え、neoはアミノグリコシッドネオマイシン及びG-418に対する耐性を与え、alsはクロルスルフロロンに対する耐性を、patはホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える(Wigler, M. 他 (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570; ColbereGarapin, F. 他 (1981) J. Mol. Biol. 150:114 等を参照。)この他の選択可能な遺伝子、例えば、代謝のための細胞の必要条件を変える $trpB$ 及び $hisD$ は、文献に記載されている(Hartman, S.C. および R.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:804-805を参照。)可視マーカー、例えばアントシアニン、緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質 グルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である(Rhodes, C.A. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131 等を参照)。

【0178】

マーカー遺伝子発現の存在/不存在によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在及び発現の確認が必要な場合もある。例えば、LIPAMをコードする配列がマーカー遺伝子配列の中に挿入された場合、LIPAMをコードする配列を含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により同定可能である。または、単一プロモーターの制御下で、或るマーカー遺伝子が、LIPAMをコードする1配列とタンデムに配置されることも可能である。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子の発現も示す。

【0179】

一般に、LIPAMをコードする核酸配列を持ち、LIPAMを発現する宿主細胞は、当業者に周知

の種々の方法を用いて特定できる。これらの方法には、DNA - DNA或いはDNA - RNAハイブリダイゼーションや、PCR法、核酸或いはタンパク質の検出及び/または数量化のための膜系、溶液ベース、或いはチップベースの技術を含むタンパク質生物学的試験法または免疫学的アッセイが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0180】

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

10

【0181】

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

20

30

【0182】

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

【0183】

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

40

【0184】

本発明の別の実施例では、LIPAMをコードする、天然の核酸配列、修飾された核酸配列、

50

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

10

【0185】

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

20

【0186】

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

【0187】

或る実施態様では、このように同定された化合物は、LIPAMの天然リガンドに密接に関連し、例えばリガンドやその断片であり、または天然基質や、構造的または機能的な擬態物質 (mimetic)、あるいは自然結合パートナーである (Coligan, J.E. 他 (1991) Current Protocols in Immunology 1(2)の5章等を参照)。同様に、この化合物は、LIPAMが結合する天然受容体に、或いは例えばリガンド結合部位など少なくともこの受容体の或る断片に、密接に関連し得る。何れの場合も、既知の技術を用いてこの化合物を合理的に設計することができる。一実施例では、このような化合物に対するスクリーニングには、分泌タンパク質或いは細胞膜上のタンパク質の何れか一方としてLIPAMを発現する好適な細胞の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、ショウジョウバエ、または大腸菌からの細胞が含まれる。LIPAMを発現する細胞、またはLIPAMを含有する細胞膜分画を試験化合物と接触させて、結合や、LIPAMまたは該化合物のどちらかの、刺激または活性の阻害を分析する。

30

40

【0188】

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

50

【0189】

本発明のLIPAMまたはその断片を用いて、LIPAMの活性を調節する化合物をスクリーニングすることが可能である。このような化合物には、アゴニスト、アンタゴニスト、部分的アゴニスト、または逆アゴニスト等が含まれる。一実施態様では、LIPAMの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、そのアッセイでは少なくとも1つの試験化合物をLIPAMと混合し、試験化合物の存在下でLIPAMの活性を試験化合物不在下でのLIPAMの活性と比較する。試験化合物の存在下でのLIPAMの活性の変化は、LIPAMの活性を調節する化合物の存在を示唆する。別法では、試験化合物を、LIPAMの活性に適した条件下で、LIPAMを有する *in vitro*系すなわち無細胞系と混合してアッセイを実施する。これらアッセイの何れにおいても、LIPAMの活性を調節する試験化合物は間接的に調節する場合があり、その際は試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも1つから複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

10

【0190】

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

20

【0191】

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

30

【0192】

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

40

【0193】

(治療)

LIPAMの複数の領域と脂質結合分子類との間には、例えば配列およびモチーフの文脈における、化学的および構造的類似性が存在する。また、LIPAMを発現する組織の例としては正常な肺、癌を持つ肺および病気の甲状腺組織などがあり、また表6を参照されたい。このように、LIPAMは、癌、神経障害、自己免疫/炎症性障害、胃腸障害、心血管障害、お

50

よび脂質代謝の障害において或る役割を果たすと考えられる。LIPAMの発現または活性の増大に関連する疾患の治療においては、LIPAMの発現または活性を低下させることが望ましい。また、LIPAMの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、LIPAMの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0194】

したがって、一実施態様において、LIPAMの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、被験者にLIPAMまたはその断片や誘導体を投与し得る。限定するものではないがこのような疾患の例としては、癌（例えば腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌など、詳細には副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、胃腸管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌）が含まれ、また心血管障害も含まれ、その中には動静脈瘤、アテローム性動脈硬化症、高血圧、脈管炎、レイノー病、動脈瘤、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎および静脈血栓、血管系腫瘍、血栓溶解の合併症、バルーン血管形成術、血管置換術、冠動脈バイパス移植、うっ血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪部石灰化、僧帽弁逸脱、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性紅斑性狼瘡の心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、心臓移植の合併症、先天性肺異常、肺拡張不全、肺うっ血および肺水腫、肺動脈塞栓症、肺出血、肺梗塞、肺高血圧症、血管硬化症、閉塞性肺疾患、拘束性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患、肺気腫、慢性気管支炎、気管支喘息、気管支拡張症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎およびマイコプラズマ肺炎、肺膿瘍、肺結核、びまん性間質性疾患、塵肺症、サルコイド症、特発性肺線維症、剥離性間質性肺炎、過敏性肺炎、肺好酸球増加、閉塞性細気管支炎 器質化肺炎（bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia）、びまん性肺出血症候群、グッドパスチャー症候群、特発性肺血鉄症、膠原血管病併発性肺疾患、肺胞タンパク症、肺腫瘍、炎症性および非炎症性胸水、気胸症、胸膜腫瘍、薬物性肺疾患、放射線による肺疾患、および肺移植の合併症などが含まれる。神経障害として、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、脳腫瘍、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化その他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、網膜色素変性症（色素性網膜炎）、遺伝性運動失調、多発性硬化症その他の脱髄疾患、細菌性およびウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎および神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー、クロイツフェルト ヤコブ病およびゲルストマン シュトロイスラー シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病および代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管腫症（cerebelloretinal hemangioblastomatosis）、脳3叉神経血管症候群、精神遅滞、ダウン症候群を含むその他の中枢神経系発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、末梢神経疾患、皮膚筋炎および多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性および中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害および統合失調症（精神分裂病）を含む精神障害と、季節性感情障害（SAD）と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、遅発性ジスキネジア、ジストニー、パラノイド精神病、帯状疱疹後神経痛、トゥレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症、家族性前頭側頭痴呆が含まれ、また自己免疫/炎症疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィー（APECED）、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球傷害因子性偶発性リンパ球減少症（episodic lymphopenia with lymphocytotoxins）、新生児溶血性疾患（胎児赤芽球症）、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋

無力症、心筋または心膜の炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性紅斑性狼瘡、全身性強皮症 (systemic sclerosis)、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の合併症、血液透析、体外循環、ウイルス性感染症、細菌性感染症、真菌性感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症および外傷が含まれ、また胃腸障害も含まれ、その中には嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アンギナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動的うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホウィップル病、マロリー ワイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、脂肪肝、血色素症、ウィルソン病、 γ アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞および血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性脂肪肝、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性過形成および腺腫、癌腫を含む肝癌が含まれ、脂質代謝障害として、脂肪肝、胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変、カルニチン欠乏症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠乏症、ミオアデニル酸デアミナーゼ欠損症、高トリグリセリド血症と、ファブリー病などの脂質貯蔵病、ゴーシェ病、ニーマン ピック病、異染性白質ジストロフィー、副腎白質ジストロフィー、GM₂ ガングリオシド蓄積症、セロイドリポフスチン症、無リポ蛋白血症、タンジアー病、高リポ蛋白血症、糖尿病、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪壊死、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、微小変化型ネフローゼ、脂肪腫、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症を伴った高コレステロール血症、原発性低リポ蛋白血症、甲状腺機能低下症、腎疾患、肝疾患、レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠損症、脳髄黄色腫症、シトステロール血症、低コレステロール血症、テイ サックス病、サンドホフ病、高脂血症、高脂質血症、脂質筋障害、肥満症が含まれる。

10

20

30

40

50

【0195】

別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、LIPAMの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、LIPAMまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを被験者に投与し得る。

【0196】

更に別の実施態様では、限定するものではないが上記した疾患を含む、LIPAMの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、実質的に精製されたLIPAMを有する組成物を好適な医薬用キャリアと共に被験者に投与し得る。

【0197】

更に別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、LIPAMの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、LIPAMの活性を調節するアゴニストを被験者に投与し得る。

【0198】

更なる実施例では、LIPAMの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、被験者にLIPAMのアンタゴニストを投与し得る。限定するものではないが、このような疾患の例には、上記した癌、神経障害、自己免疫/炎症疾患、胃腸障害、心血管障害、および、脂質代謝の障害が含まれる。一実施態様では、LIPAMと特異的に結合する抗体が直接アンタゴニストとして、或いはLIPAMを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲティング機構或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

【0199】

別の実施例では、LIPAMをコードするポリヌクレオチドの相補配列を発現するベクターを被験者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含む、LIPAMの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防を成し得る。

別の実施例では、本発明の任意のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補配列、またはベクターを、別の好適な治療薬と組み合わせて投与することもできる。併用療法で用いる好適な治療薬は、当業者が従来の医薬原理に従って選択し得る。治療薬と組み合わせることにより、上記した種々の疾患の治療または予防に相乗効果をもたらす得る。この方法を用いることにより少量の各薬剤で医薬効果をあげることが可能となり、それによって副作用の可能性を低減し得る。

【0200】

LIPAMのアンタゴニストは、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造し得る。具体的には、精製されたLIPAMを用いて抗体を作るか、治療薬のライブラリをスクリーニングして、LIPAMと特異結合するものを同定することが可能である。LIPAMへの抗体も、本技術分野で公知の方法を用いて製造することが可能である。限定するものではないがこのような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fab断片、およびFab発現ライブラリによって作られた断片が含まれ得る。中和抗体（即ち二量体の形成を阻害する抗体）は通常、治療用に好適である。（ラクダやラマの）一本鎖抗体は強力な酵素阻害剤である可能性があり、ペプチド擬態の設計および免疫吸着剤およびバイオセンサの開発に有用である可能性がある(Muyldermans, S. (2001) J. Biotechnol. 74:277-302)。

10

【0201】

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

20

【0202】

LIPAMに対する抗体を誘導するために用いるオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、少なくとも約5個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を持つものが好ましく、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものとなる。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であることが望ましい。LIPAMアミノ酸の短いストレッチは、KLHなど別のタンパク質の配列と融合させることができ、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

30

【0203】

LIPAMに対するモノクローナル抗体は、培地内の連続した細胞株によって抗体分子を産生する任意の技術を用いて作製できる。限定するものではないがこのような技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術及びEBV-ハイブリドーマ技術がある（Kohler, G. 他 (1975) Nature 256:495-497, Kozbor, D. 他 (1985) J. Immunol. Methods 81:31-42, Cote, R.J. 他 (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030, Cole, S .P. 他 (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120等を参照）。

40

【0204】

更に、「キメラ抗体」作製のために発達したヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を備える分子を得るために用いられる（例えば、Morrison, S.L.他 (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851685 5; Neuberger, M.S.他 (1984) Nature 312:604-608; Takeda, S.他 (1985) Nature 314:452,454を参照。）別法では、当分野で周知の方法を用い、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、LIPAM特異的一本鎖抗体を生成する。関連特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる（Burton D.R. (1991) Proc.

50

Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137等を参照)。

【0205】

抗体の産生は、リンパ球集団における *in vivo* 産生の誘導によって、或いは文献に開示されているように非常に特異的な結合試薬の免疫グロブリンのライブラリまたはパネルのスクリーニングによっても行い得る (Orlandi, R. 他 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837、Winter, G. 他 (1991) Nature 349:293-299等を参照)。

【0206】

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

【0207】

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定することができる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる免疫放射定量測定法または競合結合試験に対する数々のプロトコルは、本技術分野において公知である。このようなイムノアッセイは通常、LIPAMとその特異抗体との間の複合体形成の計測を含む。2つの非干渉性LIPAMエピトープに対して反応性を持つモノクローナル抗体群を用いる、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合結合試験も利用できる (Pound、前出)。

【0208】

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

【0209】

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

【0210】

本発明の別の実施例では、LIPAM をコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片や相補配列を、治療目的で使用することができる。ある実施態様では、LIPAM をコードする遺伝子のコーディング領域や調節領域に相補的な配列やアンチセンス分子 (DNA、RNA、PNA、または修飾したオリゴヌクレオチド) を設計して遺伝子発現を変更することができる。このような技術は当分野では周知であり、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはより大きな断片を、LIPAM をコードする配列の制御領域、またはコード領域に沿った、さま

10

20

30

40

50

ざまな位置から設計可能である(Agrawal, S., ed. (1996) Antisense Therapeutics, Humana Press Inc., Totawa NJを参照。)

【0211】

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

10

20

30

【0212】

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

40

【0213】

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

【0214】

LIPAMの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAX、PCR2-TOPOTAベクター(Invitrogen, Carlsbad CA)、PCM V-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA)、PTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA)が含まれる。LIPAMを発現させるために、(i) 構成的に活性化プロモーター(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、ラウ

50

ス肉腫ウイルス (RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ (TK)、若しくは - アクチンの遺伝子など)、(ii)誘導性プロモーター (例えば、市販されているT-REXプラスミド (Invitrogen) に含まれている、テトラサイクリン調節性プロモーター (Gossen, M. および H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551; Gossen, M. 他 (1995) Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. および H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456))、エクジソン誘導性プロモーター (市販されているプラスミドPVGRXRおよびPINDIに含まれている: Invitrogen)、FK506/ラパマイシン誘導性プロモーター、またはRU486/ミフェプリストーン誘導性プロモーター (Rossi, F.M.V. および H.M. Blau, 前出)、または (iii) 正常な個体に由来する、LIPAMをコードする内在遺伝子の天然プロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用い得る。

10

【0215】

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

【0216】

本発明の別の実施例では、LIPAMの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や障害を、(i)レトロウイルス長末端反復配列 (LTR) プロモーター若しくは或る独立プロモーターのコントロール下でLIPAMをコードするポリヌクレオチドと、(ii)好適なRNAパッケージングシグナル群と、(iii)追加のレトロウイルス・シス作用性RNA配列と、効率的なベクター増殖に必要なコーディング配列とを伴うRev応答性エレメント (RRE) と、からなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター (例えばPFB及びPFBNE0) はStratagene社から市販されており、刊行データ (Riviere, I. 他 (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:6733-6737) に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。ベクターは、好適なベクター産生細胞株 (VPCL) において増殖され、VPCLは、標的細胞上の受容体に対する親和性を有するエンベロープ遺伝子またはVSVg等の汎親和性エンベロープタンパク質を発現する (Armentano, D. 他 (1987) J. Virol. 61:1647-1650、Bender, M.A. 他 (1987) J. Virol. 61:1639-1646、Adam, M.A. および A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806、Dull, T. 他 (1998) J. Virol. 72:8463-8471、Zufferey, R. 他 (1998) J. Virol. 72:9873-9880)。RIGGに付与された米国特許第5,910,434号 (「Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant」) において、レトロウイルスパッケージング細胞系を得るための方法が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖、細胞集団 (例えばCD4⁺ T細胞) の形質導入、及び形質導入した細胞の患者への戻しは、遺伝子治療の分野では当業者に公知の方法であり、多数の文献に記載されている (Ranga, U. 他 (1997) J. Virol. 71:7020-7029、Bauer, G. 他 (1997) Blood 89:2259-2267、Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716、Ranga, U. 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:1201-1206、Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

20

30

40

【0217】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の或る送達系を用いて、LIPAMの発現に関連する1つ以上の遺伝子異常を有する細胞群に、LIPAMをコードするポリヌクレオチド群を送達する。アデノウイルス系ベクターの作製及びパッケージングについては、当業者に公知である。複製欠損型アデノウイルスベクターは、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を臍臓の無損傷の臍島内に導入するために融通のきくことが証明された (Csete, M.E. 他 (1995) Transplantation 27:263-268)。潜在的に有用なアデノウイルスベクター類はArmentanoに付与された米国特許第5,707,618号 (「Adenovirus vectors for gene therapy」) に記載されており、引用することを以て本明細書の一部とする。アデノウイルスベクタ

50

ーについては、Antinozzi, P.A. 他 (1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19:511-544 及び Verma, I.M. 及び N. Somia (1997) *Nature* 18:389:239-242も参照されたい。両文献は、引用することをもって本明細書の一部とする。

【0218】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、LIPAMの発現に関連する1つ或いは複数の遺伝子異常を有する標的細胞に、LIPAMをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純ヘルペスウイルス(HSV)系類は、HSVが親和性を持つ中枢神経細胞にLIPAMを導入する際に、特に有益に思える。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは、当業者に公知である。複製適格性単純ヘルペスウイルス(HSV) I型系のベクターは、レポーター遺伝子を霊長類の眼に送達するために用いられてきた(Liu, X. 他 (1999) *Exp. Eye Res.* 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製についても、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号(「Herpes simplex virus swains for gene transfer」)に開示されており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモーターの制御下において細胞に導入される少なくとも1つの外在性遺伝子を有するゲノムを含む組換えHSV d92についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27及びICP22のために除去される組換えHSV系統の作製及び使用について開示している。HSVベクターについては、Goins, W.F. 他 (1999) *J. Virol.* 73:519-532 及び Xu, H. ら (1994) *Dev. Biol.* 163:152-161も参照されたい。両文献は、引用をもって本明細書の一部とする。クローン化ヘルペスウイルス配列の操作、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なった部分を含む多数のプラスミドを形質移入した後の組換えウイルスの産生、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びにヘルペスウイルスの細胞への感染は、当業者に公知の技術である。

【0219】

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

【0220】

転写開始部位由来のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を阻害することも可能である。転写開始部位とは例えば開始部位から数えて約-10と約+10の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん塩基対形成は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために十分に開くような二重らせんの能力を阻害するので、三重らせん塩基対形成は有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある(Gee, J.E. 他 (1994) in: Huber, B.E. and B.I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, 50

163-177ページ等を参照。)相補配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するべく設計することができる。

リボザイムは酵素性RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用のメカニズムは、相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異性ハイブリダイゼーションとその後に起こる内ヌクレオチド鎖切断に關与している。例えば、人工的に作製されたハンマーヘッド型リボザイム分子が、LIPAMをコードする配列の内ヌクレオチド鎖切断を特異的且つ効果的に触媒する可能性がある。

【0221】

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

【0222】

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

【0223】

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

【0224】

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

【0225】

特異ポリヌクレオチドの変異発現における有効性に対して、少なくとも1個から複数個の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物は、当分野で通常知られている任意の方法により得られる。このような方法には、ポリヌクレオチドの発現を変異させる場合と、

既存の、市販のまたは専売の、天然または非天然の化合物ライブラリから選択する場合と、標的ポリヌクレオチドの化学的及び/または構造的特性に基づく化合物を合理的にデザインする場合と、組合せ的にまたは無作為に生成した化合物のライブラリから選択する場合に有効であることが知られているような化合物の化学修飾がある。LIPAMをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルは、このようにして得られた試験化合物の少なくとも1つに曝露する。サンプルには例えば、無傷細胞、透過化処理した細胞、無細胞再構成系または再構成生化学系があり得る。LIPAMをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で周知の任意の方法でアッセイする。通常は、LIPAMをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特定のヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーション量を定量し、それによって1つ若しくは複数の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較に対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を変異する際に試験化合物が有効であることを示している。特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物に対して、例えば分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 遺伝子発現系 (Atkins, D. 他 (1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. 他 (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:E15) またはHeLa細胞等のヒト細胞系 (Clarke, M.L. 他 (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13) を用いてスクリーニングを実行する。本発明の特定の実施例は、特異的ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性のためのオリゴヌクレオチド (デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、修飾オリゴヌクレオチド) の組み合わせライブラリをスクリーニングすることに関与している (Bruce, T.W. 他 (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruce, T.W. 他 (2000) 米国特許第6,022,691号)。

10

20

【0226】

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

【0227】

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

30

【0228】

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

【0229】

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

40

【0230】

肺から投与する組成物は、液状または乾燥粉末状で調製し得る。このような組成物は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子 (例えば従来の低分子量有機薬) の場合には、速効製剤のエアロゾル送達は当分野で公知である。高分子 (例えばより大きなペプチド及びタンパク質) の場合には、当該分野において肺の肺泡領域を介しての肺送達最近向上したことにより、インスリン等の薬剤を実質的に血液循環へ輸送することを可能にした (Patton, J.S. 他, 米国特許第5,997,848号等を参照)。肺送達は、針注射なしに

50

投与する点で優れており、有毒な可能性のある浸透エンハンサーの必要性をなくす。

【0231】

本発明での使用に適した組成物には、所定の目的を達成するために必要なだけの量の活性成分を含有する組成物が含まれる。有効投与量の決定は、当業者の能力の範囲内で行う。

【0232】

LIPAMまたはその断片を含む高分子を直接細胞内に輸送するべく、特殊な種々の形状の組成物が調製され得る。例えば、細胞不透過性高分子を含むリポソーム製剤は、細胞融合及び高分子の細胞内送達を促進し得る。別法では、LIPAMまたはその断片を、HIV Tat-1タンパク質の陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質は、マウスモデル系の脳を含む全ての組織の細胞に形質導入することがわかっている (Schwarze, S.R. 他 (1999) Science 285:1569-1572)。

10

【0233】

任意の化合物に対して、細胞培養アッセイ、例えば新生物性細胞の細胞培養アッセイにおいて、或いは、動物モデル、例えばマウス、ウサギ、イヌ、サルまたはブタ等において、先ず治療の有効投与量を推定することができる。動物モデルはまた、好適な濃度範囲及び投与経路を決定するためにも用い得る。このような情報を用いて、次にヒトに対する有益な投与量及び投与経路を決定することができる。

【0234】

治療有効投与量とは、症状や容態を回復させる、たとえばLIPAMまたはその断片、LIPAMの抗体、LIPAMのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなど活性処方成分の量を指す。薬用有効度及び毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって、例えばED₅₀ (集団の50%の治療有効量) またはLD₅₀ (集団の50%の致死量) を測定するなどして決定することができる。毒性効果の治療効果に対する投与量の比は、治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表すことができる。高い治療指数を示すような組成物が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトに用いるための投与量の範囲を調剤するのに用いられる。このような組成物が含まれる投与量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、ED₅₀を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投与形態、患者の感受性及び投与の経路によって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

20

【0235】

正確な投与量は、治療が必要な被験者に関する要素を考慮して、現場の医者が決定することになる。効果的なレベルの活性成分を与え、或いは所望の効果を維持するべく、投与量及び投与を調節する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、患者の通常の状態、患者の年齢、体重及び性別、投与の時間及び頻度、薬剤の配合、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮する。作用期間が長い組成物は、特定の薬剤の半減期及びクリアランス率によって3~4日毎に1度、1週間に1度、或いは2週間に1度の間隔で投与し得る。

30

【0236】

通常投与量は、投与の経路にもよるが約0.1~100,000 µgであり、合計で約1gまでとする。特定の投与量及び送達方法に関するガイダンスは文献に記載されており、現場の医者は通常それを利用することができる。当業者は、タンパク質またはインヒビターに対する処方とは異なる、ヌクレオチドに対する処方を利用することになる。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は、特定の細胞、状態、位置等に特異的なものとなる。

40

【0237】

(診断)

別の実施例では、LIPAMに特異的に結合する抗体を、LIPAMの発現によって特徴付けられる障害の診断に、または、LIPAMやLIPAMのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターで治療を受けている患者をモニターするためのアッセイに用い得る。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所記載した方法と同じ方法で調合される。LIPAMの診断アッセイ

50

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

【0238】

LIPAMを測定するためのELISA, RIA, およびFACSなど、種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変化した或いは異常なレベルのLIPAMの発現を診断するための基礎を提供する。正常あるいは標準的なLIPAMの発現の値は、複合体の形成に適した条件下で、正常な哺乳動物、例えばヒトなどの被験者から採取した体液または細胞抽出物と、LIPAMに対する抗体とを混合することによって確定する。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。被験者、対照、および、生検組織からの疾患サンプルでの、LIPAMの発現の量を標準値と比較する。標準値と被験者との偏差が疾患を診断するパラメータとなる。

10

【0239】

本発明の別の実施態様によれば、LIPAMをコードするポリヌクレオチドを診断のために用いることもできる。用いられることができるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的RNA及びDNA分子、そしてPNAが含まれる。これらのポリヌクレオチドを用いて、LIPAMの発現が疾患と関連し得る生検組織における遺伝子発現を検出し定量し得る。この診断アッセイを用いて、LIPAMの存在の有無、更には過剰な発現を判定し、治療時のLIPAMレベルの調節を監視する。

20

【0240】

或る実施形態では、LIPAMまたは近縁の分子をコードする、ゲノム配列などポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブ類とのハイブリダイゼーションを、LIPAMをコードする核酸配列を同定するために用いることができる。プローブが高度に特異的な領域（例えば5'調節領域）から作られている、或いはやや特異性の低い領域（例えば保存されたモチーフ）から作られているかにかかわらず、プローブの特異性と、ハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェンシーとによって、そのプローブがLIPAMをコードする天然配列のみを同定するかどうか、或いは対立遺伝子や関連配列を同定するかどうかが決まることとなる。

30

【0241】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用でき、また、LIPAMをコードする任意の配列との少なくとも50%の配列同一性を有し得る。目的の本発明のハイブリダイゼーションプローブとしては、DNAあるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO:10-18の配列に、あるいはLIPAM遺伝子のプロモーター、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

【0242】

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

40

【0243】

LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列を、LIPAMの発現に関係する疾患の診断に用い得る。限定するものではないがこのような疾患の例としては、癌（例えば腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌など、詳細には副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、胃腸管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、脾臓、副甲状腺、

50

陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌)が含まれ、また心血管障害も含まれ、その中には動静脈瘤、アテローム性動脈硬化症、高血圧、脈管炎、レイノー病、動脈瘤、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎および静脈血栓、血管系腫瘍、血栓溶解の合併症、バルーン血管形成術、血管置換術、冠動脈バイパス移植、うっ血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪部石灰化、僧帽弁逸脱、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性紅斑性狼瘡の心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、心臓移植の合併症、先天性肺異常、肺拡張不全、肺うっ血および肺水腫、肺動脈塞栓症、肺出血、肺梗塞、肺高血圧症、血管硬化症、閉塞性肺疾患、拘束性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患、肺気腫、慢性気管支炎、気管支喘息、気管支拡張症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎およびマイコプラズマ肺炎、肺膿瘍、肺結核、びまん性間質性疾患、塵肺症、サルコイド症、特発性肺線維症、剥離性間質性肺炎、過敏性肺炎、肺好酸球増加、閉塞性細気管支炎 器質化肺炎 (bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia)、びまん性肺出血症候群、グッドパスチャー症候群、特発性肺血鉄症、膠原血管病併発性肺疾患、肺胞タンパク症、肺腫瘍、炎症性および非炎症性胸水、気胸症、胸膜腫瘍、薬物性肺疾患、放射線による肺疾患、および肺移植の合併症などが含まれる。神経障害として、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、脳腫瘍、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化その他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、網膜色素変性症(色素性網膜炎)、遺伝性運動失調、多発性硬化症その他の脱髄疾患、細菌性およびウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎および神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー、クロイツフェルト ヤコブ病およびゲルストマン シュトロイスラー シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病および代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管腫症(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、精神遅滞、ダウン症候群を含むその他の中枢神経系発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、末梢神経疾患、皮膚筋炎および多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性および中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害および統合失調症(精神分裂病)を含む精神障害と、季節性感情障害(SAD)と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、遅発性ジスキネジア、ジストニー、パラノイド精神病、帯状疱疹後神経痛、トゥレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症、家族性前頭側頭痴呆が含まれ、また自己免疫/炎症疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィー(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球傷害因子性偶発性リンパ球減少症(episodic lymphopenia with lymphocytotoxins)、新生児溶血性疾患(胎児赤芽球症)、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜の炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性紅斑性狼瘡、全身性強皮症(systemic sclerosis)、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の合併症、血液透析、体外循環、ウイルス性感染症、細菌性感染症、真菌性感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症および外傷が含まれ、また胃腸障害も含まれ、その中には嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アンギナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動的うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍

10

20

30

40

50

性大腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホウィップル病、マロリー ワイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、後天性免疫不全症候群（AIDS）腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、脂肪肝、血色素症、ウィルソン病、 γ アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞および血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性脂肪肝、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性過形成および腺腫、癌腫を含む肝癌が含まれ、脂質代謝障害として、脂肪肝、胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変、カルニチン欠乏症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠乏症、ミオアデニル酸デアミナーゼ欠損症、高トリグリセリド血症と、ファブリー病などの脂質貯蔵病、ゴーシェ病、ニーマン ピック病、異染性白質ジストロフィー、副腎白質ジストロフィー、GM₂ ガングリオシド蓄積症、セロイドリポフスチン症、無 リポ蛋白血症、タンジアー病、高リポ蛋白血症、糖尿病、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪壊死、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、微小変化型ネフローゼ、脂肪腫、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症を伴った高コレステロール血症、原発性低 リポ蛋白血症、甲状腺機能低下症、腎疾患、肝疾患、レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠損症、脳腱黄色腫症、シトステロール血症、低コレステロール血症、テイ サックス病、サンドホフ病、高脂血症、高脂質血症、脂質筋障害、肥満症が含まれる。LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列は、変容したLIPAM発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用する、サザーン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術、PCR法や、ディップスティック（dipstick）、ピン（pin）、およびマルチフォーマットのELISA式アッセイ、およびマイクロアレイに使用可能である。このような定性方法または定量方法は、当分野で公知である。

10

20

【0244】

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

30

【0245】

LIPAMの発現に関連する疾患の診断の基準を提供するために、発現の正常すなわち標準的なプロフィールが確立される。これは、ハイブリダイゼーションあるいは増幅に好適な条件の下、動物あるいはヒトのいずれかの正常な被験者から抽出された体液あるいは細胞と、LIPAMをコードする配列あるいはその断片とを混合することにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量用いて行った実験から得た値を正常な被験者から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾患の存在を確定する。

40

【0246】

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

【0247】

癌に関しては、個体からの生体組織における異常な量の転写物（過少発現または過剰発現）の存在は、疾患の発生素質を示したり、実際に臨床的症状が現れる前に疾患を検出する方法を提供したりし得る。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法また

50

は積極的な治療法を早くから利用し、それによって癌の発生または更なる進行を防止することが可能となる。

【0248】

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

10

【0249】

或る特定の態様においては、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列群に由来のオリゴヌクレオチドプライマー類を用いて一塩基多型 (SNP) を検出し得る。SNPは、多くの場合にヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となるような置換、挿入及び欠失である。限定するものではないがSNPの検出方法には、SSCP (single-stranded conformation polymorphism) 及び蛍光SSCP (fSSCP) がある。SSCPでは、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列群に由来のオリゴヌクレオチドプライマー類とポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) とを用いた、DNAの増幅を行う。DNAは例えば、病変組織または正常組織、生検サンプル、体液その他に由来し得る。DNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR生成物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光性に標識する。それによってDNAシーケンシング機などの高処理機器でアンプリマー (amplimer) の検出が可能になる。更に、インシリコSNP (in silico SNP, isSNP) と呼ばれる配列データベース分析法は、一般的なコンセンサス配列に配列されるような個々のオーバーラップするDNA断片の配列を比較することにより、多型性を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、DNAの実験室での調整及び統計モデル及びDNA配列クロマトグラムの自動分析を用いたシーケンシングのエラーに起因する配列の変異をフィルタリングして除去する。別の態様では、例えば高処理MASSARRAYシステム (Sequenom, Inc., San Diego CA) を用いた質量分析によりSNPを検出し、特徴付ける。

20

【0250】

SNPはヒトの病気の遺伝的基礎を研究するために使える可能性がある。たとえば、少なくとも16個の一般的なSNPがインスリン非依存性の糖尿病と関連付けられている。SNPはまた、嚢胞性線維症、鎌形血球貧血、慢性肉芽腫性疾病等の単一遺伝子病の現れ方の違いを研究するために有用である。たとえば、マンノース結合レクチン (MBL2) の変異体は嚢胞性線維症の肺での有害な現れ方との相関が示されている。SNPはまた、薬理ゲノミクス (命のかかわる毒性など、患者の薬への反応に影響する遺伝的変異体の同定) にも役立つ。たとえば、Nアセチルトランスフェラーゼのある変異体は抗結核薬剤イソニアジドに対する高頻度の末梢神経障害と関連付けられているし、ALOX5のコアプロモーターのある変異体は5リポオキシゲナーゼ経路を標的とする抗喘息薬剤による治療への臨床的反応を弱くする。異なる集団におけるSNPの分布の解析は、遺伝子浮動、突然変異、組換えおよび選択の研究に有用であると共に、集団の起源と移動の調査にも役立つ。(Taylor, J.G. 他 (2001) Trends Mol. Med. 7:507-512; Kwok, P.-Y. and Z. Gu (1999) Mol. Med. Today 5:538-543; Nowotny, P. 他 (2001) Curr. Opin. Neurobiol. 11:637-641.)

30

40

LIPAMの発現を定量するために用い得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、対照核酸の共増幅 (coamplification)、および標準曲線から得た結果の補間もある (例えば、Melby, P.C. 他 (1993) J. Immunol. Methods 159:235244; Duplaa, C. 他 (1993) Anal. Biochem. 212:229236を参照。) 目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または比色反応によって定量が迅速になるような高処理フォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

【0251】

50

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

10

【0252】

別の実施態様では、LIPAM、LIPAMの断片群、またはLIPAMに特異的な抗体類を、或るマイクロアレイ上のエレメント群として用い得る。マイクロアレイを用いて、上記のようなタンパク質-タンパク質相互作用、薬剤-標的相互作用及び遺伝子発現プロファイルをモニターまたは測定することが可能である。

【0253】

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

20

【0254】

転写イメージは、組織、株化細胞、生検またはその生物学的サンプルから単離した転写物を用いて生成し得る。転写イメージは従って、組織または生検サンプルの場合には in vivo、または株化細胞の場合には in vitro で遺伝子発現を反映する。

30

【0255】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロファイルを作製する転写イメージはまた、工業的または天然の環境化合物の毒性試験のみならず、in vitroモデル系及び薬剤の前臨床評価に関連して使用し得る。全ての化合物は、作用及び毒性のメカニズムを暗示する、しばしば分子フィンガープリントまたは毒性シグネチャと称されるような特徴的な遺伝子発現パターンを惹起する (Nuwaysir, E.F. 他 (1999) Mol. Carcinog. 24:153-159、Steiner, S. 及び N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471、該文献は特に引用することを以って本明細書の一部となす)。試験化合物が、既知の毒性を有する化合物のシグネチャと同一のシグネチャを有する場合には、毒性特性を共有している可能性がある。フィンガープリントまたはシグネチャは、多数の遺伝子及び遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいる場合には、最も有用且つ正確である。理想的には、発現のゲノム全域にわたる測定が最高品質のシグネチャを提供する。たとえ、発現が任意の試験された化合物によって変化しない遺伝子があったとしても、それらの発現レベルを残りの発現データを標準化するために使用できるため、それらの遺伝子は重要である。標準化手順は、異なる化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。毒性シグネチャの要素に遺伝子機能を割り当てることが毒性メカニズムの解釈に役立つが、毒性の予測につながるシグネチャの統計的に一致させるのに遺伝子機能の知識は必要とされない (例えば2000年2月29日にNational Institute of Environmental Health Sciencesより発行されたPress Rel

40

50

ease 00-02を参照されたい。これについては<http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm>で入手可能である)。従って、中毒学的スクリーニングの際に毒性シグネチャを用いて、全ての発現した遺伝子配列を含めることは重要且つ望ましいことである。

【0256】

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

10

【0257】

別の実施例は、本発明のポリペプチド配列を用いて組織または細胞タイプのプロテオームを分析することに関連する。プロテオームの語は、特定の組織または細胞タイプでのタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームの各タンパク質成分は、個々に更に分析の対象とすることができる。プロテオーム発現パターン即ちプロフィールは、所与の条件下で所与の時間に発現したタンパク質の数及び相対存在量を定量することにより分析し得る。従って細胞のプロテオームのプロフィールは、特定の組織または細胞タイプのポリペプチドを分離及び分析することにより作成し得る。或る実施例では、1次元等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、2次元ドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に応じて分離するような2次元ゲル電気泳動により分離が達成される(前出のSteiner および Anderson)。タンパク質は、通常クーマシーブルーまたは銀染色液または蛍光染色液などの物質を用いてゲルで染色することにより、分散した、独自の位置にある点としてゲル中で可視化される。各タンパク質スポットの光学密度は、通常サンプル中のタンパク質レベルに比例する。異なるサンプル、例えば試験化合物または治療薬で処理または未処理のいずれかの生物学的サンプルから得られるタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を同定する。スポット内のタンパク質は、例えば化学的または酵素的切断とそれに続く質量分析を用いる標準的な方法を用いて部分的にシーケンシングする。スポット内のタンパク質の同一性は、その部分配列を、好適には少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を、本発明のポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列が得られる。

20

30

【0258】

プロテオームのプロフィールは、LIPAMに特異的な抗体を用いてLIPAM発現レベルを定量することによっても作成可能である。或る実施例では、マイクロアレイ上でエレメントとして抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝して各アレイ要素へのタンパク質結合レベルを検出することによりタンパク質発現レベルを定量する(Lueking, A. 他(1999) Anal. Biochem. 270:103-111、Mendoza, L.G. 他(1999) Biotechniques 27:778-788)。検出は当分野で既知の様々な方法で行うことができ、例えば、チオールまたはアミノ反応性蛍光化合物を用いてサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイのエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

40

【0259】

プロテオームレベルでの毒性シグネチャも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写レベルでの毒性シグネチャと並行に分析するべきである。或る組織の或るタンパク質に対しては、転写とタンパク質の存在量の相関が乏しいこともあるので(Anderson, N.L. 及び J. Seilhamer (1997) Electrophoresis 18:533-537)、転写イメージにはそれ程影響しないがプロテオームのプロフィールを変化させるような化合物の分析においてプロテオーム毒性シグネチャは有用たり得る。更に、体液中での転写の分析はmRNA急速な分解により困難であるので、プロテオームのプロフィール作成はこのような場合により信頼でき、情報価値がある。

【0260】

50

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

【0261】

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

10

【0262】

マイクロアレイは、本技術分野でよく知られている方法を用いて調製し、使用し、そして分析する (Brennan, T.M. 他 (1995) の米国特許第5,474,796号、Schena, M. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweiler 他 (1995) PCT出願第W095/251116号、Shalon, D.他 (1995) PCT出願第W095/35505号、Heller, R.A. 他 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155、Heller, M.J. 他 (1997) 米国特許第5,605,662号等を参照)。様々なタイプのマイクロアレイが公知であり、詳細については、DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, 編集. (1999) Oxford University Press, Londonに記載されている。該文献は、特に引用することを以て本明細書の一部となす。

20

【0263】

本発明の別の実施態様ではまた、LIPAMをコードする核酸配列群を用いて、天然ゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブ群を作製し得る。コード配列または非コード配列のいずれかを用いることができ、或る例では、コード配列より非コード配列の方が好ましい。例えば、多重遺伝子ファミリーのメンバー内でのコード配列の保存により、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる (例えば、Harrington, J.J. 他 (1997) Nat. Genet. 15:345-355; Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127134; および Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149154を参照。) 一度マッピングすると、本発明の核酸配列を用いて例えば病状の遺伝を特定の染色体領域の遺伝または制限酵素断片長多型 (RFLP) と関連させるような遺伝子連鎖地図を発生させ得る。(例えば、Lander, E.S. and D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357を参照。)

30

【0264】

蛍光 *in situ* ハイブリッド形成法 (FISH) は、他の物理的及び遺伝地図データと関連し得る (前出のHeinz-Ulrich, ら (1995) in Meyers, 965-968ページ等を参照) 遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見ることができる。物理的染色体地図上の、LIPAMをコードする遺伝子の位置と、特定の疾患との相関性、あるいは特定の疾患に対する素因との相関性は、この疾患と関連するDNAの領域の決定に役立ち得るため、位置を決定するクローニングの作業を促進し得る。

40

【0265】

確定した染色体マーカーを用いた連鎖分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。例えばマウスなど別

50

の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置することにより、正確な染色体上の遺伝子座が未知でも、関連するマーカー類をしばしば明らかにし得る。この情報は、位置クローニングその他の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患を探す研究者にとって価値がある。疾患または症候群に關与する遺伝子が、血管拡張性失調症の11q22-23領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域にマップされた任意の配列は、更なる調査のための関連遺伝子或いは調節遺伝子を提示している可能性がある（Gatti, R.A.他（1988）Nature 336:577-580等を参照）転座、反転等に起因する、健常者、保有者、感染者の三者間における染色体位置の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

【0266】

本発明の別の実施態様では、LIPAM、その触媒作用断片あるいは免疫原性断片またはそのオリゴペプチド群を、種々の任意の薬剤スクリーニング技術における、化合物のライブラリ群のスクリーニングに用い得る。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置することになる。LIPAMと試験する薬剤との結合による複合体の形成を測定し得る。

【0267】

別の薬剤スクリーニング方法は、目的のタンパク質に対して好適な結合親和性を有する化合物を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる（Geysen, 他（1984）PCT application W084/03564等を参照。）この方法においては、多数の異なる小さな試験用化合物を固体基板上で合成する。試験用化合物は、LIPAM、或いはその断片と反応してから洗浄される。結合したLIPAMを次に、当分野で周知の種々の方法で検出する。精製したLIPAMはまた、上記した薬物スクリーニング技術に用いるプレート上に直接コーティングもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

【0268】

別の実施態様では、LIPAMに特異結合可能な中和抗体類がLIPAMとの結合について或る試験化合物と競合する、競合的薬物スクリーニングアッセイを用い得る。この方法では、抗体を用いて、1つ以上の抗原決定基をLIPAMと共有するどのペプチドの存在をも検出できる。

【0269】

別の実施態様では、LIPAMをコードするヌクレオチド配列群を、将来に開発される分子生物学技術であり、現在知られているヌクレオチド配列群の諸特性（限定はされないが、トリプレット遺伝コード、特異的な塩基対相互作用等を含む）に依存するあらゆる新技術に用い得る。

【0270】

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

【0271】

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物、特に米国特許第60/266,910号、第60/276,891号、第60/279,760号、第60/283,818号、第60/276,855号及び第60/285,405は、言及することをもって本明細書の一部となす。

【実施例】

【0272】

1. cDNAライブラリの作製

Incyte cDNA群の由来は、LIFESEQ GOLDデータベース（Incyte Genomics, Palo Alto CA）に記載されたcDNAライブラリ群である。幾つかの組織はホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解し、他の組織はホモジナイズしてフェノールにまたは変性剤群の好適な混合液に溶解した。混合液の1例であるTRIZOL（Life Technologies）は、フェノールとグアニジンイソチオシアネートとの単相溶液である。結果として得られた溶

10

20

30

40

50

解物は、塩化セシウムで遠心分離するかクロロホルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からRNAを沈殿させた。

【0273】

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

10

【0274】

場合によってはStratagene社へのRNA提供を行い、対応するcDNAライブラリをStratagene社が作製することもあった。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) またはSUPERSCRIPTプラスミドシステム (Life Technologies) を用いて本技術分野で公知の推奨方法または類似の方法でcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した (前出のAusubel, 1997, 5.1-6.6ユニット等を参照)。逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対して、cDNAのサイズ (300 ~ 1000 bp) 選択は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー (Amersham Pharmacia Biotech)、或いは調製用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素または酵素でcDNAを消化した。好適なプラスミドは、例えばPBLUESCRIPTプラスミド (Stratagene)、PSPORT1 プラスミド (Life Technologies)、PCDNA2.1 プラスミド (Invitrogen, Carlsbad CA)、PBK-CMV プラスミド (Stratagene)、PCR2-TOPOTA プラスミド (Invitrogen)、PCMV-ICISプラスミド (Stratagene)、pIGEN (Incyte Genomics, Palo Alto CA)、pRARE (Incyte Genomics)、pINCY (Incyte Genomics) 等およびその誘導体である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、あるいはLife Technologies社のDH5、DH10BまたはElectroMAX DH10Bなど適格な大腸菌細胞に形質転換した。

20

【0275】

2. cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム (Stratagene) を用いた *in vivo* 切除によって、或いは細胞溶解によって、実施例1のようにして得たプラスミドを宿主細胞から回収した。プラスミドの精製には、下記の少なくとも1つを用いた。すなわちMagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム (Promega)、AGTC Miniprep精製キット (Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus PlasmidおよびQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミド精製キットのいずれかである。プラスミドは、沈殿させた後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで4℃で保管した。

30

【0276】

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

40

【0277】

3. シークエンシング及び分析

実施例2に記載したようにプラスミドから回収したIncyte cDNAを、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンス反応は、標準的方法或いは高処理装置、例えば

50

ABI CATALYST 800 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) または PTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research) を HYDRA マイクロディスペンサー (Robbins Scientific) または MICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムと併用して処理した。cDNA のシーケンシング反応は、Amersham Pharmacia Biotech 社が提供する試薬、または ABI シーケンシングキット、例えば ABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) の試薬を用いて準備した。cDNA のシーケンシング反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNA シーケンシングシステム (Molecular Dynamics) が、標準 ABI プロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いる ABI PRISM 373 または 377 シーケンシングシステム (Applied Biosystems) が、或いはその他の本技術分野でよく知られている配列解析システムを用いた。cDNA 配列内のリーディングフレームは、標準的方法 (前出の Ausubel, 1997, 7.7 ユニットに概説) を用いて決定した。cDNA 配列の幾つかを選択して、実施例 8 に記載した方法で配列を伸長させた。

10

【0278】

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

20

30

40

【0279】

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

50

【0280】

完全長ポリヌクレオチド配列群とポリペプチド配列群との構築と分析とに用いた上記プログラム群は、SEQ ID NO:10-18のポリヌクレオチド配列断片群の同定にも利用した。ハイブリダイゼーション技術と増幅技術とに有用な約20～約4000ヌクレオチドの断片群を、表4の列2に示した。

【0281】

4. ゲノムDNAからのコード配列の同定及び編集

推定上の脂質結合分子類の同定には、先ずGenscan遺伝子同定プログラムを、公共のゲノム配列データベース（例えば、gbpriやgbhtg）に対して実行した。Genscanは、様々な生物からのゲノムDNA配列を分析する汎用遺伝子同定プログラムである（Burge, C. 及び S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94、Burge, C. 及び S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8:346-354を参照）。プログラムは予測エキソンを連結し、メチオニンから終止コドンに及ぶ構築されたcDNA配列を形成する。Genscanの出力は、ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列のFASTAデータベースである。Genscanが一度に分析する配列の最大範囲は、30kbに設定した。これらのGenscan予測cDNA配列の内、どの配列が脂質結合分子をコードするかを決定するために、コードされるポリペプチドを、PFAMモデル群に対し脂質結合分子について問合せて分析した。潜在的な脂質結合分子はまた、既に脂質結合分子として注釈が付けられたIncyte cDNA配列群に対する相同性により、同定した。こうして選択されたGenscan予測配列は、次にBLAST分析により公共データベースgenpept及びgbpriと比較した。必要であれば、genpeptからのトップのBLASTヒットと比較することによりGenscan予測配列を編集し、余分なまたは取り除かれたエキソンなどのGenscanにより予測された配列のエラーを修正する。BLAST分析はまた、任意のIncyte cDNAまたはGenscan予測配列の公共cDNA適用範囲の発見に用いられるので、転写の証拠を提供する。Incyte cDNA適用範囲が利用できる場合には、この情報を用いてGenscan予測配列を修正または確認した。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例3に記載された構築プロセスを用いて、Incyte cDNA配列及び/または公共のcDNA配列でGenscan予測コード配列を構築することにより得た。或いは、完全長ポリヌクレオチド配列は編集または未編集のGenscan予測コード配列に完全に由来する。

【0282】

5. cDNA配列データを使ったゲノム配列データの構築

ステッチ配列 (Stitched Sequence)

部分cDNA配列は、実施例4に記載のGenscan遺伝子同定プログラムにより予測されたエキソンを用いて伸長させた。実施例3に記載されたように構築された部分cDNAは、ゲノムDNAにマッピングし、関連するcDNA及び1つ若しくは複数のゲノム配列から予測されたGenscanエキソンを含むクラスタに分解した。cDNA及びゲノム情報を統合するべくグラフ理論及び動的プログラミングに基づくアルゴリズムを用いて各クラスタを分析し、引き続いて確認、編集または伸長して完全長配列を産出するような潜在的スプライシング変異体を生み出した。区間全体の長さがクラスタ中の2以上の配列に存在するような配列を同定し、そのように同定された間隔は推移により等しいと考えられた。例えば、1つのcDNA及び2つのゲノム配列に間隔が存在する場合、3つの間隔は全て等しいと考えられる。このプロセスは、無関係であるが連続したゲノム配列をcDNA配列により結び合わせて架橋し得る。このようにして同定された区間を、親配列 (parent sequence) に沿って現われるようにステッチアルゴリズムで縫い合わせ、可能な最も長い配列および変異配列を作製する。1種類の親配列に沿って発生した間隔と間隔との連鎖 (cDNA - cDNAまたはゲノム配列 - ゲノム配列) は、親の種類を変える連鎖 (cDNA - ゲノム配列) に優先した。結果として得られるステッチ配列は、BLAST分析により公共データベースgenpept及びgbpriに翻訳されて比較された。Genscanにより予測された不正確なエキソンは、genpeptからのトップのBLASTヒットと比較することにより修正した。必要な場合には、追加cDNA配列を用いるかゲノムDNAの検査により配列を更に伸長させた。

【0283】

10

20

30

40

50

ストレッチ配列 (Stretched Sequence)

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

10

【 0 2 8 4 】

6 . LIPAMをコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

SEQ ID NO:10-18を構築するために用いた配列を、BLAST及びSmith-Watermanアルゴリズムを用いて、Incyte LIFESEQデータベース及び公共のドメインデータベースの配列と比較した。SEQ ID NO:10-18と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrapなどの構築アルゴリズム (表7) を使用して、連続しオーバーラップする配列のクラスター群に組み入れた。スタンフォード・ヒトゲノムセンター (SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所 (WIGR)、Genethon等の公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッド及び遺伝地図データを用いて、クラスタ化された配列が前もってマッピングされたかを決定した。マッピングされた配列がクラスタに含まれている場合は、個々の配列番号を含めてそのクラスタの全配列が地図上の位置に割り当てられた。

20

【 0 2 8 5 】

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

30

【 0 2 8 6 】

7 . ポリヌクレオチド発現の分析

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

40

【 0 2 8 7 】

BLASTを適用した類似のコンピュータ技術を用いて、GenBankやLifeSeq (Incyte Genomics) 等のcDNAデータベースにおいて同一または関連分子を検索した。ノーザン分析は、多数の膜系ハイブリダイゼーションよりも非常に速い。更に、特定の同一を厳密な或いは相等的なものとして分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を変更することができる。検索の基準は積スコアであり、次式で定義される。

【 0 2 8 8 】

【 数 1 】

(BLAST スコア×配列一致率)

5 × (長さ(配列1), 長さ(配列2))の最小値

【0289】

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

10

【0290】

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

20

30

【0291】

8. LIPAMをコードするポリヌクレオチドの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列もまた、完全長分子の適切な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて該断片を伸長させて生成した。一方のプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマーは、長さが約22～30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上となり、約68～72の温度で標的配列にアニーリングするように、OLIGO 4.06

40

【0292】

配列を伸長するために、選択されたヒトcDNAライブラリを用いた。2段階以上の伸長が必要または望ましい場合には、付加的プライマー或いはプライマーのネステッドセットを設計した。

【0293】

高忠実度の増幅が、当業者によく知られている方法を利用したPCR法によって得られた。PCRは、PTC-200 サーマルサイクラー(MJ Research, Inc.)を用いて96ウェルブ

50

レート内で行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200 nmolの各プライマー、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ とβ-メルカプトエタノールを含むバッファー、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)、ELONGASE酵素(Life Technologies)、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を含む。プライマーの組、PCI AとPCI Bに対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ1: 94 で3分間 ステップ2: 94 で15秒 ステップ3: 60 で1分間 ステップ4: 68 で2分間 ステップ5: ステップ2、3、4を20回繰り返す ステップ6: 68 で5分間 ステップ7: 4 で保存。プライマー対T7、SK+に対しては、上記パラメータに代えて以下のパラメータを用いた。ステップ1: 94 で3分間 ステップ2: 94 で15秒 ステップ3: 57 で1分間 ステップ4: 68 で2分間 ステップ5: ステップ2、3、4を20回繰り返す ステップ6: 68 で5分間 ステップ7: 4 で保存。

10

【0294】

各ウェルのDNA濃度は、1X TE及び0.5µlの希釈していないPCR産物に溶解した100µlのPICOGREEN定量試薬(0.25(v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR)を不透明な蛍光光度計プレート(Corning Costar, Acton MA)の各ウェルに分配してDNAが試薬と結合できるようにして測定する。サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量するべくプレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンした。反応混合物のアリコット5~10µlを1%アガロースミニゲル上で電気泳動法によって解析し、どの反応が配列の伸長に成功したかを決定した。

【0295】

伸長させたヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して384ウェルプレートに移し、CviJIコラウイルスエンドヌクレアーゼ(Molecular Biology Research, Madison WI)を用いて消化し、pUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)への再連結反応前に音波処理またはせん断した。ショットガン・シーケンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度(0.6~0.8%)のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE(Promega)で消化した。伸長させたクローンをT4リガーゼ(New England Biolabs, Beverly MA)を用いてpUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)で処理して制限部位のオーバーハングを満たし、大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を選択して抗生物質を含む培地に移し、それぞれのコロニーを切りとってLB/2Xカルベニシリン培養液の384ウェルプレートに37 で一晩培養した。

20

30

【0296】

細胞を溶解して、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)及びPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いて以下の手順でDNAをPCR増幅した。ステップ1: 94 で3分間 ステップ2: 94 で15秒 ステップ3: 60 で1分間 ステップ4: 72 で2分間 ステップ5: ステップ2、3、及び4を29回繰り返す ステップ6: 72 で5分間 ステップ7: 4 で保管。上記したようにPICOGREEN試薬(Molecular Probes)でDNAを定量化した。DNAの回収率が低いサンプルは、上記と同一の条件を用いて再増幅した。サンプルは20%ジメチルスルホキシド(1:2, v/v)で希釈し、DYENAMIC エネルギートランスファー シーケンシングプライマー、及びDYENAMIC DIRECT kit(Amersham Pharmacia Biotech)またはABI PRISM BIGDYE ターミネーターサイクル シーケンシング反応キット(Terminator cycle sequencing ready reaction kit)(Applied Biosystems)を用いてシーケンシングした。

40

【0297】

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

【0298】

9. LIPAMをコードするポリヌクレオチドにおける1塩基多型性の同定

LIFESEQ データベース (Incyte Genomics)を用いることにより、1塩基多型性(SNP)と

50

呼ばれるよく見られるDNA配列変異体がSEQ ID NO:10-18の中で同定された。実施例3に記述したように、同じ遺伝子からの配列を一緒にまとめてクラスター化し、構築した。SNPをその他の配列変異体から区別するために、一連のフィルターからなるアルゴリズムが使用された。予備フィルターは最小Phredクオリティスコア15を要求することによって大多数のベースコールエラーを除去し、配列アラインメントエラーとスプライス変異体、キメラおよびベクター配列の不適正なトリミングによるエラーを除去した。高度染色体解析の自動化手順により、オリジナルのクロマトグラムファイルの中の推定上のSNPの近傍を解析した。クローンエラーフィルターは、統計的に生成されたアルゴリズムを使って、実験室の処理中に入ってくる（逆転写酵素、ポリメラーゼまたは体細胞性突然変異などに起因する）エラーを同定した。クラスタリングエラーフィルターは統計的に生成されたアルゴリズムを使って、近い相同体や偽遺伝子のクラスタリングによるエラーおよび非ヒト配列によるコンタミネーションに起因するエラーを同定した。最後のフィルターセットは免疫グロブリンまたはT細胞受容体で見つかる複製とSNPを除去した。

10

20

30

40

50

【0299】

4つの異なるヒトの集団における対立遺伝子頻度を解析するために、ある種のSNPを選択して、高スループットMASSARRAYシステム(Sequenom, Inc.)を使った質量分析で特性を測定した。白人集団は92人(男性46人、女性46人)で、83人がユタ州出身、4人がフランス人、3人がベネズエラ、そして2人がアーミッシュだった。アフリカ人は194人(男性97人、女性97人)からなり、その全てがアフリカ系アメリカ人であった。ラテンアメリカ系集団は324人(男性162人、女性162人)からなり、その全てがメキシコのラテンアメリカ系であった。アジア系集団は126人(男性64人、女性62人)からなり、報告された親の内訳は中国人が43%、日本人が31%、韓国人が13%、ベトナム人が5%、その他のアジア系が8%であった。対立遺伝子頻度は最初に白人集団で解析された。この集団内で対立遺伝子変異を示さなかったSNPはその他3つの集団ではテストしない場合もあった。

【0300】

10. 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識及び使用

SEQ ID NO:10-18から導き出されたハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、mRNA、またはゲノムDNAをスクリーニングする。約20塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記載するが、より大きなヌクレオチド断片に対しても事実上同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、OLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences)等の最新ソフトウェアを用いて設計し、各オリゴマー50 pmolと、[$^{-32}$ P]アデノシン3リン酸(Amersham Pharmacia Biotech) 250 μ Ciと、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(DuPont NEN, Boston MA)を混合することにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25超細繊維分子サイズ排除デキストラン ビードカラム(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて十分に精製する。Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba1またはPvu II(DuPont NEN)のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分 10^7 カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

【0301】

各消化物から得たDNAは、0.7%アガロースゲル上で分画してナイロン膜(Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH)に移す。ハイブリダイゼーションは、40で16時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば0.1Mクエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムに一致する条件下で、プロットを室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィーまたはそれに代わるイメージング手段を用いてハイブリダイゼーションパターンを視覚化し、比較する。

【0302】

11. マイクロアレイ

マイクロアレイの表面上でアレイエレメントの結合または合成は、フォトリソグラフィ、圧電印刷(インクジェット印刷、前出のBalteschweiler等を参照)、機械的マイクロスポ

ッティング技術及びこれらから派生したものをを用いて達成することが可能である。上記各技術において基板は、均一かつ非多孔性の固体とするべきである (Schna (1999) 前出)。推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウエハがある。或いは、ドットプロット法またはスロットプロット法に類似のアレイを利用して、熱的、紫外線的、化学的または機械的結合手順を用いて基板の表面にエレメントを配置及び結合させてもよい。通常のアレイは、手作業で、または利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る (Schna, M. 他 (1995) Science 270:467-470、Shalon, D. 他 (1996) Genome Res. 6:639-645、Marshall, A. および J. Hodgson (1998) Nat. Biotechnol. 16:27-31.を参照)。

【0303】

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

【0304】

組織または細胞サンプルの準備

グアニジウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全RNAを単離し、オリゴ(dT)セルロース法を用いてポリ(A)⁺RNAを精製する。各ポリ(A)⁺RNAサンプルを、MMLV逆転写酵素、0.05pg/ μ lのオリゴ(dT)プライマー(21mer)、1 \times 第一鎖合成バッファー、0.03unit/ μ lのRNアーゼ阻害因子、500 μ MのdATP、500 μ MのdGTP、500 μ MのdTTP、40 μ MのdCTP、40 μ MのdCTP-Cy3 (BDS) またはdCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて逆転写する。逆転写反応は、GEMBRIGHTキット (Incyte) を用いてポリ(A)⁺RNA 200 ng 含有の25体積ml内で行う。特異的対照ポリ(A)⁺RNAは、非コード酵母ゲノムDNAから *in vitro* 転写により合成する。各反応サンプル(1つはCy3、もう1つはCy5標識)は、2.5mlの0.5M水酸化ナトリウムで処理し、85 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを分解させる。サンプルは、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピンカラム (CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA) を用いて精製する。混合後、2つの反応サンプルは、1mlのグリコーゲン(1mg/ml)、60mlの酢酸ナトリウム及び300mlの100%エタノールを用いてエタノール析出させる。サンプルは次に、SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY) を用いて乾燥して仕上げ、14 μ lの5 \times SSC / 0.2% SDS中で再懸濁する。

【0305】

マイクロアレイの準備

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

【0306】

精製したアレイエレメントは、ポリマーコートされたスライドガラス上に固定する。顕微鏡スライドガラス (Corning) は、処理中及び処理後に0.1%のSDS及びアセトン中で超

10

20

30

40

50

音波処理をかけ、蒸留水で非常に良く洗浄する。スライドガラスは、4%フッ化水素酸 (VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA) 中でエッチングし、蒸留水中で非常に良く洗浄し、95%エタノール中で0.05%アミノプロピルシラン (Sigma) を用いてコーティングする。コーティングしたスライドガラスは、110 のオープンで硬化させる。

【0307】

米国特許第5,807,522号で説明されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。該特許は、引用を以って本明細書の一部となす。平均濃度100ng/ μ lのアレイエレメントDNA1 μ lを、高速ロボット装置 (robotic apparatus) により、開放型キャピラリープリンティングエレメント (open capillary printing element) に充填する。装置はここで、スライド毎に約5nlのアレイエレメントサンプルを加える。

【0308】

マイクロアレイには、STRATALINKER UV架橋剤 (Stratagene) を用いてUV架橋する。マイクロアレイは、室温において0.2%SDSで1度洗浄し、蒸留水で3度洗浄する。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) 中の0.2%カゼイン中において60 で30分間マイクロアレイをインキュベートした後、前に行ったように0.2%SDS及び蒸留水で洗浄することにより、非特異結合部位をブロックする。

【0309】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応液は、5 \times SSC、0.2%SDSハイブリダイゼーション緩衝液にCy3及びCy5標識したcDNA合成産物を各0.2 μ g含む9 μ lのサンプル混合体を含めたものである。サンプル混合体は、65 まで5分間加熱し、マイクロアレイ表面上で等分して1.8 cm^2 のカバーガラスで覆う。アレイを、顕微鏡用スライドよりわずかに大きい空洞を有する防水チェンバーに移す。チェンバーのコーナーに140 μ lの5 \times SSCを加えることにより、チェンバー内部を湿度100%に保持する。アレイを含むチェンバーは、60 で約6.5時間インキュベートする。アレイは、第1洗浄緩衝液中 (1 \times SSC, 0.1%SDS) において45 で10分間洗浄し、第2洗浄緩衝液中 (0.1 \times SSC) において45 で10分間各々3度洗浄して乾燥させる。

【0310】

検出

レポーター標識ハイブリダイゼーション複合体は、Cy3の励起のためには488nm、Cy5の励起のためには632nmでスペクトル線を発生し得るInnova70混合ガス10Wレーザー (Coherent, Inc., Santa Clara CA) を備えた顕微鏡で検出する。20 \times 顕微鏡対物レンズ (Nikon, Inc., Melville NY) を用いて、アレイ上に励起レーザー光の焦点を当てる。アレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御のX-Yステージに置き、対物レンズを通過してラスタースキャンする。本実施例で用いた1.8 $\text{cm} \times 1.8\text{cm}$ のアレイは、20 μm の解像度でスキャンした。

【0311】

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

【0312】

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

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

【0313】

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

10

【0314】

グリッドが蛍光シグナルイメージ上に重ねられ、それによって各スポットからのシグナルはグリッドの各エレメントに集められる。各エレメント内の蛍光シグナルは統合され、シグナルの平均強度に応じた数値が得られる。シグナル分析に用いるソフトウェアは、GEMT00LS遺伝子発現分析プログラム(Incyte)である。

20

【0315】

たとえば、コンポーネント1824717_HGG4 of SEQ ID NO:15 においては癌にかかった組織が正常組織に対して示差発現を示すことがマイクロアレイ解析によってわかった。正常肺組織と扁平上皮細胞癌にかかった肺組織のマッピングされたサンプルおよび正常肺組織と腺癌にかかった肺組織のマッピングされたサンプルはRoy Castle International Center for Lung Cancer Research (Liverpool, UK)が提供した。コンポーネント1824717_HGG4の発現は扁平上皮細胞癌にかかった肺組織と腺癌にかかった肺組織において改変されていた。したがって、SEQ ID NO:15 は癌の診断アッセイに有用である。

【0316】

1.2. 相補的ポリヌクレオチド

LIPAMをコードする配列群或いはその任意の部分に対する相補配列群を用いることにより、天然LIPAMの発現が検出、低減、または阻害される。約15~30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さな或いは大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。適切なオリゴヌクレオチド群を設計するため、Oligo 4.06ソフトウェア(National Biosciences)および、LIPAMのコーディング配列を用いる。転写を阻害するためには、最も独特な5'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモーターがコーディング配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計することにより、リボソームが、LIPAMをコードする転写物に結合するのを防ぐ。

30

【0317】

1.3. LIPAMの発現

LIPAMの発現および精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて達成される。細菌内でLIPAMを発現させるには、cDNAを好適なベクターにサブクローニングする。ベクターは、抗生物質耐性遺伝子と、cDNA転写レベルを高める誘導型プロモーターとを持つものを用いる。このようなプロモーターには、lacオペレーター調節因子に関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)等の好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性細菌にLIPAMを発現させるには、イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発する。真核細胞でのLIPAMの発現は、昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に、一般にバキュロウイルスとして知られるAutographica califor

40

50

nica核多角体病ウイルス(AcMNPV)の組換え型を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子をLIPAMをコードするcDNAと置換するには、相同組換えを行うか、或いは、転移プラスミドの媒介を伴う、細菌の媒介による遺伝子転移を行う。ウイルスの感染力は維持され、強い多角体プロモーターによって高いレベルのcDNAの転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合は*Spodoptera frugiperda* (Sf9) 昆虫細胞に感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場合は、バキュロウイルスの更なる遺伝的変更が必要になる (Engelhard, E. K.他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227, Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.等を参照)。

【0318】

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

【0319】

14. 機能的アッセイ

LIPAMの機能は、哺乳動物細胞培養系において生理的に高められたレベルでの、LIPAMをコードする配列の発現によって算定する。cDNAを高いレベルで発現する強いプロモーターを持つ哺乳動物発現ベクターにcDNAをサブクローニングする。選択されるベクターには、pCMV SPORTプラスミド (Life Technologies) 及びpCR 3.1プラスミド (Invitrogen, Carlsbad CA) が含まれ、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを有する。リポソーム製剤或いは電気穿孔法を用いて、5 ~ 10 μ gの組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来または造血由来の細胞株に一過的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1 ~ 2 μ gのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入された細胞と形質移入されていない細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、cDNAの組換えベクターからの発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、CD64またはCD64-GFP融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザー光学に基づく技術であるフローサイトメトリー (FCM) を用いて、GFPまたはCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。FCMは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取込を検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、プロピジウムヨウ化物によるDNA染色によって計測される核DNA内容物の変化、前方散乱光と90°側方散乱光によって計測される細胞サイズと顆粒状性の変化、プロモデオキシウリジンの取込量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節、特異抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内におけるタンパク質の発現の変化、及び蛍光複合アネキシンVタンパク質の細胞表面への結合によって計測される原形質膜組成の変化とがある。フローサイトメトリー法については、Ormerod, M. G. (1994) Flow Cytometry Oxford, New York, NY.に記述がある。

【0320】

遺伝子発現におけるLIPAMの影響は、LIPAMをコードする配列と、CD64またはCD64-GFPのどちらかが形質移入された、高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。CD64またはCD64-GFPは、形質転換された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG (IgG)

10

20

30

40

50

の保存領域と結合する。形質転換された細胞と形質転換されない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体かのどちらかで被覆された磁気ビーズを用いて効率的に分離することができる(DYNAL, Lake Success NY)。mRNAは、当業者に周知の方法で細胞から精製することができる。LIPAMと、目的とする他の遺伝子とをコードするmRNAの発現は、ノーザン分析やマイクロアレイ技術で分析することができる。

【0321】

15. LIPAMに特異的な抗体の作製

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE; 例えば、Harrington, M.G. (1990) *Methods Enzymol.* 1816 - 3088-495を参照)または他の精製技術で実質的に精製されたLIPAMを用いて、標準的なプロトコルで動物(ウサギ、マウス等)を免疫化して抗体を作り出す。

10

【0322】

別法では、LIPAMアミノ酸配列をLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて解析して免疫原性の高い領域を判定し、対応するオリゴペプチドを合成してこれを用いて当業者に周知の方法で抗体を生産する。C末端付近の或いは親水性領域内のエピトープなどの適切なエピトープの選択方法については、当分野に記述が多い(例えば、前出のAusubel, 1995, 11章を参照)。

【0323】

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

20

【0324】

16. 特異的な抗体を用いる天然LIPAMの精製

天然LIPAMあるいは組換えLIPAMを実質的に精製するため、LIPAMに特異的な抗体類を用いるイムノアフィニティー(免疫親和性)クロマトグラフィーを行う。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化したSEPHAROSE(Amersham Pharmacia Biotech)のような活性化クロマトグラフィー用レジンと抗LIPAM抗体とを共有結合させることにより形成する。結合後に、製造者の使用説明書に従って樹脂をブロックし、洗浄する。

30

【0325】

LIPAMを有する培養液をイムノアフィニティークラムに通し、LIPAMを優先的に吸着できる条件で(例えば、界面活性剤の存在下において高イオン強度のバッファーで)そのカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体とLIPAMとの結合を切るような条件で(例えば、pH 2~3のバッファー、或いは高濃度の尿素またはチオシアン酸イオンのようなカオトロープで)溶出させ、LIPAMを回収する。

【0326】

17. LIPAMと相互作用する分子の同定

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

40

【0327】

別法では、LIPAMと相互作用する分子を、Fields, S.およびO. Song(1989, *Nature* 340:245-246)に記載の酵母2-ハイブリッドシステム(yeast two-hybrid system)や、MATCHMAKERシステム(Clontech)などの、2-ハイブリッドシステムに基づく市販のキットを用い

50

て分析する。

【0328】

LIPAMはまた、ハイスループット型の酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCALLINGプロセス(CuraGen Corp., New Haven CT)に用いて、遺伝子の2大ライブラリによってコードされるタンパク質間の全ての相互作用を決定し得る(Nandabalan, K. 他(2000)米国特許第6,057,101号)。

【0329】

18. LIPAM活性の実証

選択された候補脂質分子(たとえばC4ステロール、オキシステロール、アポリポプロテインEおよびリン脂質)をマルチウェルプレートのウェル内にアレイ状に配置する。

LIPAMまたは生物学的に活性なLIPAM断片を、¹²⁵Iボルトンハンター試薬で標識する(例えばBolton A.E. および W.M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529-539を参照。)選択された候補脂質分子を標識化されたLIPAMでインキュベートし、洗浄する。標識化されたLIPAM複合体を持つウェルを全てアッセイする。様々なLIPAM濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したLIPAMの数量、親和性、および会合についての値を計算する。候補脂質分子へのLIPAMの結合が有意であることがLIPAMの活性を標示する。

【0330】

別方法として、LIPAMの活性を求めるために1パルミトイル2ピレニルデカノイルホスファチジルイノシトール(Phy(10)PI)を基質として連続蛍光移動アッセイを行うことができる。このアッセイでは、ピレニルアシル(Pyr(x))標識化リン脂質がクエンチされたドナー小胞からクエンチされていないアクセプター小胞に移動する結果生じるピレン単量体の蛍光強度の増加を測定する(Van Paridon 他(1988) Biochemistry 27:6208-6214)。ドナー小胞はPyr(x)ホスファチジルイノシトール(Pyr(x)PI)、2,4,6トリニトロフェニルホスファチジルエタノールアミン(TNP-PE)および卵のホスファチジルコリン(PC)からなり、モルパーセント比は10:10:80である(全リン脂質は2nmol)。アクセプター小胞はホスファチジン酸(PA)と卵のPCからなり、モルパーセント比は5:95である(全リン脂質が25倍過剰)。反応は0.1mgのBSAを含む2mlの20mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 200mM NaCl(pH 7.4)溶液中で37℃で行われた。反応は10~50μlのLIPAMの添加によって開始される。測定は恒温キュベットホルダーと攪拌器を備えた蛍光計を使って行われる。プログレス曲線の最初の傾きを移動活性の1任意単位とする(van Tiel, C.M. 他(2000) J. Biol. Chem. 275:21532-21538; Westerman, J. 他(1995) J. Biol. Chem. 270:14263-14266)。

【0331】

別方法として、LIPAMの活性は放射性脂肪酸前駆体が脂肪酸CoAに取り込まれる速度を測定することによって求められる。最終反応液には、全容積0.5mlに200mM Tris-HCl(pH 7.5)、2.5mM ATP、8mM MgCl₂、2mM EDTA、20mM NaF、0.1% Triton X-100、10mM [³H]オレイン酸、[³H]ミリスチン酸または[¹⁴C]デカン酸、0.5mM 補酵素A、およびLIPAMが含まれている。この反応は補酵素Aの添加によって始まり、35℃で10分間インキュベートの後、2.5mlのイソプロピルアルコール、nヘプタン、1MH₂SO₄(40:10:1)の添加で終了する。放射性脂肪酸はnヘプタンを使った有機抽出によって除去される。反応中に形成された脂肪酸アシルCoAは水溶性分画に残り、シンチュレーション計数により定量化される(Black, P.N. 他(1997) J. Biol. Chem. 272: 4896-4904)。

【0332】

別方法として、スフィンゴ脂質グルコシルセラミドの分解を測定することによってLIPAMの活性を求めることができる。さまざまな濃度のLIPAMと共に25~50マイクロユニットのグルコセレブロシダーゼを40μlの37℃反応液内で20分間インキュベートする。最終反応液は50mMクエン酸ナトリウム(pH 4.5)、ヒトの血清アルブミン20ngおよび3.125mMの脂質(リポソームとして)を含む。このリポソームの組成は[¹⁴C]グルコシルセラミド(3mol%, 2.4Ci/mol)、コレステロール(23mol%)、ホスファチジン酸(20mol%)、ホスファチジルコリン(54mol%)である。反応は160μlのクロロフォルム/メタ

10

20

30

40

50

ノール (2:1) および 20 μ l の 0.1% グルコースを加えて、振盪することで停止する。4000 rpmの遠心の後、酵素により水溶液相に放出された $[^{14}\text{C}]$ グルコースをシンチレーションカウンタで測定する。LIPAMの活性はグルコセレブロシダーゼによるグルコシルセラミドの加水分解速度を増加させる効果によって求めることができる(Wilkening, G. 他 J. Biol. Chem. (1998) 273:30271-30278)。

【0333】

別方法として、LIPAM活性を実証するには、或る *in vitro* の加水分解アッセイを用い得る。このアッセイには、1パルミトイル2 $[^{14}\text{C}]$ オレオイル ホスファチジルコリン (Sigma-Aldrich) を含有する小胞を用いる。LIPAMトリグリセリド リパーゼ活性およびホスホリパーゼ A_2 活性を実証するには、この加水分解反応混合液から単離した切断産物群の分析を行う。

10

【0334】

1パルミトイル2 $[^{14}\text{C}]$ オレオイル ホスファチジルコリン (Amersham Pharmacia Biotech.) 含有小胞を調製するには、2.0 μ Ci の放射標識したリン脂質と、12.5 mgの標識しない1パルミトイル2オレオイル ホスファチジルコリンとを混合し、この混合物を窒素 (N_2) 下で乾燥させる。2.5 ml の 150 mM TrisHCl (pH 7.5) を添加し、この混合物を超音波処理して遠心分離する。この上澄みは4 時間で貯蔵できる。最終反応混合物には、0.25 ml の Hanks 緩衝食塩水 (pH 7.4) に、2.0 mM タウロケノデオキシコール酸 (taurochenodeoxycholate)、1.0% ウシ血清アルブミン、1.0 mM の CaCl_2 、150 μ g の 1パルミトイル2 $[^{14}\text{C}]$ オレオイル ホスファチジルコリンの小胞、様々な量のLIPAM (PBS中で希釈) を含む。

インキュベートを 30 分間 37 度で行った後、各20 μ g のリゾホスファチジルコリンとオレイン酸とをキャリアとして加え、各サンプルの総脂質を抽出する。脂質類を分離するため、薄層クロマトグラフィーを実施し、これには2溶媒系を使用する。すなわち先ずクロロフォルム：メタノール：酢酸：水 (65:35:8:4) を用い、溶媒先端がプレートの半ばに至るまで行う。このプロセスには続いてヘキサン：エーテル：酢酸 (86:16:1) を用い、溶媒先端がプレートの上端に至るまで行う。脂質を含有する各領域をヨウ素蒸気で可視化し、スポット群をすりをはがして、その放射能をシンチレーション計数で判定する。より多量のLIPAMがアッセイ混合液に加えられると脂肪酸として放出される放射エネルギーが増加し、一方、リゾホスファチジルコリンとして放出される放射エネルギーは低いままになる。これは、ホスホリパーゼ A_2 活性の特徴として、LIPAMがsn-1位ではなくsn-2位を切断することを立証する。

20

30

【0335】

別方法として、LIPAMのホスホリパーゼ活性は、ホスファチジルセリンのsn-1位での、脂肪アシル残基の加水分解によって測定される。LIPAMが、好適なバッファー中で三重水素 $[^3\text{H}]$ 標識された基質のホスファチジルセリンとを化学量論的な量で組み合わせられる。好適なインキュベーション時間の後、クロマトグラフィー法によって加水分解反応生成物が基質から分離される。生成されたアシルグリセロホスホセリンの量を、シンチレーションカウンターを使って、トリチウム化された生成物をカウントして測定する。バックグラウンドノイズと組み込まれなかった基質とを明らかにするために、種々の対照グループが設定される。最終的なカウントは、トリチウム化酵素生成物である $[^3\text{H}]$ アシルグリセロホスホセリンを表している。 $[^3\text{H}]$ アシルグリセロホスホセリンは、生体サンプル内のLIPAM活性に直接比例する。

40

【0336】

LIPAMリポキシゲナーゼ活性はクロマトグラフィー法で測定できる。抽出されたLIPAMリポキシゲナーゼタンパク質を100 μ Mの $[1-^{14}\text{C}]$ アラキドン酸、又は他の無標識脂肪酸と30分間37 度でインキュベーションする。インキュベーション後、停止溶液 (アセトニトリル：メタノール：水、350：150：1) が加えられる。サンプルを抽出し、メタノール/水/酢酸 (85：15：0.01) (容積/容積) の溶媒システムを1 ml/分の流速で使って、逆相HPLCで分析する。廃液を235 nmでモニターして、12-HPETE (12-LOXにより触媒する) 等の主要なアラキドン酸代謝産物の存在を分析した。画分もまた液体シンチレーシ

50

ヨン計数にかけられる。最終的なカウントは、生物サンプルでのLIPAM活性に直接比例する生成物を表す。立体化学的分析のために、アラキドン酸の代謝産物はさらにキラル相HPLC及び質量分析で分析される(Sun, D. 他(1998) J. Biol. Chem. 273:3354033547)。

【0337】

LIPAMのシアリダーゼ活性はさまざまな基質を使ってアッセイされる。限定するものではないが、基質としては、2'-(4-メチルウンベリフェリル)-D-N-アセチルノイラミン酸、2'-0-(o-ニトロフェニル)-D-N-アセチルノイラミン酸、2'-0-(p-ニトロフェニル)-D-N-アセチルノイラミン酸および(2-3)-と(2-6)-シアリルラクトースが挙げられる。反応混合物は30 nmolの基質、0.2 mgのウシ血清アルブミン、10 μmolの酢酸ナトリウム(pH 4.6)、0.2 mgのTriton X-100および精製LIPAM(またはLIPAMを含むサンプル)を含む。37°Cで10~30分間インキュベートした後、放出されたシアル酸をチオバルビツール酸法を使って定量する(Aminoff, D. (1961) Biochem. J. 81:384-392)。シアリダーゼ活性の1単位は、基質から1時間に1 nmolのシアル酸の放出を触媒するLIPAMの量として定義される(Hasegawa, T. 他(2000) J. Biol. Chem. 275:8007-8015)。

10

【0338】

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

20

【0339】

(表の簡単な説明)

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

【0340】

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

【0341】

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

30

【0342】

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

【0343】

表5は、本発明のポリヌクレオチドの代表的なcDNAライブラリを示す。

【0344】

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

40

【0345】

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

【0346】

【表1】

表 1

Incyte プロジェクト ID	ポバチド SEQ ID NO	Incyte ポバチド ID	ポバチド SEQ ID NO	Incyte ポバチド ID
7472774	1	7472774CD1	10	7472774CB1
2884821	2	2884821CD1	11	2884821CB1
72852842	3	72852842CD1	12	72852842CB1
7484271	4	7484271CD1	13	7484271CB1
7474074	5	7474074CD1	14	7474074CB1
72024970	6	72024970CD1	15	72024970CB1
6131380	7	6131380CD1	16	6131380CB1
643681	8	643681CD1	17	643681CB1
6897474	9	6897474CD1	18	6897474CB1

10

20

30

【 0 3 4 7 】

【 表 2 】

表2

ポリクワッド SEQ ID NO.	Incyte ポリクワッド ID	GenBank ID NO.	融率 スコア	GenBank 相同体
1	7472774CD1	94886978	1.6E-161	[ヒト] 細胞質ソルホスホリパーゼA2 ペーダー; cPLA2 ペーダー (Song, C. 他 (1999) J. Biol. Chem. 274:17063-17067)
2	2884821CD1	914669826	0.0	リボ酸シクタンーゼ [マウス] (Morikawa, T. 他 (2001) FEBS Lett. 498:16-21)
3	72852842CD1	94894788	2.5E-126	[マウス] ホスホリパーゼC ゴルタ1 (Lee, W.K. 他 (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 261:393-399)
4	7484271CD1	92138183	2.7E-11	[マウス] 多発性覆胞腎1 タンパク質 (Lohring, C. 他 (1997) Mamm. Genome 8:307-311)
5	7474074CD1	94090960	3.1E-63	[ヒト] ホスホアチシルセリン特異的ホスホリパーゼA1 (Nagai, Y. 他 (1999) J. Biol. Chem. 274:11053-11059)
6	72024970CD1	913560884 96705987	1.0E-109 1.1E-164	炭酸リパーゼ [アノウサギ] [マウス] ホスホリパーゼC-2 (Otauki, M. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:97-103)
7	6131380CD1	95771350 92618983	0.0 0.0	[マウス] M-RdgB2 レチナル環状タンパク質B サブタイプ2 (Lu, C. 他 (1999) J. Neurosci. 19:7317-7325) [マウス] 膜結合型ホスホアチシルイノシトール伝達タンパク質 membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein (Aikawa, Y. 他 (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. 236:559-564)
8	643681CD1	98452870	1.2E-36	[ヒト] リボ多糖類特異的炭酸 68 タンパク質
9	6897474CD1	96651241	3.8E-188	[マウス] TAGL ペーダー

【 0 3 4 8 】
【 表 3 - 1 】

表3-1

SEQ ID NO	invertebrate ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグナルペプチド、トメインおよびモチーフ	分析手法およびデータベース
1	7472774CD1	996	S34 S46 S64 S133 S151 S169 S183 S219 S273 S294 S418 S557 S652 S662 S769 S928 T17 T24 T87 T104 T227 T248 T368 T603 T722 T775 T808 T916 T952 Y38 Y664	N201 N362 N718 N834 N914	膜貫通トメイン E276-L301, S696 S720 N末端は細胞質リル内 細胞質ソルホスホリル化A2 CPLA2 は以下を 含む: ホスファチジルユリン 2 アシルヒドコロ ーゼ リソホスホリル化ヒトローラーゼ 脂質 PD014471: G542-L711, G812-N914	TMAP BLAST- PRODOM
2	2884821CD1	372	S2 S30 S57 S145 S229 S258 S352 T58 T96 T104 T148 T163 T178 T240 T252 T313 T369		シンセターゼ リボ酸 リブシン リボ酸塩 鉄硫 黄シンターゼ 細胞体 ミトコンドリアトランジ ト: PD149846: L80-D135 PD05028: Q311-E357 do シンターゼ; リボ; 酸; 生合成: DM02726 P32875 79-413: K36-K370 DM02726 E36953 1-310: 274-A355 DM02726 G64043 7-320: L74-A355 DM02726 P25845 7-320: N65-A355 細胞接着配列: R217-D219	BLAST- PRODOM BLAST-DOMO
3	72852842CD1	649	S313 S419 S429 S542 S574 T24 T56 T68 T79 T220 T267 T303	N417 N578	C2 トメイン L525-T613 ホスファチジルノシトール特異的 ホスホリル化 C、X ト イン: D-56-K300	MCIFPS HMMER-PFAM HMMER-PFAM

10

20

30

【 0 3 4 9 】

【 表 3 - 2 】

表3-2

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチヤ配列、ドメインおよびモチーフ	分析手法およびデータベース
3			T381 T397 T440 T452 T526		ホスファチジルイノシトール特異的 ホスホリパーゼC、Yドメイン、 A389-R506 ホスファチジルイノシトール特異的 ホスホリパーゼシグネチヤ Y BL59007: L161-G206, T220-Q257, L284-K300, H439-G480, Q690-L636 ホスホリパーゼCシグネチヤPR00390: P160-Q178, W186-G206, T283-K300, I444-W465, W465-M483, L614-R624 ホスホリパーゼCホスホリエステラーゼヒドラーゼ1-ホス7 アチジルイノシトール-4,52リン酸 脂質 分解 トランス テューサー ホスホイノシチド特異的: PD001214: D156-K300 PD001202: L390-R506 ホスホリパーゼ1、ホスファチジルイノシトール 452リン酸 ホスホエステラーゼ ヒドロー 一ゼ 脂質 分解 トランステューサーC カルシウム結 合: PD004439: R4-Q155	EMMER-PFAM BLIMFS-BLOCKS BLIMFS-PRINTS BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM
4	7484271CD1	2020	S76 S163 S245 S436 S578 S598 S693 S705 S706 S710 S711 S712 S809 S812	R341 N1128 N1248 N1296 N1336 N1593 N1553 N1680	1-ホスファチジルイノシトール-4,5-2リン酸 ホスホシ イステラーゼD: DM00855 P51178.64-472: W5-E332 DM00712 P51178.474-754: K378-V645 DM00855 A48047 58-521: N47-S350 DM00855 P10894 52-503: N47-D328 PLAT/LM2(ホリスチン-1,リホキシガナーゼ、 α -糖 素)/ホスホシグナーゼ(相同性)ドメイン N769-E885, T1632 F1749 F431-Y550, T922-L1039, V1901-L2016, I43-Y159, V1207-R1322, A300-L419, V1505-C1620, V561-E677, F172-M286, V1053-L1177, I1374-R1489, T1763-E1883	EMMER-PFAM

【 0 3 5 0 】
【 表 3 - 3 】

表3-3

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグナルペプチド、ドメインおよびモジュール	分析方法およびデータベース
4			S960 S965 S1139 S1167 S1192 S1312 S1335 S1349 S1406 S1424 S1535 S1576 S1607 S1715 S1723 S1737 S1739 S1800 T116 T292 T360 T427 T462 T656 T927 T949 T963 T996 T1092 T1166 T1173 T1184 T1250 T1298 T1382 T1487 T1745 T1763 T1810 T1852 T1854 T1909 T1932 T1950 T2012 Y771 Y790 Y1180 Y1329 Y1429 Y1975	N1790 N1799 N1988	膜貫通ドメイン L31-DE3, A1071-R1095, T1487-M1512 N末端は細胞質リル内にある タンパク質 腎多発癌前 リヒン-ト 膜貫通 多量胞 前駆体 常染色体 優性: PD010179, Y1634-K1793 細胞接着配列: R1482-D1484, R2007-D2009 ATP/GTP 結合部位モジュール A (P-loop): G1239-S1246	TMAP
5	7474074CD1	415	S145 S151 S232 S311 T27 T84 C135 T304 T371 T411	N18 N35	シグナル切断: M1-S43 リパーゼ: M1-L275 膜貫通ドメイン: D106-I134, T278-M306 N末端は細胞質リル内にある	SPSCAN HMMER-PFAM TMAP

【 0 3 5 1 】
【 表 3 - 4 】

表3-4

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチヤ配列、ドメインおよびモチーフ	分析手法およびデータベース
5					リパーゼ、セリンタンパク質 BL00120: N62-I76, D106-S120, Y183-C193 トリアシルグリセロールリパーゼファミリー シグネチヤ PR00821: N107-K125, I64-R79 C206-T221, N19-Y38, I64-R79 スズメバチ毒アレルゲン ホスホリパーゼA1 シ グネチヤ PR00825: P148-H165, L171-P191 リパーゼ前駆体シグナルヒドロラーゼ 糖質分解糖タン パク質 糖タンパク質 膜タン PD001492: N6-L314	BLIMPS- DATABASES BLOCKS BLIMPS- PRINTS BLIMPS- PRINTS BLAST- PRODOM BLAST- DOMO
6	72024970CD1	1152	S79 S9 S124 S154 S186 S235 S276 S350 S445 S483 S487 S543 S550 S558 S565 S577 S584 S591 S649 S681 S881 S918 S932 S980 S1100 S1111 T134 T173 T236 T387 T504 T512 T615	N290 N303 N472 N534	C2 ドメイン L756-T848 PH ドメイン A44-A151 ホスファチシルイノシトール特異的 ホスホリパーゼ: E323-K468, A621-C736 EF/AND: W189-L197, R205-M234 ホスファチシルイノシトール特異的 ホスホリパーゼ X-box ドメインタンパク質 BL50007: F669-G710, D835-I871, L328-G373, T387-Q424, L452-K468 C2 ドメイン シグネチヤ PR00360: R777-I789, N807-M820, V829-D837 ホスホリパーゼ C シグネチヤ PR00390: F327-Q345, D353-G373, T451-K468, L674-W695, W695-L713, L849-R859	HMWER-PFAM HMWER-PFAM HMWER-PFAM HMWER-PFAM BLIMPS- BLOCKS BLIMPS- PRINTS BLIMPS- PRINTS

10

20

30

【 0 3 5 2 】

【 表 3 - 5 】

表3-5

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析手法およびデータベース
6			T812 Y628		ホスホリパーゼCホスホジステラーゼヒドロラーゼ1-ホスファチジルイノシトール-4,5-2リン酸脂質分解トランスフェラーゼホスホイノシチド特異的: PD001214: D323-K468 PD001202: L622-P732 ホスホリパーゼ1ホスファチジルイノシトール-4,5-2リン酸ホスホジステラーゼヒドロラーゼ脂質分解トランスフェラーゼCカルシウム結合: PD004439: Q100-Q322 1-ホスファチジルイノシトール-4,5-2リン酸 ホスホジステラーゼD EM00855: P5-178 64-472: S88-D494 P08487 71-500: I87-G500 P16885 63-486: I87-E485 P40977 208-616: I89-N499 EF-ハンドドメイン結合ドメイン: D178-V190	BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-DOMO
7	6131380CD1	1294	S29 S38 S129 S164 S205 S254 S290 S307 S310 S313 S314 S324 S340 S341 S353 S367 S399 S443 S444 S496 S504 S584 S585 S589 S592	N31 N652 N911 N945 N1006	ホスファチジルイノシトール伝達タンパク質: M1-L253 膜貫通ドメイン: G553-C572, A711-K737, T1050-V1065 N-terminus is non-cytosolic ホスファチジルイノシトール伝達タンパク質シグネチャ PR00391: F198-D213, V219-S238, E16-G35, V85-F105, I111-F126 タンパク質ホスファチジルイノシトール伝達 アイソフォームPTD INS PTD INSTP 脂質結合輸送アルブア FIT P アルブア: PD0063168: M1-M257	EMMER-PFAM TMAP BLIMPS-PRINTS BLAST-PRODOM

【 0 3 5 3 】
【 表 3 - 6 】

表4-1

ポリクロオキシド SEQ ID NO./ Inocyte ID/ 配列番号	配列断片
10/7472774CB1/ 3879	1-326, 1-558, 310-558, 463-2162, 665-811, 1490-2112, 1491-1672, 1491-1787, 1491-1823, 1491-1889, 1491-1892, 1491-1958, 1491-1972, 1491-2022, 1491-2025, 1491-2119, 1491-2120, 1493-2120, 1496-2120, 1497-2050, 1499-2120, 1557-2297, 1587-1985, 1648-2133, 1675-3297, 1767-2120, 1807-2166, 1854-2297, 1857-2297, 1926-2297, 1944-2150, 1944-3300, 2277-3949, 2281-2524, 2281-2898, 2281-2949, 2282-2947, 2325-2934, 2330-2935, 2340-2935, 2347-2934, 2387-2910, 2389-2934, 2395-2949, 2417-2524, 2445-2935, 2464-2934, 2466-2934, 2486-2934, 2503-2935, 2514-2934, 2532-2934, 2563-2935, 2597-2935, 2729-2878, 2729-3192, 2729-3249, 2739-3339, 2729-3399, 2868-3420, 2934-3473, 2988-3592, 3066-3823, 3121-3726, 3179-3879, 3182-3875, 3182-3876, 3182-3878, 3182-3879, 3183-3879, 3184-3879, 3199-3565, 3220-3549, 3228-3802, 3269-3410, 3269-3646, 3291-3879
11/2884821CB1/ 1623	1-318, 52-352, 60-246, 60-318, 60-362, 60-371, 60-743, 61-307, 63-314, 63-341, 81-395, 88-366, 96-371, 99-725, 107-351, 111-803, 124-380, 168-791, 231-672, 259-905, 263-932, 368-636, 381-610, 381-845, 389-658, 389-833, 420-1067, 471-698, 524-1054, 654-1087, 681- 1236, 721-1255, 765-1317, 770-1271, 838-1233, 856-1078, 856-1245, 856-1321, 856-1512, 879-1524, 952-1152, 1021-1496, 1050-1623, 1076-1449, 1089-1623, 1136-1313, 1153-1595, 1192-1333
12/72852842CB-/ 2199	1-445, 1-550, 1-853, 336-1614, 1197-1819, 1200-1840, 1249-1569, 1249-1573, 1251-1569, 1251-1573, 1288-1569, 1288-1573, 1300-2059, 1336-2135, 1343-1818, 1383-2137, 1551-1814, 1551-2164, 1577-2137, 1683-1835, 1727-2137, 1734-2197, 1758-2198, 1765-2197, 1768-2137, 1769-2197, 1791-2137, 1798-2137, 1851-2137, 2004-2137, 2004-2137, 2042-2137, 2058-2197, 1-130, 1-131, 1-34, 1-522, 1-712, 22-131, 35-131, 36-129, 67-679, 69-91, 70-91, 129-149, 129-150, 158-285, 158-288, 158-527, 158-652, 158-672, 179-648, 192-858, 193-684, 226-248, 227-248, 234-1071, 264-1071, 443-1071, 451-1071, 456-1070, 523-1071, 535-1071, 558-1071, 565-1071, 568-1071, 574-1071, 577-1071, 591-1071, 869-1267, 1177-1440, 1177-1699, 1321- 2700, 1373-2040, 1374-1821, 1374-2040, 1377-1998, 1377-2040, 1613-1935, 1884-2040, 1889- 2040, 1894-2040, 2061-2421, 2061-2434, 2061-2504, 2061-2553, 2061-2570, 2061-2576, 2061- 2628, 2061-2671, 2061-2674, 2061-2738, 2061-2812, 2062-2253, 2062-2448, 2062-2572, 2062- 2590, 2062-2672, 2062-2673, 2062-2687, 2066-2639, 2129-2891, 2140-2639, 2145-2646, 2149- 2674, 2152-2768, 2155-2674, 2156-2783, 2160-2778, 2196-2930, 2198-2918, 2212-2513, 2212- 2639, 2212-2643, 2212-2666, 2212-2670, 2212-2671, 2212-2683, 2212-2689, 2212-2700, 2218- 2700, 2233-2904, 2234-2952, 2249-2700, 2251-2907, 2251-3263, 2266-2700, 2283-2964, 2494- 2946, 2538-2700, 2553-2700, 2608-2700, 2691-3263, 2738-3245, 2741-3238, 2741-3263,
13/7484271CB1/ 6326	

10

20

30

【 0 3 5 5 】
【 表 4 - 2 】

表4-2

ポリ双列オキド SEQ ID NO./ Ineyte ID/ 配列番号	配列断片
13 (続き)	2741-3266, 2741-3273, 2741-3326, 2837-3346, 2837-3362, 2837-3368, 2837-3451, 2865-4748, 2870-3645, 2887-3575, 2893-3405, 2913-3195, 2916-3489, 2921-3648, 2926-3548, 2932-3332, 2933-3642, 2937-3271, 2938-3648, 2943-3648, 2952-3648, 2975-3648, 2977-3342, 2978-3439, 2986-3640, 2989-3648, 2999-3648, 3012-3648, 3031-3648, 3032-3551, 3033-3606, 3037-3648, 3044-3648, 3059-3648, 3063-3641, 3074-3646, 3092-3648, 3103-3648, 3107-3644, 3111-3648, 3117-3648, 3125-3642, 3128-3648, 3132-3648, 3137-3648, 3141-3648, 3145-3648, 3151-3648, 3157-3648, 3158-3648, 3159-3648, 3193-3648, 3211-3648, 3249-3648, 3319-3648, 3473-3648, 3653-3951, 4338-4615, 4338-4865, 4397-4660, 4397-4762, 4397-5019, 4464-5142, 4542-5043, 4633-5264, 4658-5249, 4722-5199, 4723-5268, 4773-5280, 4798-5285, 4857-5400, 4890-5522, 4967-5582, 5024-5613, 5045-5079, 5045-5083, 5045-5084, 5045-5091, 5048-5706, 5158-5713, 5178-5779, 5214-5890, 5240-5889, 5269-5815, 5275-5892, 5290-5939, 5363-5620, 5373-5951, 5381-5924, 5397-5747, 5478-6326, 5539-5915, 5801-6246, 5801-6298, 5801-6326, 5833-6326, 5852-5898, 5855-5898, 5856-5898
14/7474074CBI/ 1561	1-262, 132-1314, 260-322, 646-763, 646-771, 646-897, 718-771, 718-856, 718-857, 718-859, 7-8-860, 770-1161, 1099-1561, 1100-1290, 1100-1556, 1100-1561, 1165-1561, 1273 1561, 1290-1559, 1302-1559, 1395-1556
15/72024970CBI/ 4941	1-698, 1-782, 1-740, 1-744, 1-753, 1-762, 1-764, 1-818, 5-506, 109-686, 123-681, 160-756, 212-870, 281-804, 229-824, 338-862, 389-615, 418-1240, 426-1240, 428-822, 430-885, 431-1240, 435-1019, 443-1240, 445-1094, 445-1107, 448-1240, 451-1138, 454-1000, 454-1240, 456-1240, 463-1056, 470-1019, 471-1019, 471-1240, 488-646, 488-1191, 488-1217, 488-1223, 488-1236, 488-1240, 491-1240, 511-1008, 516-988, 520-979, 532-1240, 534-1240, 538-1166, 541-1240, 548-1132, 571-1239, 578-1240, 582-1153, 607-1011, 607-1240, 622-1094, 626-1240, 634-1240, 637-1240, 639-666, 641-686, 645-1240, 654-946, 654-1198, 654-1199, 657-1240, 663-1240, 668-1240, 670-1240, 675-1240, 676-1240, 677-761, 682-1240, 684-1240, 685-1240, 696-1240, 703-1240, 728-1240, 736-1240, 737-1166, 744-1084, 747-1554, 754-1240, 798-1240, 807-1240, 812-1240, 823-1240, 831-1107, 852-1240, 854-1240, 873-1240, 873-1240, 877-1240, 903-1240, 909-1240, 910-1554, 912-1240, 913-1240, 915-1240, 928-1240, 941-1240, 949-1077, 949-1379, 949-1418, 949-1423, 949-1437, 949-1462, 949-1463, 949-1469, 949-1473, 949-1493, 950-1493, 951-1493, 955-1493, 956-1493, 982-1240, 982-1487, 982-1497, 988-1012, 988-1015, 988-1016, 990-1015, 994-1229, 994-1236, 994-1240, 996-1240, 996-1565, 1031-1493, 1090-1631, 1090-1668, 1090-1670, 1096-1635, 1096-1689, 1100-1630, 1119-1548, 1134-1665, 1134-1698, 1134-1734, 1157-1740, 1158-1687, 1158-1689, 1165-1771, 1337-1493, 1259-1391,

【 0 3 5 6 】
【 表 4 - 3 】

表4-3

ポリケイオキシド SEQ ID NO./ Incyte ID/ 配列長	配列断片
15 (続き)	1275-1605, 1276-1493, 1347-1933, 1358-1896, 1369-1844, 1369-1860, 1369-1865, 1369-1896, 1369-1900, 1369-1977, 1374-1495, 1380-1890, 1404-1874, 1499-2026, 1499-2036, 1508-1976, 1524-2192, 1528-2192, 1539-2050, 1554-2192, 1569-2193, 1572-2026, 1593-2192, 1594-2192, 1604-2192, 1605-2191, 1609-2192, 1620-2192, 1624-2192, 1632-2192, 1637-2192, 1652-2191, 1652-2192, 1666-2192, 1671-2192, 1735-1784, 1735-2192, 1747-2192, 1757-2192, 1764-2192, 1767-2192, 1776-2261, 1790-2406, 1839-2192, 1873-2192, 1888-2192, 1895-2192, 1916-2191, 1916-2192, 1922-2192, 1936-2192, 1947-2192, 1998-2617, 2062-2625, 2093-2192, 2094-2193, 2128-2434, 2128-2749, 2132-2291, 2136-2754, 2199-2736, 2238-2980, 2287-2969, 2294-2558, 2303-2885, 2304-2980, 2309-2759, 2309-2940, 2356-3100, 2371-2989, 2456-3077, 2491-2945, 2540-2808, 2610-3047, 2611-3153, 2648-3156, 2668-2880, 2672-3326, 2787-3622, 2810-3135, 2810-3139, 2813-3383, 2814-3244, 2814-3267, 2814-3360, 2814-3376, 2814-3377, 2819-3376, 2823-3321, 2824-3374, 2863-3217, 2883-3218, 2956-3377, 2996-3555, 3048-3803, 3052-3718, 3113-3657, 3120-3215, 3265-3489, 3267-3485, 3365-3718, 3485-3715, 3505-3718, 3539-3739, 3548-3718, 3551-3987, 3566-3716, 3610-3912, 3721-3875, 3744-3799, 3745-4088, 3746-4083, 3759-4011, 3820-4344, 3829-4078, 3849-3997, 3939-4509, 4064-4284, 4152-4632, 4213-4468, 4213-4736, 4213-4761, 4213-4868, 4213-4941, 4227-4386, 4239-4468, 4247-4744, 4262-4543
16/6131380CBI/ 4159	1-353, 54-579, 283-334, 349-381, 351-322, 376-643, 450-708, 488-809, 545-690, 657-1226, 704-1358, 805-1358, 911-1358, 1026-1226, 1030-1717, 1037-1467, 1039-1467, 1044-1598, 1103-1714, 1119-1714, 1133-1717, 1316-1985, 1322-1753, 1362-1691, 1497-1657, 1575-1985, 1715-2268, 1743-1938, 1766-2201, 1771-2095, 1835-2332, 1885-2434, 1975-2329, 1993-2632, 2003-2507, 2054-2991, 2267-2507, 2326-2507, 2330-2507, 2451-2507, 2888-4159
17/643681CBI/ 1481	1-299, 51-328, 51-335, 84-353, 92-342, 95-315, 107-370, 128-376, 139-459, 168-431, 181-447, 191-421, 196-606, 217-516, 287-520, 335-578, 344-599, 344-880, 361-659, 379-637, 385-617, 458-745, 541-768, 541-805, 544-788, 544-1065, 681-1250, 708-939, 718-1299, 726-969, 747-1399, 757-965, 772-1377, 794-1077, 796-1399, 811-1057, 846-1394, 864-1120, 865-1127, 871-1107, 871-1341, 871-1399, 873-1402, 904-1142, 904-1169, 975-1214, 1003-1242, 1021-1286, 1057-1245, 1098-1281, 1112-1365, 1173-1391, 1173-1398, 1173-1427, 1173-1430, 1237-1481
18/6897474CBI/ 1841	1-534, 1-1841, 6-150, 7-196, 43-379, 43-572, 58-584, 228-744, 228-810, 515-1169, 805-1409, 889-1436, 889-1455, 1216-1766, 1287-1834, 1486-1734, 1526-1836, 1526-1841

10

20

30

【 0 3 5 7 】

【 表 5 】

表 5

ポリアクレオキシド SEQ ID NO.	Incyte プロジェクト ID	代表的 ライブラリ
10	7472774CB1	MYEPTXT02
11	2884821CB1	TLXNMT08
12	72852842CB1	TESTNOT17
13	7484271CB1	CONRFEC01
14	7474074CB1	UTRSNOR01
15	72024970CB1	LIVRTXS02
16	6131380CB1	NERDTN03
17	643681CB1	PEN.TDT01
18	6897474CB1	LIVRTMR01

10

20

30

【 0 3 5 8 】

【 表 6 - 1 】

表6 --1

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
BONRPEC01	pINCY	この大型分画のライブラリは妊娠20週にてパター症候群(13-トリソミー)で死亡した白人男子胎児から採取した肋骨から単離したRNAを用いて作製した。血清学は陰性であった。
LIVRTR01	PCDNA2.1	このランダムプライムされたライブラリは62才の白人女性の部分肝切除と診査開腹術中に採取した肝臓組織から単離したRNAを用いて作製した。マッチングされた腫瘍組織の病理は、島細胞腫と一致した転移性で中程度の神経内分泌悪性腫瘍を示し、腫瘍は、内側と外側の左肝葉でサイズの異なる結節を形成していた。腫瘍には、偽性嚢胞と一致する、繊維症、慢性炎症及び脂肪壊死が認められた。胆嚢には軽度の慢性胆管炎が認められた。患者の病歴には、陰嚢部の悪性腫瘍、肺塞栓症、高脂質血症、血栓症、複数の腸管における腸閉塞、II型糖尿病、慢性高血圧症、脳血管疾患および正常な出産が含まれる。以前の手術としては、遠位尿管切除、膀胱全摘出術、部分肝切除があった。家族の病歴には、(二次性)肝臓癌を伴う) 腫瘍症、良性高血圧症、高脂血症が認められた。
LIVRTR02	pINCY	このサブトランジェクションされたC3A肝臓腫瘍細胞株組織ライブラリは、処理した肝細胞ライブラリの640万のクローンをを用いて作製され、未処理のC3A肝細胞株ライブラリの172万のクローンとの2回のサブトランジェクション/ハイブリダイゼーションにかけられた。サブトランジェクション開始ライブラリは処理済みC3A肝細胞細胞系から単離したRNAを用いて作製したが、このC3A肝細胞細胞株は、15才の白人男子から採取した肝臓由来する細胞株である。細胞は3-メチルコレステロール (MCA) で処理された。サブトランジェクション用ハイブリダイゼーションプロトコルは同じ細胞株からの未処理のC3A肝細胞細胞組織から単離されたRNAから同様で作製されたライブラリから得られた。サブトランジェクション/ハイブリダイゼーションの条件は Swarcop b, NAR 19 (1991):1954 および Ronaldoらの Genome Research 6 (1996):791の方法に基づいたものである。
MSPPT02	pINCY	ライブラリは53才の11女性から採取された慢性骨髄性白血病前駆細胞由来の処理されたK-562細胞系から単離したRNAを用いて作製した。細胞は1mmのPMAで96時間処理した。
NERTRD03	pINCY	この増殖させた後根神経節組織のライブラリは、後根神経節組織のライブラリの105万の独立クローンから作製した。開始RNAは、急性肺水腫、急性気管支肺炎、双方胸膜滲出、心臓滲出、及び悪性リンパ腫(チチユルキラ細胞タイプ)のため死亡した32才の白人男性の頸部脊髄から取り除かれた後根神経節組織から作製された。

【 0 3 5 9 】
【 表 6 - 2 】

表6-2

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
NERDTON03 (続き)		当患者には、原因不明の発熱、倦怠感、疲労、及び腎臓内出血があった。当患者の病歴には、巨細胞ウイルス感染の高い可能性、肝臓腫血、脂肪症、脾腫、出血を伴う膀胱炎、甲狀腺出血、呼吸困難、左肺の肺炎、咽頭のナチエロウイルス細胞リンパ腫、ヘルペス、及びタリビドアルコールの薬用等がある。以前に受けた手術には、結腸内視鏡、結腸生検、アデノイド口蓋扁桃摘出術、鼻咽喉、内視鏡検査、生検等がある。当患者の薬物療法には、Diflucan (flucanazole)、Deltasone (prednisone)、hydrocodone、Lortab、アルブトラム (Alprazolam)、Reaxodone、PiroMace-Cytabom、Etoposide、シスプラチン (Cisplatin)、シタラビン (Cytarabine)、及びデキサメタゾン (dexamethasone) 等がある。当患者は放射線療法及び複数の輸血を受けた。このライブラリは、極めて長時間 (48時間/回) の前アニーリングによるハイブリダイゼーションを用いたことを除いては、Scares 他, PNAS (1994) 91:9228-9232 および Bonaldo 他, Genome Research (1996) 6:791 を適応した条件を用いて2回にわたりノーモライズした。
PEN-TUT01	P1NCY	ライブラリは64才の白人男性の陰茎から陰茎切断時に切除した腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理検査では、嚙状に発育する慢性的な扁平上皮細胞癌が包皮の内腔にあり電顕に及んでいた。患者の病歴には良性的大腸腫瘍、アデノイド性腎動脈疾患、狭心症、痛風および肥満が含まれる。家族の病歴には、悪性咽頭腫瘍、慢性リンパ球性白血病および慢性肝臓病がある。
TESTNOT17	P1NCY	ライブラリは、自動車事故による頭部傷害で死亡した26歳の白人男性の精巣組織から作製された。血清検査は陰性であった。患者の病歴には、誕生時のヘルニア、タリビドの使用 (1日1.5箱)、マリファナの使用および毎日のアルコール飲料 (ビールと蒸留酒) があつた。
TLYMN0708	P1NCY	ライブラリは40~50才の一人の白人成人男性から取り除かれた anergic cellogenetic な Tリンパ球組織から単離されたRNAを用いて作製した。細胞は $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の OKT3 mAb と 5% ヒト血清の存在下で3日間インキュベートされた。
UTRSNGR01	P1NCY	ライブラリは、膀胱癌術後および腫式子宮摘出術を行った白人女性 (29才) から取り除かれた子宮内膜組織から単離したRNAを用いて作製した。病理検査は、子宮内腔に分泌性であること、頸部に膜高性の扁平上皮異形成を伴う軽度の慢性子宮頸管炎を示した。関連する腫瘍組織の病理学検査では、健子宮内腔平滑筋腫瘍が認められた。患者の病歴は、甲狀腺機能低下症、骨盤底弛緩、対麻痺を示した。家族の病歴には、良性的高血圧、II型糖尿病および高脂血症があつた。

10

20

30

【 0 3 6 0 】
【 表 7 - 1 】

表7-1

プログラム	説明	引用文献	パラメータ値
ABI FACTURA	ベクター配列を除き、核酸配列のまぎらわしい塩基をマスキングするプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	アミノ酸または核酸配列の比較、注釈に有用なアーストデータアインダ。	Applied Biosystems, Foster City, CA Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列の構築を行うプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	アミノ酸および核酸配列の配列類似性検索に有用なベクタローカルアライメント検索ツール (Basic Local Alignment Search Tool)。BLASTには5つの機能がある: blastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastx。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997) (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402	ESTs:確率値=1.0E-8 以下 完全な配列:確率値=1.0E-10以下
FASTA	一群の同じタイプの配列と問合せ配列との間の類似性について検索するPearsonおよびLipmanアルゴリズム。FASTAは最低5つの機能からなる。fasta、tfasta、fastx、tfastxおよびssearch。	Pearson, W.R. 及びD.J. Lipman (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol 183:63-98; およびSmith, T.F. and M.S. Waterman (1981) Adv. Appl Math 2:482-489.	ESTs:fasta E 値=1.06E-6 構築された ESTs fasta 同一性=95%以上 一致した長さ=200塩基以上 fasta E 値=1.0E-8 以下 完全な配列: fastx スコア=100以上
BLIMPS	配列をBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOMおよびPFAMデータベースの配列と対応させて遺伝子ファミリー、配列相対性および構造的アイソマープリント領域を構築するBILocks IMPROved Searcher	Henikoff, S. 及びJ.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572; Henikoff, J.G. 及びS. Henikoff (1996) Methods Enzymol 266:88-105; Attwood, T.K. 他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値=1.0E-3以下
HMMER	問合せ配列をPFAMのようになタンパク質ファミリーコンセンサス配列の隠れマルコフモデル (HMM) に基づいたデータベースに対して検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他 (1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他 (1998) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他. (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press. 1-350ページ, 1-350	PFAM E 値: 確率値=1.0E-3 以下 シグナル ペンゾチド ヒット: スコア =0以上

10

20

30

【 0 3 6 1 】
【 表 7 - 2 】

表7-2

プログラム	説明	引用文献	パラメータ閾値
ProfileScan	Prositeで定義された配列パターンと一致するタンパク質配列の構造的モチーフおよび配列モチーフを検索するアルゴリズム。	Gnatskov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66, Gnatskov, M. 他 (1989) Methods Enzymol. 83:146-159; Barroch, A. 他. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221	標準化された順スコアを特定の Prositeモチーフに対するGCG指 定 (HIGH) 値 通常、スコア=1.4~2.1
Phred	高度感受性および確立性のある自動シーケンサートレースを調べる塩基コールングアルゴリズム。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res 8:175-185; Ewing, B. および P. Green (1998) Genome Res 8:186-194	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的実行に基づいたプログラムである、SWATとCrossMatchを含むPhis改訂構築プログラムで、配列相溶性検査やDNA配列の構築に有用である。	Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147 195-197; Green, P. University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致した長さ=56以上
Consed	Phrap 構築の表示、編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキヤンし、分泌シグナルペプチドの存在を調べる重量マトリックス分析プログラム。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. 及び S. Audic (1997) CABIOS 12 431-439	スコア=3.5以上
TMAP	重量マトリックスを使ってタンパク質配列上の膜貫通部分を描写し、方向を決定するプログラム。	Persson, B. および P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. および P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	隠れMarkovモデル(HMM)を使ってタンパク質配列上の膜貫通部分を描写し、方向を決定するプログラム。	Somhammer, E.L. 他 (1998) Proc Sixth Inti Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow 他. 編集, The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, 175-182ページ。175-182	
Motifs	Prositeで定義されたものと一致するパターンをアミノ酸配列を検索するプログラム。	Barroch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25 217-221, Wisconsin Package Program Manual,バージョン9, MS1-59ページ, Genetics Computer Group, Madison, WI	

10

20

30

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
15 August 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/063005 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/47, A01K 67/00, C12Q 1/68, A61K 38/17,
G01N 33/50, C07K 16/18CA 95121 (US). FORSYTHE, Ian [US/US]; 308 Robie
Avenue, Redwood City, CA 94061 (US). RAMKUMAR,
Jayalaxmi [IN/US]; 34359 Maybird Circle, Fremont, CA
94555 (US). GANDHI, Ameena, R. [US/US]; 705 5th
Avenue, San Francisco, CA 94118 (US). ISON, Craig, H.
[US/US]; 1242 Weatherfield Way, San Jose, CA 95118
(US). WARREN, Bridget, A. [US/US]; 10130 Parkwood
Drive #2, Cupertino, CA 95014 (US). TANG, Y., Tom
[US/US]; 4230 Ranwick Court, San Jose, CA 95118 (US).
EMERLING, Brooke, M. [US/US]; 1735 Woodland
Avenue #71, Palo Alto, CA 94303 (US). HONCHELL,
Cynthia, D. [US/US]; 400 Laurel Street #203, San Carlos,
CA 94070 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/03813

(22) International Filing Date: 6 February 2002 (06.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/266,910 6 February 2001 (06.02.2001) US
60/276,891 16 March 2001 (16.03.2001) US
60/276,855 16 March 2001 (16.03.2001) US
60/279,760 28 March 2001 (28.03.2001) US
60/283,818 13 April 2001 (13.04.2001) US
60/285,405 20 April 2001 (20.04.2001) US(74) Agents: HAMLET-COX, Diana et al.; Incyte Genomics,
3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).(71) Applicant (for all designated States except US): INCYTE
GENOMICS, INC. [US/US]; 3160 Porter Drive, Palo
Alto, CA 94304 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DAS, Debopriya
[IN/US]; 1267 Parkington Avenue, Sunnyvale, CA 94087
(US). YAO, Monique, G. [US/US]; 1189 Woodgate
Drive, Carmel, IN 46033 (US). ARVIZU, Chandra
[US/US]; 1706 Monoco Drive, San Jose, CA 95125 (US).
BAUGHN, Mariah, R. [US/US]; 14244 Santiago Road,
San Leandro, CA 94577 (US). LI, Yan [US/US]; 3885
Corrina Way, Palo Alto, CA 94303 (US). HAFALIA,
April, J. A. [US/US]; 2227 Calle de Primavera, Santa
Clara, CA 95054 (US). WALLA, Narinder, K. [US/US];
890 Davis Street #205, San Leandro, CA 94577 (US).
GRIFFIN, Jennifer, A. [US/US]; 33691 Mello Way,
Fremont, CA 94555 (US). LU, Dyung, Aina, M. [US/US];
233 Coy Drive, San Jose, CA 95123 (US). YUE, Henry
[US/US]; 826 Lois Avenue, Sunnyvale, CA 94087 (US).
DING, Li [CN/US]; 3353 Alma Street, #146, Palo Alto,
CA 94306 (US). TOWNLEY, David, J. [GB/GB]; 10
Pendlands Court, Cambridge CB4 1JN (GB). ELLIOTT,
Vicki, S. [US/US]; 3770 Pollan Place Way, San Jose,(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KH, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

without international search report and to be republished
upon receipt of that reportwith sequence listing part of description published sep-
arately in electronic form and available upon request from
the International BureauFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/063005 A2

(54) Title: LIPID-ASSOCIATED MOLECULES

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

LIPID-ASSOCIATED MOLECULES**TECHNICAL FIELD**

This invention relates to nucleic acid and amino acid sequences of lipid-associated molecules and to the use of these sequences in the diagnosis, treatment, and prevention of cancers, neurological, autoimmune/inflammatory, gastrointestinal, and cardiovascular disorders, and disorders of lipid metabolism, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of lipid-associated molecules.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Lipids are water-insoluble, oily or greasy substances that are soluble in nonpolar solvents such as chloroform or ether. Neutral fats (triacylglycerols) serve as major fuels and energy stores. Fatty acids are long-chain organic acids with a single carboxyl group and a long non-polar hydrocarbon tail. Long-chain fatty acids are essential components of glycolipids, phospholipids, and cholesterol, which are building blocks for biological membranes, and of triglycerides, which are biological fuel molecules. Lipids, such as phospholipids, sphingolipids, glycolipids, and cholesterol, are key structural components of cell membranes. Lipids and proteins are associated in a variety of ways. Glycolipids form vesicles that carry proteins within cells and cell membranes. Interactions between lipids and proteins function in targeting proteins and glycolipids involved in a variety of processes, such as cell signaling and cell proliferation, to specific membrane and intracellular locations. Various proteins are associated with the biosynthesis, transport, and uptake of lipids. In addition, key proteins involved in signal transduction and protein targeting have lipid-derived groups added to them post-translationally (Stryer, L. (1995) Biochemistry, W.H. Freeman and Co., New York NY, pp. 264-267, 934; Lehninger, A. (1982) Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc. New York NY; and ExPASy "Biochemical Pathways" index of Boehringer Mannheim World Wide Web site, "<http://www.expasy.ch/cgi-bin/search-biochem-index>".)

Phospholipids

A major class of phospholipids are the phosphoglycerides, which are composed of a glycerol backbone, two fatty acid chains, and a phosphorylated alcohol. Phosphoglycerides are components of cell membranes. Principal phosphoglycerides are phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine, phosphatidyl inositol, and diphosphatidyl glycerol. Many enzymes involved in phosphoglyceride synthesis are associated with membranes (Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, VCH Publishers Inc., New York NY, pp. 494-501). Phosphatidate is converted to

WO 02/063005

PCT/US02/03813

CDP-diacylglycerol by the enzyme phosphatidate cytidyltransferase (ExPASy ENZYME EC 2.7.7.41). Transfer of the diacylglycerol group from CDP-diacylglycerol to serine to yield phosphatidyl serine, or to inositol to yield phosphatidyl inositol, is catalyzed by the enzymes CDP-diacylglycerol-serine O-phosphatidyltransferase and CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase, respectively (ExPASy ENZYME EC 2.7.8.8; ExPASy ENZYME EC 2.7.8.11). The enzyme phosphatidyl serine decarboxylase catalyzes the conversion of phosphatidyl serine to phosphatidyl ethanolamine, using a pyruvate cofactor (Voelker, D.R. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1348:236-244). Phosphatidyl choline is formed using diet-derived choline by the reaction of CDP-choline with 1,2-diacylglycerol, catalyzed by diacylglycerol cholinephosphotransferase (ExPASy ENZYME 2.7.8.2).

Other phosphoglycerides have been shown to be involved in the vesicle trafficking process. Phosphatidylinositol transfer protein (PITP) is a ubiquitous cytosolic protein, thought to be involved in transport of phospholipids from their site of synthesis in the endoplasmic reticulum and Golgi to other cell membranes. More recently, PITP has been shown to be an essential component of the polyphosphoinositide synthesis machinery and is hence required for proper signaling by epidermal growth factor and f-Met-Leu-Phe, as well as for exocytosis. The role of PITP in polyphosphoinositide synthesis may also explain its involvement in intracellular vesicular traffic (Liscovitch, M. et al. (1995) *Cell* 81:659-662).

The copines are phospholipid-binding proteins believed to function in membrane trafficking. Copines promote lipid vesicle aggregation. They contain a C2 domain associated with membrane activity and an annexin-type domain that mediates interactions between integral and extracellular proteins and is associated with calcium binding and regulation (Creutz, C.E. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:1393-1402). Other C2-containing proteins include the synaptotagmins, a family of proteins involved in vesicular trafficking. Synaptotagmin concentrations in cerebrospinal fluid have been found to be reduced in early-onset Alzheimer's disease (Gottfries, C.G. et al. (1998) *J. Neural Transm.* 105:773-786).

The phosphatidylinositol-transfer protein Sec14, which catalyses exchange of phosphatidylinositol and phosphatidylcholine between membrane bilayers *in vitro*, is essential for vesicle budding from the Golgi complex. Sec14 includes a carboxy-terminal domain that forms a hydrophobic pocket which represents the phospholipid-binding domain (Sha, B. et al. (1998) *Nature* 391:506-510). Sec14 is a member of the cellular retinaldehyde-binding protein (CRAL)/Triple function domain (TRIO) family (InterPro Entry IPR001251, <http://www.ebi.ac.uk/interpro>).

Sphingolipids

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Sphingolipids are an important class of membrane lipids that contain sphingosine, a long chain amino alcohol. They are composed of one long-chain fatty acid, one polar head alcohol, and sphingosine or sphingosine derivatives. The three classes of sphingolipids are sphingomyelins, cerebroside, and gangliosides. Sphingomyelins, which contain phosphocholine or phosphoethanolamine as their head group, are abundant in the myelin sheath surrounding nerve cells. Galactocerebroside, which contains a glucose or galactose head group, are characteristic of the brain. Other cerebroside are found in non-neural tissues. Gangliosides, whose head groups contain multiple sugar units, are abundant in the brain, but are also found in non-neural tissues.

Glycolipids

Glycolipids are also important components of the plasma membranes of animal cells. The most simple glycolipid is cerebroside which comprises only a single glucose or galactose sugar residue in addition to the lipid component. Gangliosides are glycosphingolipid plasma membrane components that are abundant in the nervous systems of vertebrates. Gangliosides are the most complex glycolipids and comprise ceramide (acylated sphingosine) attached to an oligosaccharide moiety containing at least one acidic sugar residue (sialic acid), namely *N*-acetylneuraminic acid or *N*-glycolylneuraminic acid. The sugar residues are added sequentially to ceramide via UDP-glucose, UDP-galactose, *N*-acetylgalactosamine, and CMP-*N*-acetylneuraminic acid donors. Over 15 gangliosides have been identified with G_{M1} and G_{M2} being the best characterized (Stryer, L. (1988) *Biochemistry*, W.H. Freeman and Co., Inc., New York, pp. 552-554).

Gangliosides are thought to play important roles in cell surface interactions, cell differentiation, neurogenesis, the triggering and modulation of transmembrane signaling, mediatorsynaptic function, neural repair, neurite outgrowth, and neuronal death (Hasegawa, T. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:8007-8015). While the presence of gangliosides in the plasma membrane is important for orchestrating these events, the subsequent removal of carbohydrate groups (desialylation) by sialidases also appears to be important for regulating neuronal differentiation.

Specific soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptor (SNARE) proteins are required for different membrane transport steps. The SNARE protein Vti1a has been colocalized with Golgi markers while Vti1b has been colocalized with Golgi and the trans-Golgi network of endosomal markers in fibroblast cell lines. A brain-specific splice variant of Vti1a is enriched in small synaptic vesicles and clathrin-coated vesicles isolated from nerve terminals. Vti1a-beta and synaptobrevin are integral parts of synaptic vesicles throughout their life cycle. Vti1a-beta functions in a SNARE complex during recycling or biogenesis of synaptic vesicles (Antonin, W. et al. (2000) *J. Neurosci.* 20:5724-5732).

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Sialidases catalyze the first step in glycosphingolipid degradation, removing carbohydrate moieties from gangliosides. These enzymes are present in the cytosol, lysosomal matrix, lysosomal membrane, and plasma membrane (Hasegawa, T. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:8007-8015).

Hallmark features of sialidases include a transmembrane domain, an Arg-Ile-Pro domain, and three Asp-box sequences (Wada, T. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261:21-27).

During normal neuronal development, pyramidal neurons of the cerebral cortex participate in a single burst of dendritic sprouting immediately following nerve cell migration to the cortical mantle. Cells undergoing dendritogenesis are characterized by increased expression of G_{M2} ganglioside which decreases following dendritic maturation. Evidence suggests that no new primary dendrites are initiated following the initial burst.

Cholesterol

Cholesterol, composed of four fused hydrocarbon rings with an alcohol at one end, moderates the fluidity of membranes in which it is incorporated. In addition, cholesterol is used in the synthesis of steroid hormones such as cortisol, progesterone, estrogen, and testosterone. Bile salts derived from cholesterol facilitate the digestion of lipids. Cholesterol in the skin forms a barrier that prevents excess water evaporation from the body. Farnesyl and geranylgeranyl groups, which are derived from cholesterol biosynthesis intermediates, are post-translationally added to signal transduction proteins such as Ras and protein-targeting proteins such as Rab. These modifications are important for the activities of these proteins (Guyton, A.C. (1991) Textbook of Medical Physiology, W.B. Saunders Company, Philadelphia PA, pp. 760-763; Stryer, *supra*, pp. 279-280, 691-702, 934).

Mammals obtain cholesterol derived from both de novo biosynthesis and the diet. The liver is the major site of cholesterol biosynthesis in mammals. Biosynthesis is accomplished via a series of enzymatic steps known as the mevalonate pathway. The rate-limiting step is the conversion of hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) to mevalonate by HMG-CoA reductase. The drug lovastatin, a potent inhibitor of HMG-CoA reductase, is given to patients to reduce their serum cholesterol levels. Cholesterol derived from de novo biosynthesis or from the diet is transported in the body fluids in the form of lipoprotein particles. These particles also transport triacylglycerols. The particles consist of a core of hydrophobic lipids surrounded by a shell of polar lipids and apolipoproteins. The protein components serve in the solubilization of hydrophobic lipids and also contain cell-targeting signals. Lipoproteins include chylomicrons, chylomicron remnants, very-low-density lipoproteins (VLDL), intermediate-density lipoproteins (IDL), low-density lipoproteins (LDL), and high-density lipoproteins (HDL) (Meyers, *supra*; Stryer, *supra*, pp. 691-702). There is a strong inverse correlation between the levels of plasma HDL and risk of premature coronary heart disease.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

ApoL is an HDL apolipoprotein expressed in the pancreas (Duchateau, P.N. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:25576-25582).

Most cells outside the liver and intestine take up cholesterol from the blood rather than synthesize it themselves. Cell surface LDL receptors bind LDL particles which are then internalized
5 by endocytosis (Meyers, supra). Absence of the LDL receptor, the cause of the disease familial hypercholesterolemia, leads to increased plasma cholesterol levels and ultimately to atherosclerosis (Stryer, supra, pp. 691-702).

Proteins involved in cholesterol uptake and biosynthesis are tightly regulated in response to cellular cholesterol levels. The sterol regulatory element binding protein (SREBP) is a sterol-
10 responsive transcription factor. Under normal cholesterol conditions, SREBP resides in the endoplasmic reticulum membrane. When cholesterol levels are low, a regulated cleavage of SREBP occurs which releases the extracellular domain of the protein. This cleaved domain is then transported to the nucleus where it activates the transcription of the LDL receptor gene, and genes encoding
15 enzymes of cholesterol synthesis, by binding the sterol regulatory element (SRE) upstream of the genes (Yang, J. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:12152-12161). Regulation of cholesterol uptake and biosynthesis also occurs via the oxysterol-binding protein (OSBP). Oxysterols are oxidation products formed during the catabolism of cholesterol, and are involved in regulation of steroid biosynthesis. OSBP is a high-affinity intracellular receptor for a variety of oxysterols that down-regulate cholesterol
20 synthesis and stimulate cholesterol esterification (Lagace, T.A. et al. (1997) *Biochem. J.* 326:205-213).

Supernatant protein factor (SPF), which stimulates squalene epoxidation and conversion of squalene to lanosterol, is a cytosolic squalene transfer protein that enhances cholesterol biosynthesis. Squalene epoxidase, a membrane-associated enzyme that converts squalene to squalene 2,3-oxide, plays an important role in the maintenance of cholesterol homeostasis. SPF belongs to a family of
25 cytosolic lipid-binding/transfer proteins such as alpha-tocopherol transfer protein, cellular retinal binding protein, yeast phosphatidylinositol transfer protein (Sec14p), and squid retinal binding protein (Shibata, N. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:2244-2249).

Lipid Metabolism Enzymes

Long-chain fatty acids are also substrates for eicosanoid production, and are important in the
30 functional modification of certain complex carbohydrates and proteins. 16-carbon and 18-carbon fatty acids are the most common. Fatty acid synthesis occurs in the cytoplasm. In the first step, acetyl-Coenzyme A (CoA) carboxylase (ACC) synthesizes malonyl-CoA from acetyl-CoA and bicarbonate. The enzymes which catalyze the remaining reactions are covalently linked into a single polypeptide

WO 02/063005

PCT/US02/03813

chain, referred to as the multifunctional enzyme fatty acid synthase (FAS). FAS catalyzes the synthesis of palmitate from acetyl-CoA and malonyl-CoA. FAS contains acetyl transferase, malonyl transferase, β -ketoacetyl synthase, acyl carrier protein, β -ketoacyl reductase, dehydratase, enoyl reductase, and thioesterase activities. The final product of the FAS reaction is the 16-carbon fatty acid palmitate. Further elongation, as well as unsaturation, of palmitate by accessory enzymes of the ER produces the variety of long chain fatty acids required by the individual cell. These enzymes include a NADH-cytochrome b₅ reductase, cytochrome b₅, and a desaturase.

Within cells, fatty acids are transported by cytoplasmic fatty acid binding proteins (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) *134650 Fatty Acid-Binding Protein 1, Liver; FABP1).

10 Diazepam binding inhibitor (DBI), also known as endozepine and acyl CoA-binding protein, is an endogenous γ -aminobutyric acid (GABA) receptor ligand which is thought to down-regulate the effects of GABA. DBI binds medium- and long-chain acyl-CoA esters with very high affinity and may function as an intracellular carrier of acyl-CoA esters (OMIM *125950 Diazepam Binding Inhibitor; DBI; PROSITE PDOC00686 Acyl-CoA-binding protein signature).

15 Fat stored in liver and adipose triglycerides may be released by hydrolysis and transported in the blood. Free fatty acids are transported in the blood by albumin. Triacylglycerols, also known as triglycerides and neutral fats, are major energy stores in animals. Triacylglycerols are esters of glycerol with three fatty acid chains. Glycerol-3-phosphate is produced from dihydroxyacetone phosphate by the enzyme glycerol phosphate dehydrogenase or from glycerol by glycerol kinase. 20 Fatty acid-CoAs are produced from fatty acids by fatty acyl-CoA synthetases. Glycerol-3-phosphate is acylated with two fatty acyl-CoAs by the enzyme glycerol phosphate acyltransferase to give phosphatidate. Phosphatidate phosphatase converts phosphatidate to diacylglycerol, which is subsequently acylated to a triacylglycerol by the enzyme diglyceride acyltransferase. Phosphatidate phosphatase and diglyceride acyltransferase form a triacylglycerol synthetase complex bound to the ER 25 membrane.

Mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation enzymes degrade saturated and unsaturated fatty acids by sequential removal of two-carbon units from CoA-activated fatty acids. The main beta-oxidation pathway degrades both saturated and unsaturated fatty acids while the auxiliary pathway performs additional steps required for the degradation of unsaturated fatty acids. The pathways of 30 mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation use similar enzymes, but have different substrate specificities and functions. Mitochondria oxidize short-, medium-, and long-chain fatty acids to produce energy for cells. Mitochondrial beta-oxidation is a major energy source for cardiac and skeletal muscle. In liver, it provides ketone bodies to the peripheral circulation when glucose levels are

WO 02/063005

PCT/US02/03813

low as in starvation, endurance exercise, and diabetes (Eaton, S. et al. (1996) *Biochem. J.* 320:345-357). Peroxisomes oxidize medium-, long-, and very-long-chain fatty acids, dicarboxylic fatty acids, branched fatty acids, prostaglandins, xenobiotics, and bile acid intermediates. The chief roles of peroxisomal beta-oxidation are to shorten toxic lipophilic carboxylic acids to facilitate their excretion and to shorten very-long-chain fatty acids prior to mitochondrial beta-oxidation (Mannaerts, G.P. and P.P. Van Veldhoven (1993) *Biochimie* 75:147-158). Enzymes involved in beta-oxidation include acyl CoA synthetase, carnitine acyltransferase, acyl CoA dehydrogenases, enoyl CoA hydratases, L-3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase, β -ketothiolase, 2,4-dienoyl CoA reductase, and isomerase.

Three classes of lipid metabolism enzymes are discussed in further detail. The three classes are lipases, phospholipases and lipoxigenases.

Lipases

Triglycerides are hydrolyzed to fatty acids and glycerol by lipases. Adipocytes contain lipases that break down stored triacylglycerols, releasing fatty acids for export to other tissues where they are required as fuel. Lipases are widely distributed in animals, plants, and prokaryotes. Triglyceride lipases (ExPASy ENZYME EC 3.1.1.3), also known as triacylglycerol lipases and tributyrases, hydrolyze the ester bond of triglycerides. In higher vertebrates there are at least three tissue-specific isozymes including gastric, hepatic, and pancreatic lipases. These three types of lipases are structurally closely related to each other as well as to lipoprotein lipase. The most conserved region in gastric, hepatic, and pancreatic lipases is centered around a serine residue which is also present in lipases of prokaryotic origin. Mutation in the serine residue renders the enzymes inactive. Gastric, hepatic, and pancreatic lipases hydrolyze lipoprotein triglycerides and phospholipids. Gastric lipases in the intestine aid in the digestion and absorption of dietary fats. Hepatic lipases are bound to and act at the endothelial surfaces of hepatic tissues. Hepatic lipases also play a major role in the regulation of plasma lipids. Pancreatic lipase requires a small protein cofactor, colipase, for efficient dietary lipid hydrolysis. Colipase binds to the C-terminal, non-catalytic domain of lipase, thereby stabilizing an active conformation and considerably increasing the overall hydrophobic binding site. Deficiencies of these enzymes have been identified in man, and all are associated with pathologic levels of circulating lipoprotein particles (Gargouri, Y. et al. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1006:255-271; Connelly, P.W. (1999) *Clin. Chim. Acta* 286:243-255; van Tilbeurgh, H. et al. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1441:173-184).

Lipoprotein lipases (ExPASy ENZYME EC 3.1.1.34), also known as clearing factor lipases, diglyceride lipases, or diacylglycerol lipases, hydrolyze triglycerides and phospholipids present in circulating plasma lipoproteins, including chylomicrons, very low and intermediate density lipoproteins

WO 02/063005

PCT/US02/03813

and high-density lipoproteins (HDL). Together with pancreatic and hepatic lipases, lipoprotein lipases (LPL) share a high degree of primary sequence homology. Both lipoprotein lipases and hepatic lipases are anchored to the capillary endothelium via glycosaminoglycans and can be released by intravenous administration of heparin. LPLs are primarily synthesized by adipocytes, muscle cells, and

5 macrophages. Catalytic activities of LPLs are activated by apolipoprotein C-II and are inhibited by high ionic strength conditions such as 1 M NaCl. LPL deficiencies in humans contribute to metabolic diseases such as hypertriglyceridemia, HDL2 deficiency, and obesity (Jackson, R.L. (1983) in The Enzymes (Boyer, P.D., ed.) Vol. XVI, pp. 141-186, Academic Press, New York NY; Eckel, R.H. (1989) New Engl. J. Med. 320:1060-1068).

10 Phospholipases

Phospholipases, a group of enzymes that catalyze the hydrolysis of membrane phospholipids, are classified according to the bond cleaved in a phospholipid. They are classified into PLA1, PLA2, PLB, PLC, and PLD families. Phospholipases are involved in many inflammatory reactions by making arachidonate available for eicosanoid biosynthesis. More specifically, arachidonic acid is

15 processed into bioactive lipid mediators of inflammation such as lyso-platelet-activating factor and eicosanoids. The synthesis of arachidonic acid from membrane phospholipids is the rate-limiting step in the biosynthesis of the four major classes of eicosanoids (prostaglandins, prostacyclins, thromboxanes and leukotrienes), which are 20-carbon molecules derived from fatty acids. Eicosanoids are signaling molecules which have roles in pain, fever, and inflammation. The precursor

20 of all eicosanoids is arachidonate, which is generated from phospholipids by phospholipase A₂ and from diacylglycerols by diacylglycerol lipase. Leukotrienes are produced from arachidonate by the action of lipoxygenases (Kaiser, E. et al. (1990) Clin. Biochem. 23:349-370). Furthermore, leukotriene-B₄ is known to function in a feedback loop which further increases PLA2 activity (Wijkander, J. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:26543-26549).

25 The secretory phospholipase A₂ (PLA2) superfamily comprises a number of heterogeneous enzymes whose common feature is to hydrolyze the sn-2 fatty acid acyl ester bond of phosphoglycerides. Hydrolysis of the glycerophospholipids releases free fatty acids and lysophospholipids. PLA2 activity generates precursors for the biosynthesis of biologically active lipids, hydroxy fatty acids, and platelet-activating factor. PLA2s were first described as components of

30 snake venoms, and were later characterized in numerous species. PLA2s have traditionally been classified into several major groups and subgroups based on their amino acid sequences, divalent cation requirements, and location of disulfide bonds. The PLA2s of Groups I, II, and III consist of low molecular weight, secreted, Ca²⁺-dependent proteins. Group IV PLA2s are primarily 85-kDa,

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Ca²⁺-dependent cytosolic phospholipases. Finally, a number of Ca²⁺-independent PLA2s have been described, which comprise Group V (Davidson, F.F. and E.A. Dennis (1990) *J. Mol. Evol.* 31:228-238; and Dennis, E.F. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:13057-13060).

The first PLA2s to be extensively characterized were the Group I, II, and III PLA2s found in snake and bee venoms. These venom PLA2s share many features with mammalian PLA2s including a common catalytic mechanism, the same Ca²⁺ requirement, and conserved primary and tertiary structures. In addition to their role in the digestion of prey, the venom PLA2s display neurotoxic, myotoxic, anticoagulant, and proinflammatory effects in mammalian tissues. This diversity of pathophysiological effects is due to the presence of specific, high affinity receptors for these enzymes on various cells and tissues (Lambeau, G. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:5534-5540).

PLA2s from Groups I, IIA, IIC, and V have been described in mammalian and avian cells, and were originally characterized by tissue distribution, although the distinction is no longer absolute. Thus, Group I PLA2s were found in the pancreas, Group IIA and IIC were derived from inflammation-associated tissues (e.g., the synovium), and Group V were from cardiac tissue. The pancreatic PLA2s function in the digestion of dietary lipids and have been proposed to play a role in cell proliferation, smooth muscle contraction, and acute lung injury. The Group II inflammatory PLA2s are potent mediators of inflammatory processes and are highly expressed in serum and synovial fluids of patients with inflammatory disorders. These Group II PLA2s are found in most human cell types assayed and are expressed in diverse pathological processes such as septic shock, intestinal cancers, rheumatoid arthritis, and epidermal hyperplasia. A Group V PLA2 has been cloned from brain tissue and is strongly expressed in heart tissue. A human PLA2 was recently cloned from fetal lung, and based on its structural properties, appears to be the first member of a new group of mammalian PLA2s, referred to as Group X. Other PLA2s have been cloned from various human tissues and cell lines, suggesting a large diversity of PLA2s (Chen, J. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:2365-2368; Kennedy, B.P. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 22378-22385; Komada, M. et al. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168:1059-1065; Cupillard, L. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:15745-15752; and Nalefski, E.A. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:18239-18249).

Phospholipases B (PLB) (ExpASY ENZYME EC 3.1.1.5), also known as lysophospholipase, lecithinase B, or lysolecithinase are widely distributed enzymes that metabolize intracellular lipids, and occur in numerous isoforms. Small isoforms, approximately 15-30 kD, function as hydrolases; large isoforms, those exceeding 60 kD, function both as hydrolases and transacylases. A particular substrate for PLBs, lysophosphatidylcholine, causes lysis of cell membranes when it is formed or imported into a cell. PLBs are regulated by lipid factors including acylcarnitine, arachidonic acid, and

WO 02/063005

PCT/US02/03813

phosphatidic acid. These lipid factors are signaling molecules important in numerous pathways, including the inflammatory response (Anderson, R. et al. (1994) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 125:176-183; Selle, H. et al. (1993); *Eur. J. Biochem.* 212:411-416).

Phospholipase C (PLC) (ExPASy ENZYME EC 3.1.4.10) plays an important role in
5 transmembrane signal transduction. Many extracellular signaling molecules including hormones, growth factors, neurotransmitters, and immunoglobulins bind to their respective cell surface receptors and activate PLCs. The role of an activated PLC is to catalyze the hydrolysis of
10 phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphate (PIP₂), a minor component of the plasma membrane, to produce diacylglycerol and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃). In their respective biochemical pathways, IP₃ and diacylglycerol serve as second messengers and trigger a series of intracellular responses. IP₃ induces the release of Ca²⁺ from internal cellular storage, and diacylglycerol activates protein kinase C (PKC). Both pathways are part of transmembrane signal transduction mechanisms which regulate cellular processes which include secretion, neural activity, metabolism, and proliferation.

Several distinct isoforms of PLC have been identified and are categorized as PLC-beta,
15 PLC-gamma, and PLC-delta. Subtypes are designated by adding Arabic numbers after the Greek letters, eg. PLC-β-1. PLCs have a molecular mass of 62-68 kDa, and their amino acid sequences show two regions of significant similarity. The first region, designated X, has about 170 amino acids, and the second, or Y region, contains about 260 amino acids.

The catalytic activities of the three isoforms of PLC are dependent upon Ca²⁺. It has been
20 suggested that the binding sites for Ca²⁺ in the PLCs are located in the Y-region, one of two conserved regions. The hydrolysis of common inositol-containing phospholipids, such as phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol 4-monophosphate (PIP), and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), by any of the isoforms yields cyclic and noncyclic inositol phosphates (Rhee, S.G. and Y.S. Bae (1997) *J. Biol. Chem.* 272:15045-15048).

25 All mammalian PLCs contain a pleckstrin homology (PH) domain which is about 100 amino acids in length and is composed of two antiparallel beta sheets flanked by an amphipathic alpha helix. PH domains target PLCs to the membrane surface by interacting with either the beta/gamma subunits of G proteins or PIP₂ (PROSITE PDOC50003).

Phospholipase D (PLD) (ExPASy ENZYME EC 3.1.4.4), also known as lecithinase D,
30 lipophosphodiesterase II, and choline phosphatase catalyzes the hydrolysis of phosphatidylcholine and other phospholipids to generate phosphatidic acid. PLD plays an important role in membrane vesicle trafficking, cytoskeletal dynamics, and transmembrane signal transduction. In addition, the activation of PLD is involved in cell differentiation and growth (reviewed in Lisacovitch, M. (2000) *Biochem. J.*

WO 02/063005

PCT/US02/03813

345:401-415).

PLD is activated in mammalian cells in response to diverse stimuli that include hormones, neurotransmitters, growth factors, cytokines, activators of protein kinase C, and agonist binding to G-protein-coupled receptors. At least two forms of mammalian PLD, PLD1 and PLD2, have been identified. PLD1 is activated by protein kinase C alpha and by the small GTPases ARF and RhoA. (Houle, M.G. and S. Bourgoin (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1439:135-149). PLD2 can be selectively activated by unsaturated fatty acids such as oleate (Kim, J.H. (1999) *FEBS Lett.* 454:42-46).

Lipoxygenases

Lipoxygenases (ExPASy ENZYME EC 1.13.11.12) are non-heme iron-containing enzymes that catalyze the dioxygenation of certain polyunsaturated fatty acids such as lipoproteins. Lipoxygenases are found widely in plants, fungi, and animals. Several different lipoxygenase enzymes are known, each having a characteristic oxidation action. In animals, there are specific lipoxygenases that catalyze the dioxygenation of arachidonic acid at the carbon-3, 5, 8, 11, 12, and 15 positions. These enzymes are named after the position of arachidonic acid that they dioxygenate. Lipoxygenases have a single polypeptide chain with a molecular mass of ~75-80 kDa in animals. The proteins have an N-terminal-barrel domain and a larger catalytic domain containing a single atom of non-heme iron. Oxidation of the ferric enzyme to an active form is required for catalysis (Yamamoto, S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1128:117-131; Brash, A.R. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:23679-23682). A variety of lipoxygenase inhibitors exist and are classified into five major categories according to their mechanism of inhibition. These include antioxidants, iron chelators, substrate analogues, lipoxygenase-activating protein inhibitors, and, finally, epidermal growth factor-receptor inhibitors.

3-Lipoxygenase, also known as e-LOX-3 or Aloxe3 has recently been cloned from murine epidermis. Aloxe3 resides on mouse chromosome 11, and the deduced amino acid sequence for Aloxe3 is 54% identical to the 12-lipoxygenase sequences (Kinzig, A. (1999) *Genomics* 58:158-164).

5-Lipoxygenase (5-LOX, ExPASy ENZYME EC 1.13.11.34), also known as arachidonate:oxygen 5-oxidoreductase, is found primarily in white blood cells, macrophages, and mast cells. 5-LOX converts arachidonic acid first to 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE) and then to leukotriene (LTA4 (5,6-oxido-7,9,11,14-eicosatetraenoic acid)). Subsequent conversion of leukotriene A4 by leukotriene A4 hydrolase yields the potent neutrophil chemoattractant leukotriene B4. Alternatively, conjugation of LTA4 with glutathione by leukotriene C4 synthase plus downstream metabolism leads to the cysteinyl leukotrienes that influence airway reactivity and mucus secretion,

WO 02/063005

PCT/US02/03813

especially in asthmatics. Most lipoxygenases require no other cofactors or proteins for activity. In contrast, the mammalian 5-LOX requires calcium and ATP, and is activated in the presence of a 5-LOX activating protein (FLAP). FLAP itself binds to arachidonic acid and supplies 5-LOX with substrate (Lewis, R.A. et al. (1990) *New Engl. J. Med.* 323:645-655). The expression levels of 5-LOX and FLAP are found to be increased in the lungs of patients with plexogenic (primary) pulmonary hypertension (Wright, L. et al. (1998) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:219-229).

12-Lipoxygenase (12-LOX, ExpASY ENZYME: EC 1.13.11.31) oxygenates arachidonic acid to form 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (12-HPETE). Mammalian 12-lipoxygenases are named after the prototypical tissues of their occurrence (hence, the leukocyte, platelet, or epidermal types).

10 Platelet-type 12-LOX has been found to be the predominant isoform in epidermal skin specimens and epidermoid cells. Leukocyte 12-LOX was first characterized extensively from porcine leukocytes and was found to have a rather broad distribution in mammalian tissues by immunochemical assays. Besides tissue distribution, the leukocyte 12-LOX is distinguished from the platelet-type enzyme by its ability to form 15-HPETE, in addition to 12-HPETE, from arachidonic acid substrate. Leukocyte 12-LOX is highly related to 15-lipoxygenase (15-LOX) in that both are dual specificity lipoxygenases, and they are about 85% identical in primary structure in higher mammals. Leukocyte 12-LOX is found in tracheal epithelium, leukocytes, and macrophages (Conrad, D.J. (1999) *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 17:71-89).

15-Lipoxygenase (15-LOX; ExpASY ENZYME: EC 1.13.11.33) is found in human reticulocytes, airway epithelium, and eosinophils. 15-LOX has been detected in atherosclerotic lesions in mammals, specifically rabbit and man. The enzyme, in addition to its role in oxidative modification of lipoproteins, is important in the inflammatory reaction in atherosclerotic lesions. 15-LOX has been shown to be induced in human monocytes by the cytokine IL-4, which is known to be implicated in the inflammatory process (Kuhn, H. and S. Borngraber (1999) *Adv. Exp. Med. Biol.* 447:5-28).

25 A variety of lipolytic enzymes with a GDSL-like motif as part of the active site have been identified. Members of this family include a lipase/acylhydrolase, thermolabile hemolysin and rabbit phospholipase (AdRab-B)(Interpro entry IPR001087, <http://www.sanger.ac.uk>). A homolog of AdRab-B is guinea pig intestinal phospholipase B, a calcium-independent phospholipase that contributes to lipid digestion as an ectoenzyme by sequentially hydrolyzing the acyl ester bonds of glycerophospholipids. Phospholipase B also has a role in male reproduction (Delagebeaudeuf, C. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:13407-13414).

Lipid-Associated Molecules and Disease

Lipids and their associated proteins have roles in human diseases and disorders. Increased

WO 02/063005

PCT/US02/03813

synthesis of long-chain fatty acids occurs in neoplasms including those of the breast, prostate, ovary, colon and endometrium.

In the arterial disease atherosclerosis, fatty lesions form on the inside of the arterial wall.

These lesions promote the loss of arterial flexibility and the formation of blood clots (Guyton, *supra*).

- 5 There is a strong inverse correlation between the levels of plasma HDL and risk of premature coronary heart disease. Absence of the LDL receptor, the cause of familial hypercholesterolemia, leads to increased plasma cholesterol levels and ultimately to atherosclerosis (Stryer, *supra*, pp. 691-702). Oxysterols are present in human atherosclerotic plaques and are believed to play an active role in plaque development (Brown, A.J. (1999) *Atherosclerosis* 142:1-28). Lipases, phospholipases, and
- 10 lipoxigenases are thought to contribute to complex diseases, such as atherosclerosis, obesity, arthritis, asthma, and cancer, as well as to single gene defects, such as Wolman's disease and Type I hyperlipoproteinemia.

Steatosis, or fatty liver, is characterized by the accumulation of triglycerides in the liver and may occur in association with a variety of conditions including alcoholism, diabetes, obesity, and

15 prolonged parenteral nutrition. Steatosis may lead to fibrosis and cirrhosis of the liver.

Niemann-Pick diseases types A and B are caused by accumulation of sphingomyelin (a sphingolipid) and other lipids in the central nervous system due to a defect in the enzyme sphingomyelinase, leading to neurodegeneration and lung disease. Niemann-Pick disease type C results from a defect in cholesterol transport, leading to the accumulation of sphingomyelin and

20 cholesterol in lysosomes and a secondary reduction in sphingomyelinase activity. Neurological symptoms such as grand mal seizures, ataxia, and loss of previously learned speech, manifest 1-2 years after birth. A mutation in the NPC protein, which contains a putative cholesterol-sensing domain, was found in a mouse model of Niemann-Pick disease type C (Fauci, *supra*, p. 2175; Loftus, S.K. et al. (1997) *Science* 277:232-235).

- 25 Tay-Sachs disease is an autosomal recessive, progressive neurodegenerative disorder caused by the accumulation of the G_{M2} ganglioside in the brain (Igdoura, S.A. et al. (1999) *Hum. Mol. Genet.* 8:1111-6) due to a deficiency of the enzyme hexosaminidase A. The disease is characterized by the onset of developmental retardation, followed by paralysis, dementia, blindness, and usually death within the second or third year of life. Confirmatory evidence of Tay-Sachs disease is obtained at autopsy
- 30 upon the identification of ballooned neurons in the central nervous system (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 272800, 8/4/2000, WWW URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>). In the case of Tay-Sachs disease, cortical pyramidal neurons undergo a second round of dendritogenesis (Walkley, S.U. et al. (1998)

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Ann. N.Y. Acad. Sci. 845:188-99).

Other diseases are also associated with defects in sialidase activity. G_{M1} gangliosidosis and Morquio B disease both arise from beta-galactosidase deficiency, although the diseases present with distinct phenotypes. Sialidosis arises from a neuraminidase deficiency but presents with symptoms
5 similar to gangliosidosis. A likely reason for the overlapping phenotypes of sialidase deficiencies is the presence of these enzymes in a complex in lysosomes (Callahan, J.W. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1455:85-103).

PLAs are implicated in a variety of disease processes. For example, PLAs are found in the pancreas, in cardiac tissue, and in inflammation-associated tissues. Pancreatic PLAs function in the
10 digestion of dietary lipids and have been proposed to play a role in cell proliferation, smooth muscle contraction, and acute lung injury. Inflammatory PLAs are potent mediators of inflammatory processes and are highly expressed in serum and synovial fluids of patients with inflammatory disorders. Additionally, inflammatory PLAs are found in most human cell types and are expressed in
15 diverse pathological processes such as septic shock, intestinal cancers, rheumatoid arthritis, and epidermal hyperplasia.

The role of PLBs in human tissues has been investigated in various research studies. Hydrolysis of lysophosphatidylcholine by PLBs causes lysis in erythrocyte membranes (Selle, *supra*). Similarly, Endresen, M.J. et al. (1993; *Scand. J. Clin. Invest.* 53:733-739) reported that the increased
20 hydrolysis of lysophosphatidylcholine by PLB in pre-eclamptic women causes release of free fatty acids into the sera. In renal studies, PLB was shown to protect Na^+, K^+ -ATPase from the cytotoxic and cytolytic effects of cyclosporin A (Anderson, *supra*).

Lipases, phospholipases, and lipoxygenases are thought to contribute to complex diseases, such as atherosclerosis, obesity, arthritis, asthma, and cancer, as well as to single gene defects, such as Wolman's disease and Type I hyperlipoproteinemia.

25 The discovery of new lipid-associated molecules, and the polynucleotides encoding them, satisfies a need in the art by providing new compositions which are useful in the diagnosis, prevention, and treatment of cancers, neurological, autoimmune/inflammatory, gastrointestinal, and cardiovascular disorders, and disorders of lipid metabolism, and in the assessment of the effects of exogenous
30 compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of lipid-associated molecules.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention features purified polypeptides, lipid-associated molecules, referred to collectively as "LIPAM" and individually as "LIPAM-1," "LIPAM-2," "LIPAM-3," "LIPAM-4," "LIPAM-5,"

WO 02/063005

PCT/US02/03813

“LIPAM-6,” “LIPAM-7,” “LIPAM-8,” and “LIPAM-9.” In one aspect, the invention provides an isolated polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected
5 from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. In one alternative, the invention provides an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1-9.

10 The invention further provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the
15 group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. In one alternative, the polynucleotide encodes a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. In another alternative, the polynucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18.

Additionally, the invention provides a recombinant polynucleotide comprising a promoter
20 sequence operably linked to a polynucleotide encoding a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group
25 consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. In one alternative, the invention provides a cell transformed with the recombinant polynucleotide. In another alternative, the invention provides a transgenic organism comprising the recombinant polynucleotide.

The invention also provides a method for producing a polypeptide selected from the group
30 consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group

WO 02/063005

PCT/US02/03813

consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The method comprises a) culturing a cell under conditions suitable for expression of the polypeptide, wherein said cell is transformed with a recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a polynucleotide
5 encoding the polypeptide, and b) recovering the polypeptide so expressed.

Additionally, the invention provides an isolated antibody which specifically binds to a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the
10 group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.

The invention further provides an isolated polynucleotide selected from the group consisting of
15 a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, c) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). In one alternative, the polynucleotide
20 comprises at least 60 contiguous nucleotides.

Additionally, the invention provides a method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide selected from the group consisting of a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least
25 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, c) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). The method comprises a) hybridizing the sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides comprising a sequence complementary to said target polynucleotide in the sample, and which probe specifically hybridizes to
30 said target polynucleotide, under conditions whereby a hybridization complex is formed between said probe and said target polynucleotide or fragments thereof, and b) detecting the presence or absence of said hybridization complex, and optionally, if present, the amount thereof. In one alternative, the probe comprises at least 60 contiguous nucleotides.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

The invention further provides a method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide selected from the group consisting of a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, c) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). The method comprises a) amplifying said target polynucleotide or fragment thereof using polymerase chain reaction amplification, and b) detecting the presence or absence of said amplified target polynucleotide or fragment thereof, and, optionally, if present, the amount thereof.

The invention further provides a composition comprising an effective amount of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and a pharmaceutically acceptable excipient. In one embodiment, the composition comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The invention additionally provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional LIPAM, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

The invention also provides a method for screening a compound for effectiveness as an agonist of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The method comprises a) exposing a sample comprising the polypeptide to a compound, and b) detecting agonist activity in the sample. In one alternative, the invention provides a composition comprising an agonist compound identified by the method and a pharmaceutically acceptable excipient. In another alternative, the invention provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional LIPAM, comprising

WO 02/063005

PCT/US02/03813

administering to a patient in need of such treatment the composition.

Additionally, the invention provides a method for screening a compound for effectiveness as an antagonist of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a polypeptide
5 comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and
10 d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The method comprises a) exposing a sample comprising the polypeptide to a compound, and b) detecting antagonist activity in the sample. In one alternative, the invention provides a composition comprising an antagonist compound identified by the method and a pharmaceutically acceptable excipient. In another alternative, the invention provides a method of treating a disease or condition associated with overexpression of functional LIPAM, comprising
15 administering to a patient in need of such treatment the composition.

The invention further provides a method of screening for a compound that specifically binds to a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected
20 from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The method comprises a) combining the polypeptide with at least one test compound under suitable conditions, and b) detecting binding of the polypeptide to the test compound, thereby identifying a compound that specifically binds to the polypeptide.

The invention further provides a method of screening for a compound that modulates the activity of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected
25 from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The method comprises a) combining the polypeptide with at least one test compound under conditions permissive for the activity of the polypeptide, b) assessing the activity
30

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

5 The invention further provides a method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a target polynucleotide, wherein said target polynucleotide comprises a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, the method comprising a) exposing a sample comprising the target polynucleotide to a compound, b) detecting altered expression of the target polynucleotide, and c) comparing the expression of the target
10 polynucleotide in the presence of varying amounts of the compound and in the absence of the compound.

The invention further provides a method for assessing toxicity of a test compound, said method comprising a) treating a biological sample containing nucleic acids with the test compound; b) hybridizing the nucleic acids of the treated biological sample with a probe comprising at least 20
15 contiguous nucleotides of a polynucleotide selected from the group consisting of i) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, ii) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, iii) a polynucleotide having a sequence complementary to i), iv) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of
20 ii), and v) an RNA equivalent of i)-iv). Hybridization occurs under conditions whereby a specific hybridization complex is formed between said probe and a target polynucleotide in the biological sample, said target polynucleotide selected from the group consisting of i) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, ii) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a
25 polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, iii) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of i), iv) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of ii), and v) an RNA equivalent of i)-iv). Alternatively, the target polynucleotide comprises a fragment of a polynucleotide sequence selected from the group consisting of i)-v) above; c) quantifying the amount of hybridization complex; and d) comparing the amount of hybridization complex in the treated
30 biological sample with the amount of hybridization complex in an untreated biological sample, wherein a difference in the amount of hybridization complex in the treated biological sample is indicative of toxicity of the test compound.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

BRIEF DESCRIPTION OF THE TABLES

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

Table 2 shows the GenBank identification number and annotation of the nearest GenBank homolog for polypeptides of the invention. The probability scores for the matches between each polypeptide and its homolog(s) are also shown.

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

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

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

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

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

DESCRIPTION OF THE INVENTION

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

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

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any machines, materials, and methods similar or equivalent to those described herein can be used to practice or test the present invention, the preferred machines, materials and methods are now

WO 02/063005

PCT/US02/03813

described. All publications mentioned herein are cited for the purpose of describing and disclosing the cell lines, protocols, reagents and vectors which are reported in the publications and which might be used in connection with the invention. Nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention.

5 **DEFINITIONS**

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

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

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

20 "Altered" nucleic acid sequences encoding LIPAM include those sequences with deletions, insertions, or substitutions of different nucleotides, resulting in a polypeptide the same as LIPAM or a polypeptide with at least one functional characteristic of LIPAM. Included within this definition are polymorphisms which may or may not be readily detectable using a particular oligonucleotide probe of the polynucleotide encoding LIPAM, and improper or unexpected hybridization to allelic variants, with
25 a locus other than the normal chromosomal locus for the polynucleotide sequence encoding LIPAM. The encoded protein may also be "altered," and may contain deletions, insertions, or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent LIPAM. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues, as long as the biological
30 or immunological activity of LIPAM is retained. For example, negatively charged amino acids may include aspartic acid and glutamic acid, and positively charged amino acids may include lysine and arginine. Amino acids with uncharged polar side chains having similar hydrophilicity values may include: asparagine and glutamine; and serine and threonine. Amino acids with uncharged side chains

WO 02/063005

PCT/US02/03813

having similar hydrophilicity values may include: leucine, isoleucine, and valine; glycine and alanine; and phenylalanine and tyrosine.

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

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

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

The term "antibody" refers to intact immunoglobulin molecules as well as to fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, and Fv fragments, which are capable of binding an epitopic determinant. Antibodies that bind LIPAM polypeptides can be prepared using intact polypeptides or using fragments containing small peptides of interest as the immunizing antigen. The polypeptide or
20 oligopeptide used to immunize an animal (e.g., a mouse, a rat, or a rabbit) can be derived from the translation of RNA, or synthesized chemically, and can be conjugated to a carrier protein if desired. Commonly used carriers that are chemically coupled to peptides include bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin (KLH). The coupled peptide is then used to immunize the animal.

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

The term "aptamer" refers to a nucleic acid or oligonucleotide molecule that binds to a specific molecular target. Aptamers are derived from an *in vitro* evolutionary process (e.g., SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment), described in U.S. Patent No.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

5,270,163), which selects for target-specific aptamer sequences from large combinatorial libraries. Aptamer compositions may be double-stranded or single-stranded, and may include deoxyribonucleotides, ribonucleotides, nucleotide derivatives, or other nucleotide-like molecules. The nucleotide components of an aptamer may have modified sugar groups (e.g., the 2'-OH group of a
5 ribonucleotide may be replaced by 2'-F or 2'-NH₂), which may improve a desired property, e.g., resistance to nucleases or longer lifetime in blood. Aptamers may be conjugated to other molecules, e.g., a high molecular weight carrier to slow clearance of the aptamer from the circulatory system. Aptamers may be specifically cross-linked to their cognate ligands, e.g., by photo-activation of a cross-linker. (See, e.g., Brody, E.N. and L. Gold (2000) *J. Biotechnol.* 74:5-13.)

10 The term "intramer" refers to an aptamer which is expressed *in vivo*. For example, a vaccinia virus-based RNA expression system has been used to express specific RNA aptamers at high levels in the cytoplasm of leukocytes (Blind, M. et al. (1999) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96:3606-3610).

The term "spiegelmer" refers to an aptamer which includes L-DNA, L-RNA, or other left-handed nucleotide derivatives or nucleotide-like molecules. Aptamers containing left-handed
15 nucleotides are resistant to degradation by naturally occurring enzymes, which normally act on substrates containing right-handed nucleotides.

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

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

"Complementary" describes the relationship between two single-stranded nucleic acid

WO 02/063005

PCT/US02/03813

sequences that anneal by base-pairing. For example, 5'-AGT-3' pairs with its complement, 3'-TCA-5'.

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

SDS), and other components (e.g., Denhardt's solution, dry milk, salmon sperm DNA, etc.).

"Consensus sequence" refers to a nucleic acid sequence which has been subjected to repeated DNA sequence analysis to resolve uncalled bases, extended using the XL-PCR kit (Applied Biosystems, Foster City CA) in the 5' and/or the 3' direction, and resequenced, or which has been assembled from one or more overlapping cDNA, EST, or genomic DNA fragments using a computer program for fragment assembly, such as the GELVIEW fragment assembly system (GCG, Madison WI) or Phrap (University of Washington, Seattle WA). Some sequences have been both extended and assembled to produce the consensus sequence.

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

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

5

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

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

The term "derivative" refers to a chemically modified polynucleotide or polypeptide.

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

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

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

"Exon shuffling" refers to the recombination of different coding regions (exons). Since an
 25 exon may represent a structural or functional domain of the encoded protein, new proteins may be assembled through the novel reassortment of stable substructures, thus allowing acceleration of the evolution of new protein functions.

A "fragment" is a unique portion of LIPAM or the polynucleotide encoding LIPAM which is identical in sequence to but shorter in length than the parent sequence. A fragment may comprise up
 30 to the entire length of the defined sequence, minus one nucleotide/amino acid residue. For example, a fragment may comprise from 5 to 1000 contiguous nucleotides or amino acid residues. A fragment used as a probe, primer, antigen, therapeutic molecule, or for other purposes, may be at least 5, 10, 15, 16, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 150, 250 or at least 500 contiguous nucleotides or amino acid residues in length. Fragments may be preferentially selected from certain regions of a molecule. For
 35 example, a polypeptide fragment may comprise a certain length of contiguous amino acids selected

WO 02/063005

PCT/US02/03813

from the first 250 or 500 amino acids (or first 25% or 50%) of a polypeptide as shown in a certain defined sequence. Clearly these lengths are exemplary, and any length that is supported by the specification, including the Sequence Listing, tables, and figures, may be encompassed by the present embodiments.

5 A fragment of SEQ ID NO:10-18 comprises a region of unique polynucleotide sequence that specifically identifies SEQ ID NO:10-18, for example, as distinct from any other sequence in the genome from which the fragment was obtained. A fragment of SEQ ID NO:10-18 is useful, for example, in hybridization and amplification technologies and in analogous methods that distinguish SEQ ID NO:10-18 from related polynucleotide sequences. The precise length of a fragment of SEQ ID
10 NO:10-18 and the region of SEQ ID NO:10-18 to which the fragment corresponds are routinely determinable by one of ordinary skill in the art based on the intended purpose for the fragment.

A fragment of SEQ ID NO:1-9 is encoded by a fragment of SEQ ID NO:10-18. A fragment of SEQ ID NO:1-9 comprises a region of unique amino acid sequence that specifically identifies SEQ ID NO:1-9. For example, a fragment of SEQ ID NO:1-9 is useful as an immunogenic peptide for the
15 development of antibodies that specifically recognize SEQ ID NO:1-9. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:1-9 and the region of SEQ ID NO:1-9 to which the fragment corresponds are routinely determinable by one of ordinary skill in the art based on the intended purpose for the fragment.

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

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

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

Percent identity between polynucleotide sequences may be determined using the default
30 parameters of the CLUSTAL V algorithm as incorporated into the MEGALIGN version 3.12e sequence alignment program. This program is part of the LASERGENE software package, a suite of molecular biological analysis programs (DNASTAR, Madison WI). CLUSTAL V is described in Higgins, D.G. and P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153 and in Higgins, D.G. et al. (1992) CABIOS

WO 02/063005

PCT/US02/03813

8:189-191. For pairwise alignments of polynucleotide sequences, the default parameters are set as follows: Ktuple=2, gap penalty=5, window=4, and "diagonals saved"=4. The "weighted" residue weight table is selected as the default. Percent identity is reported by CLUSTAL V as the "percent similarity" between aligned polynucleotide sequences.

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

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

20 *Penalty for mismatch: -2*

Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

25 *Filter: on*

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

Nucleic acid sequences that do not show a high degree of identity may nevertheless encode

WO 02/063005

PCT/US02/03813

similar amino acid sequences due to the degeneracy of the genetic code. It is understood that changes in a nucleic acid sequence can be made using this degeneracy to produce multiple nucleic acid sequences that all encode substantially the same protein.

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

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

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

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 and Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

25 *Word Size: 3*

Filter: on

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

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

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

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

High stringency conditions for hybridization between polynucleotides of the present invention include wash conditions of 68°C in the presence of about 0.2 x SSC and about 0.1% SDS, for 1 hour. Alternatively, temperatures of about 65°C, 60°C, 55°C, or 42°C may be used. SSC concentration may be varied from about 0.1 to 2 x SSC, with SDS being present at about 0.1%. Typically, blocking reagents are used to block non-specific hybridization. Such blocking reagents include, for instance, sheared and denatured salmon sperm DNA at about 100-200 µg/ml. Organic solvent, such as formamide at a concentration of about 35-50% v/v, may also be used under particular circumstances,

WO 02/063005

PCT/US02/03813

such as for RNA:DNA hybridizations. Useful variations on these wash conditions will be readily apparent to those of ordinary skill in the art. Hybridization, particularly under high stringency conditions, may be suggestive of evolutionary similarity between the nucleotides. Such similarity is strongly indicative of a similar role for the nucleotides and their encoded polypeptides.

5 The term "hybridization complex" refers to a complex formed between two nucleic acid sequences by virtue of the formation of hydrogen bonds between complementary bases. A hybridization complex may be formed in solution (e.g., C₀t or R₀t analysis) or formed between one nucleic acid sequence present in solution and another nucleic acid sequence immobilized on a solid support (e.g., paper, membranes, filters, chips, pins or glass slides, or any other appropriate substrate

10 to which cells or their nucleic acids have been fixed).

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

"Immune response" can refer to conditions associated with inflammation, trauma, immune disorders, or infectious or genetic disease, etc. These conditions can be characterized by expression

15 of various factors, e.g., cytokines, chemokines, and other signaling molecules, which may affect cellular and systemic defense systems.

An "immunogenic fragment" is a polypeptide or oligopeptide fragment of LIPAM which is capable of eliciting an immune response when introduced into a living organism, for example, a mammal. The term "immunogenic fragment" also includes any polypeptide or oligopeptide fragment

20 of LIPAM which is useful in any of the antibody production methods disclosed herein or known in the art.

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

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

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

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

"Operably linked" refers to the situation in which a first nucleic acid sequence is placed in a

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

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

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

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

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

Methods for preparing and using probes and primers are described in the references, for example Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold
30 Spring Harbor Press, Plainview NY; Ausubel, F.M. et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY; Innis, M. et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego CA. PCR primer pairs can be derived from a known sequence, for example, by using computer programs intended for that

WO 02/063005

PCT/US02/03813

purpose such as Primer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA).

Oligonucleotides for use as primers are selected using software known in the art for such purpose. For example, OLIGO 4.06 software is useful for the selection of PCR primer pairs of up to 5 100 nucleotides each, and for the analysis of oligonucleotides and larger polynucleotides of up to 5,000 nucleotides from an input polynucleotide sequence of up to 32 kilobases. Similar primer selection programs have incorporated additional features for expanded capabilities. For example, the PrimOU primer selection program (available to the public from the Genome Center at University of Texas South West Medical Center, Dallas TX) is capable of choosing specific primers from megabase 10 sequences and is thus useful for designing primers on a genome-wide scope. The Primer3 primer selection program (available to the public from the Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MA) allows the user to input a "mispriming library," in which sequences to avoid as primer binding sites are user-specified. Primer3 is useful, in particular, for the selection of oligonucleotides for microarrays. (The source code for the latter two primer selection programs may 15 also be obtained from their respective sources and modified to meet the user's specific needs.) The PrimeGen program (available to the public from the UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UK) designs primers based on multiple sequence alignments, thereby allowing selection of primers that hybridize to either the most conserved or least conserved regions of aligned nucleic acid sequences. Hence, this program is useful for identification of both unique and conserved 20 oligonucleotides and polynucleotide fragments. The oligonucleotides and polynucleotide fragments identified by any of the above selection methods are useful in hybridization technologies, for example, as PCR or sequencing primers, microarray elements, or specific probes to identify fully or partially complementary polynucleotides in a sample of nucleic acids. Methods of oligonucleotide selection are not limited to those described above.

25 A "recombinant nucleic acid" is a sequence that is not naturally occurring or has a sequence that is made by an artificial combination of two or more otherwise separated segments of sequence. This artificial combination is often accomplished by chemical synthesis or, more commonly, by the artificial manipulation of isolated segments of nucleic acids, e.g., by genetic engineering techniques such as those described in Sambrook, supra. The term recombinant includes nucleic acids that have 30 been altered solely by addition, substitution, or deletion of a portion of the nucleic acid. Frequently, a recombinant nucleic acid may include a nucleic acid sequence operably linked to a promoter sequence. Such a recombinant nucleic acid may be part of a vector that is used, for example, to transform a cell.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

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

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

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

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

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

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

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

"Substrate" refers to any suitable rigid or semi-rigid support including membranes, filters,

WO 02/063005

PCT/US02/03813

chips, slides, wafers, fibers, magnetic or nonmagnetic beads, gels, tubing, plates, polymers, microparticles and capillaries. The substrate can have a variety of surface forms, such as wells, trenches, pins, channels and pores, to which polynucleotides or polypeptides are bound.

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

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

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

A "variant" of a particular nucleic acid sequence is defined as a nucleic acid sequence having at least 40% sequence identity to the particular nucleic acid sequence over a certain length of one of the nucleic acid sequences using blastn with the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.9 (May-07-
30 1999) set at default parameters. Such a pair of nucleic acids may show, for example, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 91%, at least 92%, at least 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% or greater sequence identity over a certain defined length. A variant may be described as, for example, an

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

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

20 THE INVENTION

The invention is based on the discovery of new human lipid-associated molecules (LIPAM), the polynucleotides encoding LIPAM, and the use of these compositions for the diagnosis, treatment, or prevention of cancers, neurological, autoimmune/inflammatory, gastrointestinal, and cardiovascular disorders, and disorders of lipid metabolism.

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

Table 2 shows sequences with homology to the polypeptides of the invention as identified by BLAST analysis against the GenBank protein (genpept) database. Columns 1 and 2 show the

WO 02/063005

PCT/US02/03813

polypeptide sequence identification number (Polypeptide SEQ ID NO:) and the corresponding Incyte polypeptide sequence number (Incyte Polypeptide ID) for polypeptides of the invention. Column 3 shows the GenBank identification number (GenBank ID NO:) of the nearest GenBank homolog. Column 4 shows the probability scores for the matches between each polypeptide and its homolog(s).

5 Column 5 shows the annotation of the GenBank homolog(s) along with relevant citations where applicable, all of which are expressly incorporated by reference herein.

Table 3 shows various structural features of the polypeptides of the invention. Columns 1 and 2 show the polypeptide sequence identification number (SEQ ID NO:) and the corresponding Incyte polypeptide sequence number (Incyte Polypeptide ID) for each polypeptide of the invention. Column 10 3 shows the number of amino acid residues in each polypeptide. Column 4 shows potential phosphorylation sites, and column 5 shows potential glycosylation sites, as determined by the MOTIFS program of the GCG sequence analysis software package (Genetics Computer Group, Madison WI). Column 6 shows amino acid residues comprising signature sequences, domains, and motifs. Column 7 shows analytical methods for protein structure/function analysis and in some cases, searchable 15 databases to which the analytical methods were applied.

Together, Tables 2 and 3 summarize the properties of polypeptides of the invention, and these properties establish that the claimed polypeptides are lipid-associated molecules. For example, SEQ ID NO:1 is 43% identical, from residue M336 to residue R989, to human cytosolic phospholipase A2 beta (gPLA2beta) (GenBank ID g4886978) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool 20 (BLAST). (See Table 2.) The BLAST probability score is 1.6e-161, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. In an alternative example, SEQ ID NO:3 is 41% identical, from residue M1 to residue Y644, to rat phospholipase C delta-4 (GenBank ID g4894788) as determined by BLAST, with a probability score of 2.5e-126. (See Table 2.) SEQ ID NO:3 also contains phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X and Y domains and a C2 25 domain as determined by searching for statistically significant matches in the hidden Markov model (HMM)-based PFAM database of conserved protein family domains. (See Table 3.) Data from BLIMPS analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:3 is a phospholipase C. In an alternative example, SEQ ID NO:5 is 40% identical, from residue M1 to residue N316, to human phosphatidylserine-specific phospholipase A1 (GenBank ID g4090960) as determined by BLAST, with 30 a probability score of 3.1e-63. (See Table 2.) SEQ ID NO:5 also contains a lipase domain as determined by searching for statistically significant matches in the HMM-based PFAM database. (See Table 3.) Data from BLIMPS analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:5 is a lipase. In an alternative example, SEQ ID NO:6 is 45% identical from residue C41 to

WO 02/063005

PCT/US02/03813

residue I491, 39% identical from residue K582 to residue K899, 33% identical from residue S541 to residue G603, and 22% identical from residue S519 to residue L571, to Mus musculus phospholipase C-L2 (GenBank ID g6705987) as determined by BLAST, with probability scores of 1.1e-164 from residue C41 to residue I491, 1.1e-164 from residue K582 to residue K899, 1.0e-56 from residue S541 to residue G603, and 1.1e-55 from residue S519 to residue L571. (See Table 2.) SEQ ID NO:6 also contains phosphatidylinositol-specific phospholipase active site domains as determined by searching for statistically significant matches in the HMM-based PFAM database. (See Table 3.) Data from BLIMPS and MOTIFS analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:6 is a phospholipase. In an alternative example, SEQ ID NO:7 is 90% identical, from residue M1 to residue K1294, to Mus musculus M-RdgB2 retinal degeneration protein B subtype 2 (GenBank ID g5771350) as determined by BLAST, with a probability score of 0.0. (See Table 2.) SEQ ID NO:7 also contains a phosphatidylinositol transfer protein domain as determined by searching for statistically significant matches in the HMM-based PFAM database. (See Table 3.) Data from BLIMPS, MOTIFS, and additional BLAST analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:7 is a phosphatidylinositol transfer protein. In an alternative example, SEQ ID NO:9 is 81% identical from residue R387 to residue T546, 69% identical from residue T181 to residue Q358, and 61% identical from residue A2 to residue D191, to Mus musculus TAGL-beta (GenBank ID g6651241) as determined by BLAST, with a probability score of 3.8e-188. (See Table 2.) Data from additional BLAST analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:9 is a protein peptidoglycan recognition precursor. SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:8 were analyzed and annotated in a similar manner. The algorithms and parameters for the analysis of SEQ ID NO:1-9 are described in Table 7.

As shown in Table 4, the full length polynucleotide sequences of the present invention were assembled using cDNA sequences or coding (exon) sequences derived from genomic DNA, or any combination of these two types of sequences. Column 1 lists the polynucleotide sequence identification number (Polynucleotide SEQ ID NO:), the corresponding Incyte polynucleotide consensus sequence number (Incyte ID) for each polynucleotide of the invention, and the length of each polynucleotide sequence in basepairs. Column 2 shows the nucleotide start (5') and stop (3') positions of the cDNA and/or genomic sequences used to assemble the full length polynucleotide sequences of the invention, and of fragments of the polynucleotide sequences which are useful, for example, in hybridization or amplification technologies that identify SEQ ID NO:10-18 or that distinguish between SEQ ID NO:10-18 and related polynucleotide sequences.

The polynucleotide fragments described in Column 2 of Table 4 may refer specifically, for

WO 02/063005

PCT/US02/03813

example, to Incyte cDNAs derived from tissue-specific cDNA libraries or from pooled cDNA libraries. Alternatively, the polynucleotide fragments described in column 2 may refer to GenBank cDNAs or ESTs which contributed to the assembly of the full length polynucleotide sequences. In addition, the polynucleotide fragments described in column 2 may identify sequences derived from the

5 ENSEMBL (The Sanger Centre, Cambridge, UK) database (*i.e.*, those sequences including the designation "ENST"). Alternatively, the polynucleotide fragments described in column 2 may be derived from the NCBI RefSeq Nucleotide Sequence Records Database (*i.e.*, those sequences including the designation "NM" or "NT") or the NCBI RefSeq Protein Sequence Records (*i.e.*, those sequences including the designation "NP"). Alternatively, the polynucleotide fragments described in

10 column 2 may refer to assemblages of both cDNA and Genscan-predicted exons brought together by an "exon stitching" algorithm. For example, a polynucleotide sequence identified as FL_XXXXXX_N₁_N₂_YYYYY_N₃_N₄ represents a "stitched" sequence in which XXXXXX is the identification number of the cluster of sequences to which the algorithm was applied, and YYYYY is the number of the prediction generated by the algorithm, and N_{1,2,3,4}, if present, represent specific exons that may have been manually edited during analysis (See Example V). Alternatively, the

15 polynucleotide fragments in column 2 may refer to assemblages of exons brought together by an "exon-stretching" algorithm. For example, a polynucleotide sequence identified as FLXXXXXX_gAAAAA_gBBBBB_1_N is a "stretched" sequence, with XXXXXX being the Incyte project identification number, gAAAAA being the GenBank identification number of the human genomic sequence to which the "exon-stretching" algorithm was applied, gBBBBB being the GenBank identification number or NCBI RefSeq identification number of the nearest GenBank protein homolog, and N referring to specific exons (See Example V). In instances where a RefSeq sequence was used as a protein homolog for the "exon-stretching" algorithm, a RefSeq identifier (denoted by "NM," "NP," or "NT") may be used in place of the GenBank identifier (*i.e.*, gBBBBB).

20 Alternatively, a prefix identifies component sequences that were hand-edited, predicted from genomic DNA sequences, or derived from a combination of sequence analysis methods. The following Table lists examples of component sequence prefixes and corresponding sequence analysis methods associated with the prefixes (see Example IV and Example V).

25

Prefix	Type of analysis and/or examples of programs
GNN, GFG, ENST	Exon prediction from genomic sequences using, for example, GENSCAN (Stanford University, CA, USA) or FGENES (Computer Genomics Group, The Sanger Centre, Cambridge, UK).
GBI	Hand-edited analysis of genomic sequences.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

FL	Stitched or stretched genomic sequences (see Example V).
INCY	Full length transcript and exon prediction from mapping of EST sequences to the genome. Genomic location and EST composition data are combined to predict the exons and resulting transcript.

In some cases, Incyte cDNA coverage redundant with the sequence coverage shown in
 5 Table 4 was obtained to confirm the final consensus polynucleotide sequence, but the relevant Incyte
 cDNA identification numbers are not shown.

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

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

The invention also encompasses polynucleotides which encode LIPAM. In a particular
 embodiment, the invention encompasses a polynucleotide sequence comprising a sequence selected
 from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, which encodes LIPAM. The polynucleotide
 sequences of SEQ ID NO:10-18, as presented in the Sequence Listing, embrace the equivalent RNA
 20 sequences, wherein occurrences of the nitrogenous base thymine are replaced with uracil, and the
 sugar backbone is composed of ribose instead of deoxyribose.

The invention also encompasses a variant of a polynucleotide sequence encoding LIPAM. In
 particular, such a variant polynucleotide sequence will have at least about 70%, or alternatively at least
 about 85%, or even at least about 95% polynucleotide sequence identity to the polynucleotide
 25 sequence encoding LIPAM. A particular aspect of the invention encompasses a variant of a
 polynucleotide sequence comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-
 18 which has at least about 70%, or alternatively at least about 85%, or even at least about 95%
 polynucleotide sequence identity to a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ
 ID NO:10-18. Any one of the polynucleotide variants described above can encode an amino acid
 30 sequence which contains at least one functional or structural characteristic of LIPAM.

In addition, or in the alternative, a polynucleotide variant of the invention is a splice variant of a

WO 02/063005

PCT/US02/03813

polynucleotide sequence encoding LIPAM. A splice variant may have portions which have significant sequence identity to the polynucleotide sequence encoding LIPAM, but will generally have a greater or lesser number of polynucleotides due to additions or deletions of blocks of sequence arising from alternate splicing of exons during mRNA processing. A splice variant may have less than about 70%,
5 or alternatively less than about 60%, or alternatively less than about 50% polynucleotide sequence identity to the polynucleotide sequence encoding LIPAM over its entire length; however, portions of the splice variant will have at least about 70%, or alternatively at least about 85%, or alternatively at least about 95%, or alternatively 100% polynucleotide sequence identity to portions of the polynucleotide sequence encoding LIPAM. Any one of the splice variants described above can
10 encode an amino acid sequence which contains at least one functional or structural characteristic of LIPAM.

It will be appreciated by those skilled in the art that as a result of the degeneracy of the genetic code, a multitude of polynucleotide sequences encoding LIPAM, some bearing minimal similarity to the polynucleotide sequences of any known and naturally occurring gene, may be
15 produced. Thus, the invention contemplates each and every possible variation of polynucleotide sequence that could be made by selecting combinations based on possible codon choices. These combinations are made in accordance with the standard triplet genetic code as applied to the polynucleotide sequence of naturally occurring LIPAM, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

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

The invention also encompasses production of DNA sequences which encode LIPAM and LIPAM derivatives, or fragments thereof, entirely by synthetic chemistry. After production, the synthetic sequence may be inserted into any of the many available expression vectors and cell systems using reagents well known in the art. Moreover, synthetic chemistry may be used to introduce
30

WO 02/063005

PCT/US02/03813

mutations into a sequence encoding LIPAM or any fragment thereof.

Also encompassed by the invention are polynucleotide sequences that are capable of hybridizing to the claimed polynucleotide sequences, and, in particular, to those shown in SEQ ID NO:10-18 and fragments thereof under various conditions of stringency. (See, e.g., Wahl, G.M. and S.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407; Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511.) Hybridization conditions, including annealing and wash conditions, are described in "Definitions."

Methods for DNA sequencing are well known in the art and may be used to practice any of the embodiments of the invention. The methods may employ such enzymes as the Klenow fragment of DNA polymerase I, SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH), Taq polymerase (Applied Biosystems), thermostable T7 polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ), or combinations of polymerases and proofreading exonucleases such as those found in the ELONGASE amplification system (Life Technologies, Gaithersburg MD). Preferably, sequence preparation is automated with machines such as the MICROLAB 2200 liquid transfer system (Hamilton, Reno NV), PTC200 thermal cycler (MJ Research, Watertown MA) and ABI CATALYST 800 thermal cycler (Applied Biosystems). Sequencing is then carried out using either the ABI 373 or 377 DNA sequencing system (Applied Biosystems), the MEGABACE 1000 DNA sequencing system (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA), or other systems known in the art. The resulting sequences are analyzed using a variety of algorithms which are well known in the art. (See, e.g., Ausubel, F.M. (1997) *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7; Meyers, R.A. (1995) *Molecular Biology and Biotechnology*, Wiley VCH, New York NY, pp. 856-853.)

The nucleic acid sequences encoding LIPAM may be extended utilizing a partial nucleotide sequence and employing various PCR-based methods known in the art to detect upstream sequences, such as promoters and regulatory elements. For example, one method which may be employed, restriction-site PCR, uses universal and nested primers to amplify unknown sequence from genomic DNA within a cloning vector. (See, e.g., Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic.* 2:318-322.) Another method, inverse PCR, uses primers that extend in divergent directions to amplify unknown sequence from a circularized template. The template is derived from restriction fragments comprising a known genomic locus and surrounding sequences. (See, e.g., Triglia, T. et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:8186.) A third method, capture PCR, involves PCR amplification of DNA fragments adjacent to known sequences in human and yeast artificial chromosome DNA. (See, e.g., Lagerstrom, M. et al. (1991) *PCR Methods Applic.* 1:111-119.) In this method, multiple restriction enzyme digestions and ligations may be used to insert an engineered double-stranded sequence into a region of unknown

WO 02/063005

PCT/US02/03813

sequence before performing PCR. Other methods which may be used to retrieve unknown sequences are known in the art. (See, e.g., Parker, J.D. et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:3055-3060).

Additionally, one may use PCR, nested primers, and PROMOTERFINDER libraries (Clontech, Palo Alto CA) to walk genomic DNA. This procedure avoids the need to screen libraries and is useful in
5 finding intron/exon junctions. For all PCR-based methods, primers may be designed using commercially available software, such as OLIGO 4.06 primer analysis software (National Biosciences, Plymouth MN) or another appropriate program, to be about 22 to 30 nucleotides in length, to have a GC content of about 50% or more, and to anneal to the template at temperatures of about 68°C to 72°C.

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

15 Capillary electrophoresis systems which are commercially available may be used to analyze the size or confirm the nucleotide sequence of sequencing or PCR products. In particular, capillary sequencing may employ flowable polymers for electrophoretic separation, four different nucleotide-specific, laser-stimulated fluorescent dyes, and a charge coupled device camera for detection of the emitted wavelengths. Output/light intensity may be converted to electrical signal using appropriate
20 software (e.g., GENOTYPER and SEQUENCE NAVIGATOR, Applied Biosystems), and the entire process from loading of samples to computer analysis and electronic data display may be computer controlled. Capillary electrophoresis is especially preferable for sequencing small DNA fragments which may be present in limited amounts in a particular sample.

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

The nucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods generally
30 known in the art in order to alter LIPAM-encoding sequences for a variety of purposes including, but not limited to, modification of the cloning, processing, and/or expression of the gene product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides may be used to engineer the nucleotide sequences. For example, oligonucleotide-

WO 02/063005

PCT/US02/03813

mediated site-directed mutagenesis may be used to introduce mutations that create new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, and so forth.

The nucleotides of the present invention may be subjected to DNA shuffling techniques such as MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; described in U.S. Patent No. 5,837,458; Chang, C.-C. et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:793-797; Christians, F.C. et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:259-264; and Cramer, A. et al. (1996) *Nat. Biotechnol.* 14:315-319) to alter or improve the biological properties of LIPAM, such as its biological or enzymatic activity or its ability to bind to other molecules or compounds. DNA shuffling is a process by which a library of gene variants is produced using PCR-mediated recombination of gene fragments. The library is then subjected to selection or screening procedures that identify those gene variants with the desired properties. These preferred variants may then be pooled and further subjected to recursive rounds of DNA shuffling and selection/screening. Thus, genetic diversity is created through "artificial" breeding and rapid molecular evolution. For example, fragments of a single gene containing random point mutations may be recombined, screened, and then reshuffled until the desired properties are optimized. Alternatively, fragments of a given gene may be recombined with fragments of homologous genes in the same gene family, either from the same or different species, thereby maximizing the genetic diversity of multiple naturally occurring genes in a directed and controllable manner.

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

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

In order to express a biologically active LIPAM, the nucleotide sequences encoding LIPAM

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

Methods which are well known to those skilled in the art may be used to construct expression vectors containing sequences encoding LIPAM and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. (See, e.g., Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning, A
20 Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, ch. 4, 8, and 16-17; Ausubel, F.M. et al. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, ch. 9, 13, and 16.)

A variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express sequences encoding LIPAM. These include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria transformed
25 with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors; insect cell systems infected with viral expression vectors (e.g., baculovirus); plant cell systems transformed with viral expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV, or tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (e.g., Ti or pBR322 plasmids); or animal cell systems. (See, e.g., Sambrook, *supra*; Ausubel, *supra*; Van Heeke, G. and S.M. Schuster
30 (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509; Engelhard, E.K. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. et al. (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945; Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6:307-311; The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York NY, pp. 191-196; Logan, J. and T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659; and

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Harrington, J.J. et al. (1997) Nat. Genet. 15:345-355.) Expression vectors derived from retroviruses, adenoviruses, or herpes or vaccinia viruses, or from various bacterial plasmids, may be used for delivery of nucleotide sequences to the targeted organ, tissue, or cell population. (See, e.g., Di Nicola, M. et al. (1998) Cancer Gen. Ther. 5(6):350-356; Yu, M. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(13):6340-6344; Buller, R.M. et al. (1985) Nature 317(6040):813-815; McGregor, D.P. et al. (1994) Mol. Immunol. 31(3):219-226; and Verma, I.M. and N. Somia (1997) Nature 389:239-242.) The invention is not limited by the host cell employed.

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

Yeast expression systems may be used for production of LIPAM. A number of vectors containing constitutive or inducible promoters, such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH promoters, may be used in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* or *Pichia pastoris*. In addition, such vectors direct either the secretion or intracellular retention of expressed proteins and enable integration of foreign sequences into the host genome for stable propagation. (See, e.g., Ausubel, 1995, supra; Bitter, G.A. et al. (1987) Methods Enzymol. 153:516-544; and Scorer, C.A. et al. (1994) BioTechnology 12:181-184.)

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

transfection. (See, e.g., The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York NY, pp. 191-196.)

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

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

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

Any number of selection systems may be used to recover transformed cell lines. These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase and adenine phosphoribosyltransferase genes, for use in *tk* and *apr* cells, respectively. (See, e.g., Wigler, M. et al. (1977) Cell 11:223-232; Lowy, I. et al. (1980) Cell 22:817-823.) Also, antimetabolite, antibiotic, or herbicide resistance can be used as the basis for selection. For example, *dhfr* confers resistance to methotrexate; *neo* confers resistance to the aminoglycosides neomycin and G-418; and *als* and *pat* confer resistance to chlorsulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively. (See, e.g., Wigler, M. et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F. et al. (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14.) Additional selectable genes have been described, e.g., *trpB* and *hisD*, which

WO 02/063005

PCT/US02/03813

alter cellular requirements for metabolites. (See, e.g., Hartman, S.C. and R.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-8051.) Visible markers, e.g., anthocyanins, green fluorescent proteins (GFP; Clontech), β glucuronidase and its substrate β -glucuronide, or luciferase and its substrate luciferin may be used. These markers can be used not only to identify transformants, but also to

5 quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system. (See, e.g., Rhodes, C.A. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131.)

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, the presence and expression of the gene may need to be confirmed. For example, if the sequence encoding LIPAM is inserted within a marker gene sequence, transformed cells

10 containing sequences encoding LIPAM can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding LIPAM under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the tandem gene as well.

In general, host cells that contain the nucleic acid sequence encoding LIPAM and that

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

Immunological methods for detecting and measuring the expression of LIPAM using either

20 specific polyclonal or monoclonal antibodies are known in the art. Examples of such techniques include enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), radioimmunoassays (RIAs), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on LIPAM is preferred, but a competitive binding assay may be employed. These and other assays are well known in the art. (See,

25 e.g., Hampton, R. et al. (1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St. Paul MN, Sect. IV; Coligan, J.E. et al. (1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY; and Pound, J.D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ.)

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and

30 may be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding LIPAM include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequences encoding LIPAM, or any fragments thereof, may be cloned into a vector

WO 02/063005

PCT/US02/03813

for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3, or SP6 and labeled nucleotides. These procedures may be conducted using a variety of commercially available kits, such as those provided by Amersham Pharmacia Biotech, Promega
5 (Madison WI), and US Biochemical. Suitable reporter molecules or labels which may be used for ease of detection include radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

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

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

In another embodiment of the invention, natural, modified, or recombinant nucleic acid sequences encoding LIPAM may be ligated to a heterologous sequence resulting in translation of a
25 fusion protein in any of the aforementioned host systems. For example, a chimeric LIPAM protein containing a heterologous moiety that can be recognized by a commercially available antibody may facilitate the screening of peptide libraries for inhibitors of LIPAM activity. Heterologous protein and peptide moieties may also facilitate purification of fusion proteins using commercially available affinity matrices. Such moieties include, but are not limited to, glutathione S-transferase (GST), maltose
30 binding protein (MBP), thioredoxin (Trx), calmodulin binding peptide (CBP), 6-His, FLAG, *c-myc*, and hemagglutinin (HA). GST, MBP, Trx, CBP, and 6-His enable purification of their cognate fusion proteins on immobilized glutathione, maltose, phenylarsine oxide, calmodulin, and metal-chelate resins, respectively. FLAG, *c-myc*, and hemagglutinin (HA) enable immunoaffinity purification of fusion

WO 02/063005

PCT/US02/03813

proteins using commercially available monoclonal and polyclonal antibodies that specifically recognize these epitope tags. A fusion protein may also be engineered to contain a proteolytic cleavage site located between the LIPAM encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that LIPAM may be cleaved away from the heterologous moiety following purification. Methods for fusion protein expression and purification are discussed in Ausubel (1995, supra, ch. 10). A variety of commercially available kits may also be used to facilitate expression and purification of fusion proteins.

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

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

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

An assay may simply test binding of a test compound to the polypeptide, wherein binding is detected by a fluorophore, radioisotope, enzyme conjugate, or other detectable label. For example, the assay may comprise the steps of combining at least one test compound with LIPAM, either in solution or affixed to a solid support, and detecting the binding of LIPAM to the compound. Alternatively, the assay may detect or measure binding of a test compound in the presence of a labeled competitor. Additionally, the assay may be carried out using cell-free preparations, chemical libraries, or natural product mixtures, and the test compound(s) may be free in solution or affixed to a solid support.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

In another embodiment, polynucleotides encoding LIPAM or their mammalian homologs may be "knocked out" in an animal model system using homologous recombination in embryonic stem (ES) cells. Such techniques are well known in the art and are useful for the generation of animal models of human disease. (See, e.g., U.S. Patent No. 5,175,383 and U.S. Patent No. 5,767,337.) For example, mouse ES cells, such as the mouse 129/SvJ cell line, are derived from the early mouse embryo and grown in culture. The ES cells are transformed with a vector containing the gene of interest disrupted by a marker gene, e.g., the neomycin phosphotransferase gene (*neo*; Capecchi, M.R. (1989) *Science* 244:1288-1292). The vector integrates into the corresponding region of the host genome by homologous recombination. Alternatively, homologous recombination takes place using the Cre-loxP system to knockout a gene of interest in a tissue- or developmental stage-specific manner (Marth, J.D. (1996) *Clin. Invest.* 97:1999-2002; Wagner, K.U. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:4323-4330). Transformed ES cells are identified and microinjected into mouse cell blastocysts such as those from the C57BL/6 mouse strain. The blastocysts are surgically transferred to pseudopregnant dams, and the resulting chimeric progeny are genotyped and bred to produce heterozygous or homozygous strains. Transgenic animals thus generated may be tested with potential therapeutic or toxic agents.

Polynucleotides encoding LIPAM may also be manipulated *in vitro* in ES cells derived from human blastocysts. Human ES cells have the potential to differentiate into at least eight separate cell lineages including endoderm, mesoderm, and ectodermal cell types. These cell lineages differentiate into, for example, neural cells, hematopoietic lineages, and cardiomyocytes (Thomson, J.A. et al. (1998) *Science* 282:1145-1147).

Polynucleotides encoding LIPAM can also be used to create "knockin" humanized animals (pigs) or transgenic animals (mice or rats) to model human disease. With knockin technology, a region

WO 02/063005

PCT/US02/03813

of a polynucleotide encoding LIPAM is injected into animal ES cells, and the injected sequence integrates into the animal cell genome. Transformed cells are injected into blastulae, and the blastulae are implanted as described above. Transgenic progeny or inbred lines are studied and treated with potential pharmaceutical agents to obtain information on treatment of a human disease. Alternatively, a mammal inbred to overexpress LIPAM, e.g., by secreting LIPAM in its milk, may also serve as a convenient source of that protein (Janne, J. et al. (1998) *Biotechnol. Annu. Rev.* 4:55-74).

THERAPEUTICS

Chemical and structural similarity, e.g., in the context of sequences and motifs, exists between regions of LIPAM and lipid-associated molecules. In addition, examples of tissues expressing LIPAM are normal lung, cancerous lung, and diseased thyroid tissue, and also can be found in Table 6. Therefore, LIPAM appears to play a role in cancers, neurological, autoimmune/inflammatory, gastrointestinal, and cardiovascular disorders, and disorders of lipid metabolism. In the treatment of disorders associated with increased LIPAM expression or activity, it is desirable to decrease the expression or activity of LIPAM. In the treatment of disorders associated with decreased LIPAM expression or activity, it is desirable to increase the expression or activity of LIPAM.

Therefore, in one embodiment, LIPAM or a fragment or derivative thereof may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with decreased expression or activity of LIPAM. Examples of such disorders include, but are not limited to, a cancer, such as adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, melanoma, myeloma, sarcoma, teratocarcinoma, and, in particular, cancers of the adrenal gland, bladder, bone, bone marrow, brain, breast, cervix, gall bladder, ganglia, gastrointestinal tract, heart, kidney, liver, lung, muscle, ovary, pancreas, parathyroid, penis, prostate, salivary glands, skin, spleen, testis, thymus, thyroid, and uterus; a cardiovascular disorder such as arteriovenous fistula, atherosclerosis, hypertension, vasculitis, Raynaud's disease, aneurysms, arterial dissections, varicose veins, thrombophlebitis and phlebotrombosis, vascular tumors, and complications of thrombolysis, balloon angioplasty, vascular replacement, and coronary artery bypass graft surgery, congestive heart failure, ischemic heart disease, angina pectoris, myocardial infarction, hypertensive heart disease, degenerative valvular heart disease, calcific aortic valve stenosis, congenitally bicuspid aortic valve, mitral annular calcification, mitral valve prolapse, rheumatic fever and rheumatic heart disease, infective endocarditis, nonbacterial thrombotic endocarditis, endocarditis of systemic lupus erythematosus, carcinoid heart disease, cardiomyopathy, myocarditis, pericarditis, neoplastic heart disease, congenital heart disease, and complications of cardiac transplantation, congenital lung anomalies, atelectasis, pulmonary congestion and edema, pulmonary embolism, pulmonary hemorrhage, pulmonary infarction, pulmonary hypertension, vascular sclerosis, obstructive

WO 02/063005

PCT/US02/03813

pulmonary disease, restrictive pulmonary disease, chronic obstructive pulmonary disease, emphysema, chronic bronchitis, bronchial asthma, bronchiectasis, bacterial pneumonia, viral and mycoplasmal pneumonia, lung abscess, pulmonary tuberculosis, diffuse interstitial diseases, pneumoconioses, sarcoidosis, idiopathic pulmonary fibrosis, desquamative interstitial pneumonitis, hypersensitivity

5 pneumonitis, pulmonary eosinophilia bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia, diffuse pulmonary hemorrhage syndromes, Goodpasture's syndromes, idiopathic pulmonary hemosiderosis, pulmonary involvement in collagen-vascular disorders, pulmonary alveolar proteinosis, lung tumors, inflammatory and noninflammatory pleural effusions, pneumothorax, pleural tumors, drug-induced lung disease, radiation-induced lung disease, and complications of lung transplantation; a neurological disorder such

10 as epilepsy, ischemic cerebrovascular disease, stroke, cerebral neoplasms, Alzheimer's disease, Pick's disease, Huntington's disease, dementia, Parkinson's disease and other extrapyramidal disorders, amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders, progressive neural muscular atrophy, retinitis pigmentosa, hereditary ataxias, multiple sclerosis and other demyelinating diseases, bacterial and viral meningitis, brain abscess, subdural empyema, epidural abscess, suppurative intracranial

15 thrombophlebitis, myelitis and radiculitis, viral central nervous system disease, prion diseases including kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, nutritional and metabolic diseases of the nervous system, neurofibromatosis, tuberous sclerosis, cerebelloretinal hemangioblastomatosis, encephalotrigeminal syndrome, mental retardation and other developmental disorders of the central nervous system including Down syndrome, cerebral

20 palsy, neuroskeletal disorders, autonomic nervous system disorders, cranial nerve disorders, spinal cord diseases, muscular dystrophy and other neuromuscular disorders, peripheral nervous system disorders, dermatomyositis and polymyositis, inherited, metabolic, endocrine, and toxic myopathies, myasthenia gravis, periodic paralysis, mental disorders including mood, anxiety, and schizophrenic disorders, seasonal affective disorder (SAD), akathisia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive

25 dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, Tourette's disorder, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and familial frontotemporal dementia; an autoimmune/inflammatory disorder such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), Addison's disease, adult respiratory distress syndrome, allergies, ankylosing spondylitis, amyloidosis, anemia, asthma, atherosclerosis, autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thyroiditis, autoimmune

30 polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), bronchitis, cholecystitis, contact dermatitis, Crohn's disease, atopic dermatitis, dermatomyositis, diabetes mellitus, emphysema, episodic lymphopenia with lymphocytotoxins, erythroblastosis fetalis, erythema nodosum, atrophic gastritis, glomerulonephritis, Goodpasture's syndrome, gout, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis,

WO 02/063005

PCT/US02/03813

hypereosinophilia, irritable bowel syndrome, multiple sclerosis, myasthenia gravis, myocardial or pericardial inflammation, osteoarthritis, osteoporosis, pancreatitis, polymyositis, psoriasis, Reiter's syndrome, rheumatoid arthritis, scleroderma, Sjögren's syndrome, systemic anaphylaxis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, thrombocytopenic purpura, ulcerative colitis, uveitis, Werner syndrome, complications of cancer, hemodialysis, and extracorporeal circulation, viral, bacterial, 5 fungal, parasitic, protozoal, and helminthic infections, and trauma; a gastrointestinal disorder such as dysphagia, peptic esophagitis, esophageal spasm, esophageal stricture, esophageal carcinoma, dyspepsia, indigestion, gastritis, gastric carcinoma, anorexia, nausea, emesis, gastroparesis, antral or pyloric edema, abdominal angina, pyrosis, gastroenteritis, intestinal obstruction, infections of the 10 intestinal tract, peptic ulcer, cholelithiasis, cholecystitis, cholestasis, pancreatitis, pancreatic carcinoma, biliary tract disease, hepatitis, hyperbilirubinemia, cirrhosis, passive congestion of the liver, hepatoma, infectious colitis, ulcerative colitis, ulcerative proctitis, Crohn's disease, Whipple's disease, Mallory-Weiss syndrome, colonic carcinoma, colonic obstruction, irritable bowel syndrome, short bowel syndrome, diarrhea, constipation, gastrointestinal hemorrhage, acquired immunodeficiency syndrome 15 (AIDS) enteropathy, jaundice, hepatic encephalopathy, hepatorenal syndrome, hepatic steatosis, hemochromatosis, Wilson's disease, alpha₁-antitrypsin deficiency, Reye's syndrome, primary sclerosing cholangitis, liver infarction, portal vein obstruction and thrombosis, centrilobular necrosis, peliosis hepatis, hepatic vein thrombosis, veno-occlusive disease, preeclampsia, eclampsia, acute fatty liver of pregnancy, intrahepatic cholestasis of pregnancy, and hepatic tumors including nodular 20 hyperplasias, adenomas, and carcinomas; and a disorder of lipid metabolism such as fatty liver, cholestasis, primary biliary cirrhosis, carnitine deficiency, carnitine palmitoyltransferase deficiency, myoadenylate deaminase deficiency, hypertriglyceridemia, lipid storage disorders such as Fabry's disease, Gaucher's disease, Niemann-Pick's disease, metachromatic leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, GM₂ gangliosidosis, and ceroid lipofuscinosis, abetalipoproteinemia, Tangier 25 disease, hyperlipoproteinemia, diabetes mellitus, lipodystrophy, lipomatoses, acute panniculitis, disseminated fat necrosis, adiposis dolorosa, lipoid adrenal hyperplasia, minimal change disease, lipomas, atherosclerosis, hypercholesterolemia, hypercholesterolemia with hypertriglyceridemia, primary hypopalipoproteinemia, hypothyroidism, renal disease, liver disease, lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency, cerebrotendinous xanthomatosis, sitosterolemia, hypocholesterolemia, Tay-

30 Sachs disease, Sandhoff's disease, hyperlipidemia, hyperlipemia, lipid myopathies, and obesity.

In another embodiment, a vector capable of expressing LIPAM or a fragment or derivative thereof may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with decreased expression or activity of LIPAM including, but not limited to, those described above.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

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

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

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

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

25 An antagonist of LIPAM may be produced using methods which are generally known in the art. In particular, purified LIPAM may be used to produce antibodies or to screen libraries of pharmaceutical agents to identify those which specifically bind LIPAM. Antibodies to LIPAM may also be generated using methods that are well known in the art. Such antibodies may include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, and single chain antibodies, Fab fragments, and
30 fragments produced by a Fab expression library. Neutralizing antibodies (i.e., those which inhibit dimer formation) are generally preferred for therapeutic use. Single chain antibodies (e.g., from camels or llamas) may be potent enzyme inhibitors and may have advantages in the design of peptide mimetics, and in the development of immuno-adsorbents and biosensors (Muyldermans, S. (2001) J.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Biotechnol. 74:277-302).

For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice, camels, dromedaries, llamas, humans, and others may be immunized by injection with LIPAM or with any fragment or oligopeptide thereof which has immunogenic properties. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminum hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, KLH, and dinitrophenol. Among adjuvants used in humans, BCG (bacilli Calmette-Guerin) and Corynebacterium parvum are especially preferable.

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

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

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

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

G. et al. (1991) Nature 349:293-299.)

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

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

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

The titer and avidity of polyclonal antibody preparations may be further evaluated to determine the quality and suitability of such preparations for certain downstream applications. For example, a polyclonal antibody preparation containing at least 1-2 mg specific antibody/ml, preferably 5-10 mg specific antibody/ml, is generally employed in procedures requiring precipitation of LIPAM-antibody

WO 02/063005

PCT/US02/03813

complexes. Procedures for evaluating antibody specificity, titer, and avidity, and guidelines for antibody quality and usage in various applications, are generally available. (See, e.g., Catty, supra, and Coligan et al. supra.)

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

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

In another embodiment of the invention, polynucleotides encoding LIPAM may be used for
25 somatic or germline gene therapy. Gene therapy may be performed to (i) correct a genetic deficiency (e.g., in the cases of severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease characterized by X-linked inheritance (Cavazzana-Calvo, M. et al. (2000) *Science* 288:669-672), severe combined immunodeficiency syndrome associated with an inherited adenosine deaminase (ADA) deficiency (Blaese, R.M. et al. (1995) *Science* 270:475-480; Bordignon, C. et al. (1995) *Science* 270:470-475),
30 cystic fibrosis (Zabner, J. et al. (1993) *Cell* 75:207-216; Crystal, R.G. et al. (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:643-666; Crystal, R.G. et al. (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:667-703), thalassamias, familial hypercholesterolemia, and hemophilia resulting from Factor VIII or Factor IX deficiencies (Crystal, R.G. (1995) *Science* 270:404-410; Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 389:239-242)), (ii)

WO 02/063005

PCT/US02/03813

express a conditionally lethal gene product (e.g., in the case of cancers which result from unregulated cell proliferation), or (iii) express a protein which affords protection against intracellular parasites (e.g., against human retroviruses, such as human immunodeficiency virus (HIV) (Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396; Poeschla, E. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11395-11399), hepatitis B or C virus (HBV, HCV); fungal parasites, such as Candida albicans and Paracoccidioides brasiliensis; and protozoan parasites such as Plasmodium falciparum and Trypanosoma cruzi). In the case where a genetic deficiency in LIPAM expression or regulation causes disease, the expression of LIPAM from an appropriate population of transduced cells may alleviate the clinical manifestations caused by the genetic deficiency.

10 In a further embodiment of the invention, diseases or disorders caused by deficiencies in LIPAM are treated by constructing mammalian expression vectors encoding LIPAM and introducing these vectors by mechanical means into LIPAM-deficient cells. Mechanical transfer technologies for use with cells in vivo or ex vivo include (i) direct DNA microinjection into individual cells, (ii) ballistic gold particle delivery, (iii) liposome-mediated transfection, (iv) receptor-mediated gene transfer, and 15 (v) the use of DNA transposons (Morgan, R.A. and W.F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217; Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J.L. and H. Récipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450).

Expression vectors that may be effective for the expression of LIPAM include, but are not limited to, the pCDNA 3.1, EPITAG, PRCCMV2, PREP, PVAX, PCR2-TOPOTA vectors 20 (Invitrogen, Carlsbad CA), PCMV-SCRIPT, PCMV-TAG, PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA), and PTET-OFF, PTET-ON, PTRE2, PTRE2-LUC, PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA). LIPAM may be expressed using (i) a constitutively active promoter, (e.g., from cytomegalovirus (CMV), Rous sarcoma virus (RSV), SV40 virus, thymidine kinase (TK), or β -actin genes), (ii) an inducible promoter (e.g., the tetracycline-regulated promoter (Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551; Gossen, M. et al. (1995) Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456), commercially available in the T-REX plasmid (Invitrogen)); 25 the ecdysone-inducible promoter (available in the plasmids PVGRXR and PIND; Invitrogen); the FK506/rapamycin inducible promoter; or the RU486/mifepristone inducible promoter (Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, supra), or (iii) a tissue-specific promoter or the native promoter of the endogenous 30 gene encoding LIPAM from a normal individual.

Commercially available liposome transformation kits (e.g., the PERFECT LIPID TRANSFECTION KIT, available from Invitrogen) allow one with ordinary skill in the art to deliver polynucleotides to target cells in culture and require minimal effort to optimize experimental

WO 02/063005

PCT/US02/03813

parameters. In the alternative, transformation is performed using the calcium phosphate method (Graham, F.L. and A.J. Eb (1973) *Virology* 52:456-467), or by electroporation (Neumann, E. et al. (1982) *EMBO J.* 1:841-845). The introduction of DNA to primary cells requires modification of these standardized mammalian transfection protocols.

- 5 In another embodiment of the invention, diseases or disorders caused by genetic defects with respect to LIPAM expression are treated by constructing a retrovirus vector consisting of (i) the polynucleotide encoding LIPAM under the control of an independent promoter or the retrovirus long terminal repeat (LTR) promoter, (ii) appropriate RNA packaging signals, and (iii) a Rev-responsive element (RRE) along with additional retrovirus *cis*-acting RNA sequences and coding sequences
- 10 required for efficient vector propagation. Retrovirus vectors (e.g., PFB and PFBNEO) are commercially available (Stratagene) and are based on published data (Riviere, I. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6733-6737), incorporated by reference herein. The vector is propagated in an appropriate vector producing cell line (VPCL) that expresses an envelope gene with a tropism for receptors on the target cells or a promiscuous envelope protein such as VSVg (Armentano, D. et al. (1987) *J. Virol.* 61:1647-1650; Bender, M.A. et al. (1987) *J. Virol.* 61:1639-1646; Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) *J. Virol.* 62:3802-3806; Dull, T. et al. (1998) *J. Virol.* 72:8463-8471; Zufferey, R. et al. (1998) *J. Virol.* 72:9873-9880). U.S. Patent No. 5,910,434 to Rigg ("Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant") discloses a method for obtaining retrovirus packaging cell lines and is hereby incorporated by reference.
- 20 Propagation of retrovirus vectors, transduction of a population of cells (e.g., CD4⁺ T-cells), and the return of transduced cells to a patient are procedures well known to persons skilled in the art of gene therapy and have been well documented (Ranga, U. et al. (1997) *J. Virol.* 71:7020-7029; Bauer, G. et al. (1997) *Blood* 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) *J. Virol.* 71:4707-4716; Ranga, U. et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1201-1206; Su, L. (1997) *Blood* 89:2283-2290).
- 25 In the alternative, an adenovirus-based gene therapy delivery system is used to deliver polynucleotides encoding LIPAM to cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of LIPAM. The construction and packaging of adenovirus-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. Replication defective adenovirus vectors have proven to be versatile for importing genes encoding immunoregulatory proteins into intact islets in the pancreas
- 30 (Csete, M.E. et al. (1995) *Transplantation* 27:263-268). Potentially useful adenoviral vectors are described in U.S. Patent No. 5,707,618 to Armentano ("Adenovirus vectors for gene therapy"), hereby incorporated by reference. For adenoviral vectors, see also Antinozzi, P.A. et al. (1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19:511-544 and Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 18:389:239-242, both

WO 02/063005

PCT/US02/03813

incorporated by reference herein.

In another alternative, a herpes-based, gene therapy delivery system is used to deliver polynucleotides encoding LIPAM to target cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of LIPAM. The use of herpes simplex virus (HSV)-based vectors may be especially valuable for introducing LIPAM to cells of the central nervous system, for which HSV has a tropism. The construction and packaging of herpes-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. A replication-competent herpes simplex virus (HSV) type 1-based vector has been used to deliver a reporter gene to the eyes of primates (Liu, X. et al. (1999) *Exp. Eye Res.* 169:385-395). The construction of a HSV-1 virus vector has also been disclosed in detail in U.S. Patent No. 5,804,413 to DeLuca ("Herpes simplex virus strains for gene transfer"), which is hereby incorporated by reference. U.S. Patent No. 5,804,413 teaches the use of recombinant HSV d92 which consists of a genome containing at least one exogenous gene to be transferred to a cell under the control of the appropriate promoter for purposes including human gene therapy. Also taught by this patent are the construction and use of recombinant HSV strains deleted for ICP4, ICP27 and ICP22. For HSV vectors, see also Goins, W.F. et al. (1999) *J. Virol.* 73:519-532 and Xu, H. et al. (1994) *Dev. Biol.* 163:152-161, hereby incorporated by reference. The manipulation of cloned herpesvirus sequences, the generation of recombinant virus following the transfection of multiple plasmids containing different segments of the large herpesvirus genomes, the growth and propagation of herpesvirus, and the infection of cells with herpesvirus are techniques well known to those of ordinary skill in the art.

In another alternative, an alphavirus (positive, single-stranded RNA virus) vector is used to deliver polynucleotides encoding LIPAM to target cells. The biology of the prototypic alphavirus, Semliki Forest Virus (SFV), has been studied extensively and gene transfer vectors have been based on the SFV genome (Garoff, H. and K.-J. Li (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:464-469). During alphavirus RNA replication, a subgenomic RNA is generated that normally encodes the viral capsid proteins. This subgenomic RNA replicates to higher levels than the full length genomic RNA, resulting in the overproduction of capsid proteins relative to the viral proteins with enzymatic activity (e.g., protease and polymerase). Similarly, inserting the coding sequence for LIPAM into the alphavirus genome in place of the capsid-coding region results in the production of a large number of LIPAM-coding RNAs and the synthesis of high levels of LIPAM in vector transduced cells. While alphavirus infection is typically associated with cell lysis within a few days, the ability to establish a persistent infection in hamster normal kidney cells (BHK-21) with a variant of Sindbis virus (SIN) indicates that the lytic replication of alphaviruses can be altered to suit the needs of the gene therapy

WO 02/063005

PCT/US02/03813

application (Dryga, S.A. et al. (1997) *Virology* 228:74-83). The wide host range of alphaviruses will allow the introduction of LIPAM into a variety of cell types. The specific transduction of a subset of cells in a population may require the sorting of cells prior to transduction. The methods of manipulating infectious cDNA clones of alphaviruses, performing alphavirus cDNA and RNA transfections, and performing alphavirus infections, are well known to those with ordinary skill in the art.

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

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

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

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

constructs that synthesize complementary RNA, constitutively or inducibly, can be introduced into cell lines, cells, or tissues.

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

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

At least one, and up to a plurality, of test compounds may be screened for effectiveness in altering expression of a specific polynucleotide. A test compound may be obtained by any method commonly known in the art, including chemical modification of a compound known to be effective in altering polynucleotide expression; selection from an existing, commercially-available or proprietary library of naturally-occurring or non-natural chemical compounds; rational design of a compound based on chemical and/or structural properties of the target polynucleotide; and selection from a library of chemical compounds created combinatorially or randomly. A sample comprising a polynucleotide encoding LIPAM is exposed to at least one test compound thus obtained. The sample may comprise, for example, an intact or permeabilized cell, or an *in vitro* cell-free or reconstituted biochemical system. Alterations in the expression of a polynucleotide encoding LIPAM are assayed by any method commonly known in the art. Typically, the expression of a specific nucleotide is detected by hybridization with a probe having a nucleotide sequence complementary to the sequence

WO 02/063005

PCT/US02/03813

of the polynucleotide encoding LIPAM. The amount of hybridization may be quantified, thus forming the basis for a comparison of the expression of the polynucleotide both with and without exposure to one or more test compounds. Detection of a change in the expression of a polynucleotide exposed to a test compound indicates that the test compound is effective in altering the expression of the

5 polynucleotide. A screen for a compound effective in altering expression of a specific polynucleotide can be carried out, for example, using a Schizosaccharomyces pombe gene expression system (Atkins, D. et al. (1999) U.S. Patent No. 5,932,435; Arndt, G.M. et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28:E15) or a human cell line such as HeLa cell (Clarke, M.L. et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:8-13). A particular embodiment of the present invention involves screening a combinatorial library

10 of oligonucleotides (such as deoxyribonucleotides, ribonucleotides, peptide nucleic acids, and modified oligonucleotides) for antisense activity against a specific polynucleotide sequence (Bruice, T.W. et al. (1997) U.S. Patent No. 5,686,242; Bruice, T.W. et al. (2000) U.S. Patent No. 6,022,691).

Many methods for introducing vectors into cells or tissues are available and equally suitable for use *in vivo*, *in vitro*, and *ex vivo*. For *ex vivo* therapy, vectors may be introduced into stem cells

15 taken from the patient and clonally propagated for autologous transplant back into that same patient. Delivery by transfection, by liposome injections, or by polycationic amino polymers may be achieved using methods which are well known in the art. (See, e.g., Goldman, C.K. et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15:462-466.)

Any of the therapeutic methods described above may be applied to any subject in need of

20 such therapy, including, for example, mammals such as humans, dogs, cats, cows, horses, rabbits, and monkeys.

An additional embodiment of the invention relates to the administration of a composition which generally comprises an active ingredient formulated with a pharmaceutically acceptable excipient. Excipients may include, for example, sugars, starches, celluloses, gums, and proteins. Various

25 formulations are commonly known and are thoroughly discussed in the latest edition of Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing, Easton PA). Such compositions may consist of LIPAM, antibodies to LIPAM, and mimetics, agonists, antagonists, or inhibitors of LIPAM.

The compositions utilized in this invention may be administered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal,

30 intraventricular, pulmonary, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, enteral, topical, sublingual, or rectal means.

Compositions for pulmonary administration may be prepared in liquid or dry powder form. These compositions are generally aerosolized immediately prior to inhalation by the patient. In the

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

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

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

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

A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient, for example LIPAM or fragments thereof, antibodies of LIPAM, and agonists, antagonists or inhibitors of LIPAM, which ameliorates the symptoms or condition. Therapeutic efficacy and toxicity may be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or with experimental animals, such as by calculating the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population) or LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) statistics. The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, which can be expressed as the LD₅₀/ED₅₀ ratio. Compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies are used to formulate a range of dosage for human use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that includes the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, the sensitivity of the patient, and the route of administration.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

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

DIAGNOSTICS

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

A variety of protocols for measuring LIPAM, including ELISAs, RIAs, and FACS, are known in the art and provide a basis for diagnosing altered or abnormal levels of LIPAM expression. Normal or standard values for LIPAM expression are established by combining body fluids or cell extracts taken from normal mammalian subjects, for example, human subjects, with antibodies to LIPAM under conditions suitable for complex formation. The amount of standard complex formation may be quantitated by various methods, such as photometric means. Quantities of LIPAM expressed in subject, control, and disease samples from biopsied tissues are compared with the standard values. Deviation between standard and subject values establishes the parameters for diagnosing disease.

In another embodiment of the invention, the polynucleotides encoding LIPAM may be used for diagnostic purposes. The polynucleotides which may be used include oligonucleotide sequences, complementary RNA and DNA molecules, and PNAs. The polynucleotides may be used to detect

WO 02/063005

PCT/US02/03813

and quantify gene expression in biopsied tissues in which expression of LIPAM may be correlated with disease. The diagnostic assay may be used to determine absence, presence, and excess expression of LIPAM, and to monitor regulation of LIPAM levels during therapeutic intervention.

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

Probes may also be used for the detection of related sequences, and may have at least 50% sequence identity to any of the LIPAM encoding sequences. The hybridization probes of the subject invention may be DNA or RNA and may be derived from the sequence of SEQ ID NO:10-18 or from genomic sequences including promoters, enhancers, and introns of the LIPAM gene.

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

Polynucleotide sequences encoding LIPAM may be used for the diagnosis of disorders associated with expression of LIPAM. Examples of such disorders include, but are not limited to, a cancer, such as adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, melanoma, myeloma, sarcoma, teratocarcinoma, and, in particular, cancers of the adrenal gland, bladder, bone, bone marrow, brain, breast, cervix, gall bladder, ganglia, gastrointestinal tract, heart, kidney, liver, lung, muscle, ovary, pancreas, parathyroid, penis, prostate, salivary glands, skin, spleen, testis, thymus, thyroid, and uterus; a cardiovascular disorder such as arteriovenous fistula, atherosclerosis, hypertension, vasculitis, Raynaud's disease, aneurysms, arterial dissections, varicose veins, thrombophlebitis and phlebotrombosis, vascular tumors, and complications of thrombolysis, balloon angioplasty, vascular replacement, and coronary artery bypass graft surgery, congestive heart failure, ischemic heart disease, angina pectoris, myocardial infarction, hypertensive heart disease, degenerative valvular heart disease, calcific aortic valve stenosis, congenitally bicuspid aortic valve, mitral annular calcification,

WO 02/063005

PCT/US02/03813

mitral valve prolapse, rheumatic fever and rheumatic heart disease, infective endocarditis, nonbacterial thrombotic endocarditis, endocarditis of systemic lupus erythematosus, carcinoid heart disease, cardiomyopathy, myocarditis, pericarditis, neoplastic heart disease, congenital heart disease, and complications of cardiac transplantation, congenital lung anomalies, atelectasis, pulmonary congestion
5 and edema, pulmonary embolism, pulmonary hemorrhage, pulmonary infarction, pulmonary hypertension, vascular sclerosis, obstructive pulmonary disease, restrictive pulmonary disease, chronic obstructive pulmonary disease, emphysema, chronic bronchitis, bronchial asthma, bronchiectasis, bacterial pneumonia, viral and mycoplasmal pneumonia, lung abscess, pulmonary tuberculosis, diffuse interstitial diseases, pneumoconioses, sarcoidosis, idiopathic pulmonary fibrosis, desquamative
10 interstitial pneumonitis, hypersensitivity pneumonitis, pulmonary eosinophilia bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia, diffuse pulmonary hemorrhage syndromes, Goodpasture's syndromes, idiopathic pulmonary hemosiderosis, pulmonary involvement in collagen-vascular disorders, pulmonary alveolar proteinosis, lung tumors, inflammatory and noninflammatory pleural effusions, pneumothorax, pleural tumors, drug-induced lung disease, radiation-induced lung disease, and complications of lung
15 transplantation; a neurological disorder such as epilepsy, ischemic cerebrovascular disease, stroke, cerebral neoplasms, Alzheimer's disease, Pick's disease, Huntington's disease, dementia, Parkinson's disease and other extrapyramidal disorders, amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders, progressive neural muscular atrophy, retinitis pigmentosa, hereditary ataxias, multiple sclerosis and other demyelinating diseases, bacterial and viral meningitis, brain abscess, subdural
20 empyema, epidural abscess, suppurative intracranial thrombophlebitis, myelitis and radiculitis, viral central nervous system disease, prion diseases including kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, nutritional and metabolic diseases of the nervous system, neurofibromatosis, tuberous sclerosis, cerebelloretinal hemangioblastomatosis, encephalotrigeminal syndrome, mental retardation and other developmental disorders of the central
25 nervous system including Down syndrome, cerebral palsy, neuroskeletal disorders, autonomic nervous system disorders, cranial nerve disorders, spinal cord diseases, muscular dystrophy and other neuromuscular disorders, peripheral nervous system disorders, dermatomyositis and polymyositis, inherited, metabolic, endocrine, and toxic myopathies, myasthenia gravis, periodic paralysis, mental disorders including mood, anxiety, and schizophrenic disorders, seasonal affective disorder (SAD),
30 akathisia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, Tourette's disorder, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and familial frontotemporal dementia; an autoimmune/inflammatory disorder such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), Addison's disease, adult respiratory distress syndrome, allergies,

WO 02/063005

PCT/US02/03813

ankylosing spondylitis, amyloidosis, anemia, asthma, atherosclerosis, autoimmune hemolytic anemia,
 autoimmune thyroiditis, autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy
 (APECED), bronchitis, cholecystitis, contact dermatitis, Crohn's disease, atopic dermatitis,
 dermatomyositis, diabetes mellitus, emphysema, episodic lymphopenia with lymphocytotoxins,
 5 erythroblastosis fetalis, erythema nodosum, atrophic gastritis, glomerulonephritis, Goodpasture's
 syndrome, gout, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, hypereosinophilia, irritable bowel syndrome,
 multiple sclerosis, myasthenia gravis, myocardial or pericardial inflammation, osteoarthritis,
 osteoporosis, pancreatitis, polymyositis, psoriasis, Reiter's syndrome, rheumatoid arthritis, scleroderma,
 Sjögren's syndrome, systemic anaphylaxis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis,
 10 thrombocytopenic purpura, ulcerative colitis, uveitis, Werner syndrome, complications of cancer,
 hemodialysis, and extracorporeal circulation, viral, bacterial, fungal, parasitic, protozoal, and helminthic
 infections, and trauma; a gastrointestinal disorder such as dysphagia, peptic esophagitis, esophageal
 spasm, esophageal stricture, esophageal carcinoma, dyspepsia, indigestion, gastritis, gastric carcinoma,
 anorexia, nausea, emesis, gastroparesis, antral or pyloric edema, abdominal angina, pyrosis,
 15 gastroenteritis, intestinal obstruction, infections of the intestinal tract, peptic ulcer, cholelithiasis,
 cholecystitis, cholestasis, pancreatitis, pancreatic carcinoma, biliary tract disease, hepatitis,
 hyperbilirubinemia, cirrhosis, passive congestion of the liver, hepatoma, infectious colitis, ulcerative
 colitis, ulcerative proctitis, Crohn's disease, Whipple's disease, Mallory-Weiss syndrome, colonic
 carcinoma, colonic obstruction, irritable bowel syndrome, short bowel syndrome, diarrhea, constipation,
 20 gastrointestinal hemorrhage, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) enteropathy, jaundice,
 hepatic encephalopathy, hepatorenal syndrome, hepatic steatosis, hemochromatosis, Wilson's disease,
 alpha₁-antitrypsin deficiency, Reye's syndrome, primary sclerosing cholangitis, liver infarction, portal
 vein obstruction and thrombosis, centrilobular necrosis, peliosis hepatis, hepatic vein thrombosis, veno-
 occlusive disease, preeclampsia, eclampsia, acute fatty liver of pregnancy, intrahepatic cholestasis of
 25 pregnancy, and hepatic tumors including nodular hyperplasias, adenomas, and carcinomas; and a
 disorder of lipid metabolism such as fatty liver, cholestasis, primary biliary cirrhosis, carnitine
 deficiency, carnitine palmitoyltransferase deficiency, myoadenylate deaminase deficiency,
 hypertriglyceridemia, lipid storage disorders such as Fabry's disease, Gaucher's disease, Niemann-Pick's
 disease, metachromatic leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, GM₂ gangliosidosis, and ceroid
 30 lipofuscinosis, abetalipoproteinemia, Tangier disease, hyperlipoproteinemia, diabetes mellitus,
 lipodystrophy, lipomatosis, acute panniculitis, disseminated fat necrosis, adiposis dolorosa, lipoid
 adrenal hyperplasia, minimal change disease, lipomas, atherosclerosis, hypercholesterolemia,
 hypercholesterolemia with hypertriglyceridemia, primary hypolipoproteinemia, hypothyroidism,

WO 02/063005

PCT/US02/03813

renal disease, liver disease, lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency, cerebrotendinous xanthomatosis, sitosterolemia, hypocholesterolemia, Tay-Sachs disease, Sandhoff's disease, hyperlipidemia, hyperlipemia, lipid myopathies, and obesity. The polynucleotide sequences encoding LIPAM may be used in Southern or northern analysis, dot blot, or other membrane-based

5 technologies; in PCR technologies; in dipstick, pin, and multiformat ELISA-like assays; and in microarrays utilizing fluids or tissues from patients to detect altered LIPAM expression. Such qualitative or quantitative methods are well known in the art.

In a particular aspect, the nucleotide sequences encoding LIPAM may be useful in assays that detect the presence of associated disorders, particularly those mentioned above. The nucleotide

10 sequences encoding LIPAM may be labeled by standard methods and added to a fluid or tissue sample from a patient under conditions suitable for the formation of hybridization complexes. After a suitable incubation period, the sample is washed and the signal is quantified and compared with a standard value. If the amount of signal in the patient sample is significantly altered in comparison to a control sample then the presence of altered levels of nucleotide sequences encoding LIPAM in the

15 sample indicates the presence of the associated disorder. Such assays may also be used to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regimen in animal studies, in clinical trials, or to monitor the treatment of an individual patient.

In order to provide a basis for the diagnosis of a disorder associated with expression of LIPAM, a normal or standard profile for expression is established. This may be accomplished by

20 combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with a sequence, or a fragment thereof, encoding LIPAM, under conditions suitable for hybridization or amplification. Standard hybridization may be quantified by comparing the values obtained from normal subjects with values from an experiment in which a known amount of a substantially purified polynucleotide is used. Standard values obtained in this manner may be compared with values

25 obtained from samples from patients who are symptomatic for a disorder. Deviation from standard values is used to establish the presence of a disorder.

Once the presence of a disorder is established and a treatment protocol is initiated, hybridization assays may be repeated on a regular basis to determine if the level of expression in the patient begins to approximate that which is observed in the normal subject. The results obtained from

30 successive assays may be used to show the efficacy of treatment over a period ranging from several days to months.

With respect to cancer, the presence of an abnormal amount of transcript (either under- or overexpressed) in biopsied tissue from an individual may indicate a predisposition for the development

WO 02/063005

PCT/US02/03813

of the disease, or may provide a means for detecting the disease prior to the appearance of actual clinical symptoms. A more definitive diagnosis of this type may allow health professionals to employ preventative measures or aggressive treatment earlier thereby preventing the development or further progression of the cancer.

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

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

30 SNPs may be used to study the genetic basis of human disease. For example, at least 16 common SNPs have been associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. SNPs are also useful for examining differences in disease outcomes in monogenic disorders, such as cystic fibrosis, sickle cell anemia, or chronic granulomatous disease. For example, variants in the mannose-binding

WO 02/063005

PCT/US02/03813

lectin, MBL2, have been shown to be correlated with deleterious pulmonary outcomes in cystic fibrosis. SNPs also have utility in pharmacogenomics, the identification of genetic variants that influence a patient's response to a drug, such as life-threatening toxicity. For example, a variation in N-acetyl transferase is associated with a high incidence of peripheral neuropathy in response to the anti-tuberculosis drug isoniazid, while a variation in the core promoter of the ALOX5 gene results in diminished clinical response to treatment with an anti-asthma drug that targets the 5-lipoxygenase pathway. Analysis of the distribution of SNPs in different populations is useful for investigating genetic drift, mutation, recombination, and selection, as well as for tracing the origins of populations and their migrations. (Taylor, J.G. et al. (2001) Trends Mol. Med. 7:507-512; Kwok, P.-Y. and Z. Gu (1999) Mol. Med. Today 5:538-543; Nowotny, P. et al. (2001) Curr. Opin. Neurobiol. 11:637-641.)

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

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

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

A particular embodiment relates to the use of the polynucleotides of the present invention to

WO 02/063005

PCT/US02/03813

generate a transcript image of a tissue or cell type. A transcript image represents the global pattern of gene expression by a particular tissue or cell type. Global gene expression patterns are analyzed by quantifying the number of expressed genes and their relative abundance under given conditions and at a given time. (See Seilhamer et al., "Comparative Gene Transcript Analysis," U.S. Patent No. 5,840,484, expressly incorporated by reference herein.) Thus a transcript image may be generated by hybridizing the polynucleotides of the present invention or their complements to the totality of transcripts or reverse transcripts of a particular tissue or cell type. In one embodiment, the hybridization takes place in high-throughput format, wherein the polynucleotides of the present invention or their complements comprise a subset of a plurality of elements on a microarray. The resultant transcript image would provide a profile of gene activity.

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

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

Another particular embodiment relates to the use of the polypeptide sequences of the present invention to analyze the proteome of a tissue or cell type. The term proteome refers to the global
10 pattern of protein expression in a particular tissue or cell type. Each protein component of a proteome can be subjected individually to further analysis. Proteome expression patterns, or profiles, are analyzed by quantifying the number of expressed proteins and their relative abundance under given conditions and at a given time. A profile of a cell's proteome may thus be generated by separating and analyzing the polypeptides of a particular tissue or cell type. In one embodiment, the separation is
15 achieved using two-dimensional gel electrophoresis, in which proteins from a sample are separated by isoelectric focusing in the first dimension, and then according to molecular weight by sodium dodecyl sulfate slab gel electrophoresis in the second dimension (Steiner and Anderson, *supra*). The proteins are visualized in the gel as discrete and uniquely positioned spots, typically by staining the gel with an agent such as Coomassie Blue or silver or fluorescent stains. The optical density of each protein spot
20 is generally proportional to the level of the protein in the sample. The optical densities of equivalently positioned protein spots from different samples, for example, from biological samples either treated or untreated with a test compound or therapeutic agent, are compared to identify any changes in protein spot density related to the treatment. The proteins in the spots are partially sequenced using, for example, standard methods employing chemical or enzymatic cleavage followed by mass
25 spectrometry. The identity of the protein in a spot may be determined by comparing its partial sequence, preferably of at least 5 contiguous amino acid residues, to the polypeptide sequences of the present invention. In some cases, further sequence data may be obtained for definitive protein identification.

A proteomic profile may also be generated using antibodies specific for LIPAM to quantify
30 the levels of LIPAM expression. In one embodiment, the antibodies are used as elements on a microarray, and protein expression levels are quantified by exposing the microarray to the sample and detecting the levels of protein bound to each array element (Lueking, A. et al. (1999) *Anal. Biochem.* 270:103-111; Mendez, L.G. et al. (1999) *Biotechniques* 27:778-788). Detection may be performed by

WO 02/063005

PCT/US02/03813

a variety of methods known in the art, for example, by reacting the proteins in the sample with a thiol- or amino-reactive fluorescent compound and detecting the amount of fluorescence bound at each array element.

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

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

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

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

In another embodiment of the invention, nucleic acid sequences encoding LIPAM may be used to generate hybridization probes useful in mapping the naturally occurring genomic sequence.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

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

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

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

between LIPAM and the agent being tested may be measured.

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

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

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

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

The disclosures of all patents, applications and publications, mentioned above and below, including U.S. Ser. No. 60/266,910, U.S. Ser. No. 60/276,891, U.S. Ser. No. 60/279,760, U.S. Ser. No. 60/283,818, U.S. Ser. No. 60/276,855, and U.S. Ser. No. 60/285,405, are expressly incorporated
25 by reference herein.

EXAMPLES

I. Construction of cDNA Libraries

Incyte cDNAs were derived from cDNA libraries described in the LIFESEQ GOLD
30 database (Incyte Genomics, Palo Alto CA). Some tissues were homogenized and lysed in guanidinium isothiocyanate, while others were homogenized and lysed in phenol or in a suitable mixture of denaturants, such as TRIZOL (Life Technologies), a monophasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate. The resulting lysates were centrifuged over CsCl cushions or extracted with

WO 02/063005

PCT/US02/03813

chloroform. RNA was precipitated from the lysates with either isopropanol or sodium acetate and ethanol, or by other routine methods.

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

In some cases, Stratagene was provided with RNA and constructed the corresponding cDNA
10 libraries. Otherwise, cDNA was synthesized and cDNA libraries were constructed with the UNIZAP vector system (Stratagene) or SUPERSKRIP plasmid system (Life Technologies), using the recommended procedures or similar methods known in the art. (See, e.g., Ausubel, 1997, *supra*, units 5.1-6.6.) Reverse transcription was initiated using oligo d(T) or random primers. Synthetic oligonucleotide adapters were ligated to double stranded cDNA, and the cDNA was digested with the
15 appropriate restriction enzyme or enzymes. For most libraries, the cDNA was size-selected (300-1000 bp) using SEPHACRYL S1000, SEPHAROSE CL2B, or SEPHAROSE CL4B column chromatography (Amersham Pharmacia Biotech) or preparative agarose gel electrophoresis. cDNAs were ligated into compatible restriction enzyme sites of the polylinker of a suitable plasmid, e.g., PBLUESKRIP plasmid (Stratagene), PSPORT1 plasmid (Life Technologies), PCDNA2.1 plasmid
20 (Invitrogen, Carlsbad CA), PBK-CMV plasmid (Stratagene), PCR2-TOPOTA plasmid (Invitrogen), PCMV-ICIS plasmid (Stratagene), pIGEN (Incyte Genomics, Palo Alto CA), pRARE (Incyte Genomics), or pINCY (Incyte Genomics), or derivatives thereof. Recombinant plasmids were transformed into competent *E. coli* cells including XL1-Blue, XL1-BlueMRF, or SOLR from Stratagene or DH5 α , DH10B, or ElectroMAX DH10B from Life Technologies.

25 II. Isolation of cDNA Clones

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

Alternatively, plasmid DNA was amplified from host cell lysates using direct link PCR in a

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

III. Sequencing and Analysis

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

The polynucleotide sequences derived from Incyte cDNAs were validated by removing vector, linker, and poly(A) sequences and by masking ambiguous bases, using algorithms and programs based on BLAST, dynamic programming, and dinucleotide nearest neighbor analysis. The Incyte cDNA sequences or translations thereof were then queried against a selection of public
25 databases such as the GenBank primate, rodent, mammalian, vertebrate, and eukaryote databases, and BLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOM; PROTEOME databases with sequences from Homo sapiens, Rattus norvegicus, Mus musculus, Caenorhabditis elegans, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, and Candida albicans (Incyte Genomics, Palo Alto CA); and hidden Markov model (HMM)-based protein family databases such as PFAM. (HMM is a probabilistic
30 approach which analyzes consensus primary structures of gene families. See, for example, Eddy, S.R. (1996) Curr. Opin. Struct. Biol. 6:361-365.) The queries were performed using programs based on BLAST, FASTA, BLIMPS, and HMMER. The Incyte cDNA sequences were assembled to produce full length polynucleotide sequences. Alternatively, GenBank cDNAs, GenBank ESTs, stitched

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

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

The programs described above for the assembly and analysis of full length polynucleotide and
25 polypeptide sequences were also used to identify polynucleotide sequence fragments from SEQ ID NO:10-18. Fragments from about 20 to about 4000 nucleotides which are useful in hybridization and amplification technologies are described in Table 4, column 2.

IV. Identification and Editing of Coding Sequences from Genomic DNA

Putative lipid-associated molecules were initially identified by running the Genscan gene
30 identification program against public genomic sequence databases (e.g., gbpri and gbhtg). Genscan is a general-purpose gene identification program which analyzes genomic DNA sequences from a variety of organisms (See Burge, C. and S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94, and Burge, C. and S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8:346-354). The program concatenates predicted exons to

WO 02/063005

PCT/US02/03813

form an assembled cDNA sequence extending from a methionine to a stop codon. The output of Genscan is a FASTA database of polynucleotide and polypeptide sequences. The maximum range of sequence for Genscan to analyze at once was set to 30 kb. To determine which of these Genscan predicted cDNA sequences encode lipid-associated molecules, the encoded polypeptides were

5 analyzed by querying against PFAM models for lipid-associated molecules. Potential lipid-associated molecules were also identified by homology to Incyte cDNA sequences that had been annotated as lipid-associated molecules. These selected Genscan-predicted sequences were then compared by BLAST analysis to the *genpept* and *gbpri* public databases. Where necessary, the Genscan-predicted sequences were then edited by comparison to the top BLAST hit from *genpept* to correct errors in the

10 sequence predicted by Genscan, such as extra or omitted exons. BLAST analysis was also used to find any Incyte cDNA or public cDNA coverage of the Genscan-predicted sequences, thus providing evidence for transcription. When Incyte cDNA coverage was available, this information was used to correct or confirm the Genscan predicted sequence. Full length polynucleotide sequences were obtained by assembling Genscan-predicted coding sequences with Incyte cDNA sequences and/or

15 public cDNA sequences using the assembly process described in Example III. Alternatively, full length polynucleotide sequences were derived entirely from edited or unedited Genscan-predicted coding sequences.

V. Assembly of Genomic Sequence Data with cDNA Sequence Data

"Stitched" Sequences

20 Partial cDNA sequences were extended with exons predicted by the Genscan gene identification program described in Example IV. Partial cDNAs assembled as described in Example III were mapped to genomic DNA and parsed into clusters containing related cDNAs and Genscan exon predictions from one or more genomic sequences. Each cluster was analyzed using an algorithm based on graph theory and dynamic programming to integrate cDNA and genomic information,

25 generating possible splice variants that were subsequently confirmed, edited, or extended to create a full length sequence. Sequence intervals in which the entire length of the interval was present on more than one sequence in the cluster were identified, and intervals thus identified were considered to be equivalent by transitivity. For example, if an interval was present on a cDNA and two genomic sequences, then all three intervals were considered to be equivalent. This process allows unrelated

30 but consecutive genomic sequences to be brought together, bridged by cDNA sequence. Intervals thus identified were then "stitched" together by the stitching algorithm in the order that they appear along their parent sequences to generate the longest possible sequence, as well as sequence variants. Linkages between intervals which proceed along one type of parent sequence (cDNA to cDNA or

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

“Stretched” Sequences

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

VI. Chromosomal Mapping of LIPAM Encoding Polynucleotides

The sequences which were used to assemble SEQ ID NO:10-18 were compared with
20 sequences from the Incyte LIFESEQ database and public domain databases using BLAST and other implementations of the Smith-Waterman algorithm. Sequences from these databases that matched SEQ ID NO:10-18 were assembled into clusters of contiguous and overlapping sequences using assembly algorithms such as Phrap (Table 7). Radiation hybrid and genetic mapping data available
25 from public resources such as the Stanford Human Genome Center (SHGC), Whitehead Institute for Genome Research (WIGR), and Généthon were used to determine if any of the clustered sequences had been previously mapped. Inclusion of a mapped sequence in a cluster resulted in the assignment of all sequences of that cluster, including its particular SEQ ID NO., to that map location.

Map locations are represented by ranges, or intervals, of human chromosomes. The map
30 position of an interval, in centiMorgans, is measured relative to the terminus of the chromosome’s p-arm. (The centiMorgan (cM) is a unit of measurement based on recombination frequencies between chromosomal markers. On average, 1 cM is roughly equivalent to 1 megabase (Mb) of DNA in humans, although this can vary widely due to hot and cold spots of recombination.) The cM distances

WO 02/063005

PCT/US02/03813

are based on genetic markers mapped by Généthon which provide boundaries for radiation hybrid markers whose sequences were included in each of the clusters. Human genome maps and other resources available to the public, such as the NCBI "GeneMap'99" World Wide Web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>), can be employed to determine if previously identified disease genes map within or in proximity to the intervals indicated above.

VII. Analysis of Polynucleotide Expression

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

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

The basis of the search is the product score, which is defined as:

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

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

Alternatively, polynucleotide sequences encoding LIPAM are analyzed with respect to the

WO 02/063005

PCT/US02/03813

tissue sources from which they were derived. For example, some full length sequences are assembled, at least in part, with overlapping Incyte cDNA sequences (see Example III). Each cDNA sequence is derived from a cDNA library constructed from a human tissue. Each human tissue is classified into one of the following organ/tissue categories: cardiovascular system; connective tissue; 5 digestive system; embryonic structures; endocrine system; exocrine glands; genitalia, female; genitalia, male; germ cells; hemic and immune system; liver; musculoskeletal system; nervous system; pancreas; respiratory system; sense organs; skin; stomatognathic system; unclassified/mixed; or urinary tract. The number of libraries in each category is counted and divided by the total number of libraries across all categories. Similarly, each human tissue is classified into one of the following 10 disease/condition categories: cancer, cell line, developmental, inflammation, neurological, trauma, cardiovascular, pooled, and other, and the number of libraries in each category is counted and divided by the total number of libraries across all categories. The resulting percentages reflect the tissue- and disease-specific expression of cDNA encoding LIPAM. cDNA sequences and cDNA library/tissue information are found in the LIFESEQ GOLD database (Incyte Genomics, Palo Alto CA).

15 VIII. Extension of LIPAM Encoding Polynucleotides

Full length polynucleotide sequences were also produced by extension of an appropriate fragment of the full length molecule using oligonucleotide primers designed from this fragment. One primer was synthesized to initiate 5' extension of the known fragment, and the other primer was synthesized to initiate 3' extension of the known fragment. The initial primers were designed using 20 OLIGO 4.06 software (National Biosciences), or another appropriate program, to be about 22 to 30 nucleotides in length, to have a GC content of about 50% or more, and to anneal to the target sequence at temperatures of about 68°C to about 72°C. Any stretch of nucleotides which would result in hairpin structures and primer-primer dimerizations was avoided.

Selected human cDNA libraries were used to extend the sequence. If more than one 25 extension was necessary or desired, additional or nested sets of primers were designed.

High fidelity amplification was obtained by PCR using methods well known in the art. PCR was performed in 96-well plates using the PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Inc.). The reaction mix contained DNA template, 200 nmol of each primer, reaction buffer containing Mg^{2+} , $(NH_4)_2SO_4$, and 2-mercaptoethanol, Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech), ELONGASE 30 enzyme (Life Technologies), and Pfu DNA polymerase (Stratagene), with the following parameters for primer pair PCI A and PCB: Step 1: 94°C, 3 min; Step 2: 94°C, 15 sec; Step 3: 60°C, 1 min; Step 4: 68°C, 2 min; Step 5: Steps 2, 3, and 4 repeated 20 times; Step 6: 68°C, 5 min; Step 7: storage at 4°C. In the alternative, the parameters for primer pair T7 and SK+ were as follows: Step 1: 94°C,

WO 02/063005

PCT/US02/03813

3 min; Step 2: 94°C, 15 sec; Step 3: 57°C, 1 min; Step 4: 68°C, 2 min; Step 5: Steps 2, 3, and 4 repeated 20 times; Step 6: 68°C, 5 min; Step 7: storage at 4°C.

The concentration of DNA in each well was determined by dispensing 100 µl PICOGREEN quantitation reagent (0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR) dissolved in 1X TE and 0.5 µl of undiluted PCR product into each well of an opaque fluorimeter plate (Corning Costar, Acton MA), allowing the DNA to bind to the reagent. The plate was scanned in a Fluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) to measure the fluorescence of the sample and to quantify the concentration of DNA. A 5 µl to 10 µl aliquot of the reaction mixture was analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel to determine which reactions were successful in extending the sequence.

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

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

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

IX. Identification of Single Nucleotide Polymorphisms in LIPAM Encoding

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Polynucleotides

Common DNA sequence variants known as single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in SEQ ID NO:10-18 using the LIFSEQ database (Incyte Genomics). Sequences from the same gene were clustered together and assembled as described in Example III, allowing the
5 identification of all sequence variants in the gene. An algorithm consisting of a series of filters was used to distinguish SNPs from other sequence variants. Preliminary filters removed the majority of basecall errors by requiring a minimum Phred quality score of 15, and removed sequence alignment errors and errors resulting from improper trimming of vector sequences, chimeras, and splice variants. An automated procedure of advanced chromosome analysis analysed the original chromatogram files
10 in the vicinity of the putative SNP. Clone error filters used statistically generated algorithms to identify errors introduced during laboratory processing, such as those caused by reverse transcriptase, polymerase, or somatic mutation. Clustering error filters used statistically generated algorithms to identify errors resulting from clustering of close homologs or pseudogenes, or due to contamination by non-human sequences. A final set of filters removed duplicates and SNPs found in immunoglobulins
15 or T-cell receptors.

Certain SNPs were selected for further characterization by mass spectrometry using the high throughput MASSARRAY system (Sequenom, Inc.) to analyze allele frequencies at the SNP sites in four different human populations. The Caucasian population comprised 92 individuals (46 male, 46 female), including 83 from Utah, four French, three Venezuelan, and two Amish individuals. The
20 African population comprised 194 individuals (97 male, 97 female), all African Americans. The Hispanic population comprised 324 individuals (162 male, 162 female), all Mexican Hispanic. The Asian population comprised 126 individuals (64 male, 62 female) with a reported parental breakdown of 43% Chinese, 31% Japanese, 13% Korean, 5% Vietnamese, and 8% other Asian. Allele frequencies were first analyzed in the Caucasian population; in some cases those SNPs which showed
25 no allelic variance in this population were not further tested in the other three populations.

X. Labeling and Use of Individual Hybridization Probes

Hybridization probes derived from SEQ ID NO:10-18 are employed to screen cDNAs, genomic DNAs, or mRNAs. Although the labeling of oligonucleotides, consisting of about 20 base
30 pairs, is specifically described, essentially the same procedure is used with larger nucleotide fragments. Oligonucleotides are designed using state-of-the-art software such as OLIGO 4.06 software (National Biosciences) and labeled by combining 50 pmol of each oligomer, 250 μ Ci of [γ - 32 P] adenosine triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech), and T4 polynucleotide kinase (DuPont NEN, Boston MA). The labeled oligonucleotides are substantially purified using a

WO 02/063005

PCT/US02/03813

SEPHADEX G-25 superfine size exclusion dextran bead column (Amersham Pharmacia Biotech). An aliquot containing 10^7 counts per minute of the labeled probe is used in a typical membrane-based hybridization analysis of human genomic DNA digested with one of the following endonucleases: Ase I, Bgl II, Eco RI, Pst I, Xba I, or Pvu II (DuPont NEN).

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

XI. Microarrays

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

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Tissue or Cell Sample Preparation

Total RNA is isolated from tissue samples using the guanidinium thiocyanate method and poly(A)⁺ RNA is purified using the oligo-(dT) cellulose method. Each poly(A)⁺ RNA sample is reverse transcribed using MMLV reverse-transcriptase, 0.05 pg/ μ l oligo-(dT) primer (21mer), 1X first strand buffer, 0.03 units/ μ l RNase inhibitor, 500 μ M dATP, 500 μ M dGTP, 500 μ M dTTP, 40 μ M dCTP, 40 μ M dCTP-Cy3 (BDS) or dCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech). The reverse transcription reaction is performed in a 25 ml volume containing 200 ng poly(A)⁺ RNA with GEMBRIGHT kits (Incyte). Specific control poly(A)⁺ RNAs are synthesized by *in vitro* transcription from non-coding yeast genomic DNA. After incubation at 37°C for 2 hr, each reaction sample (one with Cy3 and another with Cy5 labeling) is treated with 2.5 ml of 0.5M sodium hydroxide and incubated for 20 minutes at 85°C to the stop the reaction and degrade the RNA. Samples are purified using two successive CHROMA SPIN 30 gel filtration spin columns (CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA) and after combining, both reaction samples are ethanol precipitated using 1 ml of glycogen (1 mg/ml), 60 ml sodium acetate, and 300 ml of 100% ethanol. The sample is then dried to completion using a SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY) and resuspended in 14 μ l 5X SSC/0.2% SDS.

Microarray Preparation

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

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

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

Microarrays are UV-crosslinked using a STRATALINKER UV-crosslinker (Stratagene).

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

5 **Hybridization**

Hybridization reactions contain 9 μ l of sample mixture consisting of 0.2 μ g each of Cy3 and Cy5 labeled cDNA synthesis products in 5X SSC, 0.2% SDS hybridization buffer. The sample mixture is heated to 65° C for 5 minutes and is aliquoted onto the microarray surface and covered with an 1.8 cm² coverslip. The arrays are transferred to a waterproof chamber having a cavity just slightly larger than a microscope slide. The chamber is kept at 100% humidity internally by the addition of 140 μ l of 5X SSC in a corner of the chamber. The chamber containing the arrays is incubated for about 6.5 hours at 60° C. The arrays are washed for 10 min at 45° C in a first wash buffer (1X SSC, 0.1% SDS), three times for 10 minutes each at 45° C in a second wash buffer (0.1X SSC), and dried.

Detection

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

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

25 The sensitivity of the scans is typically calibrated using the signal intensity generated by a cDNA control species added to the sample mixture at a known concentration. A specific location on the array contains a complementary DNA sequence, allowing the intensity of the signal at that location to be correlated with a weight ratio of hybridizing species of 1:100,000. When two samples from different sources (e.g., representing test and control cells), each labeled with a different fluorophore,

WO 02/063005

PCT/US02/03813

are hybridized to a single array for the purpose of identifying genes that are differentially expressed, the calibration is done by labeling samples of the calibrating cDNA with the two fluorophores and adding identical amounts of each to the hybridization mixture.

The output of the photomultiplier tube is digitized using a 12-bit RTI-835H analog-to-digital (A/D) conversion board (Analog Devices, Inc., Norwood MA) installed in an IBM-compatible PC computer. The digitized data are displayed as an image where the signal intensity is mapped using a linear 20-color transformation to a pseudocolor scale ranging from blue (low signal) to red (high signal). The data is also analyzed quantitatively. Where two different fluorophores are excited and measured simultaneously, the data are first corrected for optical crosstalk (due to overlapping emission spectra) between the fluorophores using each fluorophore's emission spectrum.

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

For example, component 1824717_HGG4 of SEQ ID NO:15 showed differential expression in tissue affected by cancer versus normal tissue, as determined by microarray analysis. Matched samples of normal lung tissue and lung tissue affected by squamous cell carcinoma, and matched samples of normal lung tissue and lung tissue affected by adenocarcinoma, were provided by the Roy Castle International Center for Lung Cancer Research (Liverpool, UK). The expression of component 1824717_HGG4 was altered in lung tissue affected by squamous cell carcinoma and in lung tissue affected by adenocarcinoma. Therefore, SEQ ID NO:15 is useful in diagnostic assays for cancer.

XII. Complementary Polynucleotides

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

XIII. Expression of LIPAM

Expression and purification of LIPAM is achieved using bacterial or virus-based expression

WO 02/063005

PCT/US02/03813

systems. For expression of LIPAM in bacteria, cDNA is subcloned into an appropriate vector containing an antibiotic resistance gene and an inducible promoter that directs high levels of cDNA transcription. Examples of such promoters include, but are not limited to, the *trp-lac* (*tac*) hybrid promoter and the T5 or T7 bacteriophage promoter in conjunction with the *lac* operator regulatory element. Recombinant vectors are transformed into suitable bacterial hosts, e.g., BL21(DE3). Antibiotic resistant bacteria express LIPAM upon induction with isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Expression of LIPAM in eukaryotic cells is achieved by infecting insect or mammalian cell lines with recombinant *Autographica californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV), commonly known as baculovirus. The nonessential polyhedrin gene of baculovirus is replaced with cDNA encoding LIPAM by either homologous recombination or bacterial-mediated transposition involving transfer plasmid intermediates. Viral infectivity is maintained and the strong polyhedrin promoter drives high levels of cDNA transcription. Recombinant baculovirus is used to infect *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells in most cases, or human hepatocytes, in some cases. Infection of the latter requires additional genetic modifications to baculovirus. (See Engelhard, E.K. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. et al. (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.)

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

XIV. Functional Assays

LIPAM function is assessed by expressing the sequences encoding LIPAM at physiologically elevated levels in mammalian cell culture systems. cDNA is subcloned into a mammalian expression vector containing a strong promoter that drives high levels of cDNA expression. Vectors of choice include PCMV SPORT (Life Technologies) and PCR3.1 (Invitrogen, Carlsbad CA), both of which

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

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

XV. Production of LIPAM Specific Antibodies

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

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

described in the art. (See, e.g., Ausubel, 1995, supra, ch. 11.)

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

10 XVI. Purification of Naturally Occurring LIPAM Using Specific Antibodies

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

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

XVII. Identification of Molecules Which Interact with LIPAM

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

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

LIPAM may also be used in the PATHCALLING process (CuraGen Corp., New Haven CT) which employs the yeast two-hybrid system in a high-throughput manner to determine all interactions between the proteins encoded by two large libraries of genes (Nandabalan, K. et al. (2000) U.S.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Patent No. 6,057,101).

XVIII. Demonstration of LIPAM Activity

Selected candidate lipid molecules, such as C4 sterols, oxysterol, apolipoprotein E, and phospholipids, are arrayed in the wells of a multi-well plate. LIPAM, or biologically active fragments thereof, are labeled with ¹²⁵I Bolton-Hunter reagent. (See, e.g., Bolton A.E. and W.M. Hunter (1973) *Biochem. J.* 133:529-539.) The selected candidate lipid molecules are incubated with the labeled LIPAM and washed. Any wells with labeled LIPAM complex are assayed. Data obtained using different concentrations of LIPAM are used to calculate values for the number, affinity, and association of LIPAM with the candidate molecules. Significant binding of LIPAM to the candidate lipid molecules is indicative of LIPAM activity.

In the alternative, LIPAM activity is determined in a continuous fluorescent transfer assay using as substrate 1-palmitoyl-2-pyrenyldecanoyl-phosphatidylinositol (Phy(10)PI). The assay measures the increase of pyrene monomer fluorescence intensity as a result of the transfer of pyrenylacyl (Pyr(x))-labeled phospholipid from quenched donor vesicles to unquenched acceptor vesicles (Van Paridon et al. (1988) *Biochemistry* 27:6208-6214). Donor vesicles consist of Pyr(x) phosphatidylinositol (Pyr(x)PI), 2,4,6-trinitrophenylphosphatidylethanolamine (TNP-PE) and egg phosphatidylcholine (PC) in a mol % ratio of 10:10:80 (2 nmol of total phospholipid). Acceptor vesicles consist of phosphatidic acid (PA) and egg PC in a mol % ratio of 5:95 (25-fold excess of total phospholipid). The reaction is carried out in 2 ml of 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl (pH 7.4) containing 0.1 mg of BSA at 37°C. The reaction is initiated by the addition of 10-50 µl of LIPAM. Measurements are performed using a fluorimeter equipped with a thermostated cuvette holder and a stirring device. The initial slope of the progress curve is taken as an arbitrary unit of transfer activity (van Tiel, C.M. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:21532-21538; Westerman, J. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:14263-14266).

In the alternative, LIPAM activity is determined by measuring the rate of incorporation of a radioactive fatty acid precursor into fatty acyl-CoA. The final reaction contains 200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5 mM ATP, 8 mM MgCl₂, 2mM EDTA, 20 mM NaF, 0.1% Triton X-100, 10 mM [³H]oleate, [³H]myristate or [¹⁴C]decanoate, 0.5 mM coenzyme A, and LIPAM in a total volume of 0.5 ml. The reaction is initiated with the addition of coenzyme A, incubated at 35 °C for 10 min, and terminated by the addition of 2.5 ml of isopropyl alcohol, n-heptane, 1 M H₂SO₄ (40:10:1). Radioactive fatty acid is removed by organic extraction using n-heptane. Fatty acyl-CoA formed during the reaction remains in the aqueous fraction and is quantified by scintillation counting (Black, P.N. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 4896-4904).

WO 02/063005

PCT/US02/03813

In the alternative, LIPAM activity is determined by measuring the degradation of the sphingolipid glucosylceramide. 25-50 microunits glucocerebrosidase are incubated with varying concentrations of LIPAM in a 40 μ l reaction at 37 °C for 20 min. The final reaction contains 50mM sodium citrate pH 4.5, 20 ng human serum albumin, and 3.125 mM lipids in the form of liposomes, which contain lipids in the following proportions: [¹⁴C]glucosylceramide (3 mol %, 2.4 Ci/mol), cholesterol (23 mol %), phosphatidic acid (20 mol %), phosphatidylcholine (54 mol %). The reaction is stopped by the addition of 160 μ l chloroform/methanol (2:1) and 20 μ l 0.1% glucose, and shaking. After centrifugation at 4000 rpm, enzymatically released [¹⁴C]glucose in the aqueous phase is measured in a scintillation counter. LIPAM activity is determined by its effect on increasing the rate of glucosylceramide hydrolysis by glucocerebrosidase (Wilkening, G. et al. J. Biol. Chem. (1998) 273:30271-30278).

In the alternative, LIPAM activity can be demonstrated by an *in vitro* hydrolysis assay with vesicles containing 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]oleoyl phosphatidylcholine (Sigma-Aldrich). LIPAM triglyceride lipase activity and phospholipase A₂ activity are demonstrated by analysis of the cleavage products isolated from the hydrolysis reaction mixture.

Vesicles containing 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]oleoyl phosphatidylcholine (Amersham Pharmacia Biotech.) are prepared by mixing 2.0 μ Ci of the radiolabeled phospholipid with 12.5 mg of unlabeled 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine and drying the mixture under N₂. 2.5 ml of 150 mM Tris-HCl, pH 7.5, is added, and the mixture is sonicated and centrifuged. The supernatant may be stored at 4 °C. The final reaction mixtures contain 0.25 ml of Hanks buffered salt solution supplemented with 2.0 mM taurochenodeoxycholate, 1.0% bovine serum albumin, 1.0 mM CaCl₂, pH 7.4, 150 μ g of 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]oleoyl phosphatidylcholine vesicles, and various amounts of LIPAM diluted in PBS. After incubation for 30 min at 37 °C, 20 μ g each of lyso-phosphatidylcholine and oleic acid are added as carriers and each sample is extracted for total lipids. The lipids are separated by thin layer chromatography using a two solvent system of chloroform:methanol:acetic acid:water (65:35:8:4) until the solvent front is halfway up the plate. The process is then continued with hexane:ether:acetic acid (86:16:1) until the solvent front is at the top of the plate. The lipid-containing areas are visualized with I₂ vapor; the spots are scraped, and their radioactivity is determined by scintillation counting. The amount of radioactivity released as fatty acids will increase as a greater amount of LIPAM is added to the assay mixture while the amount of radioactivity released as lysophosphatidylcholine will remain low. This demonstrates that LIPAM cleaves at the sn-2 and not the sn-1 position, as is characteristic of phospholipase A₂ activity.

In the alternative, phospholipase activity of LIPAM is measured by the hydrolysis of a fatty

WO 02/063005

PCT/US02/03813

acyl residue at the sn-1 position of phosphatidylserine. LIPAM is combined with the tritium [³H] labeled substrate phosphatidylserine at stoichiometric quantities in a suitable buffer. Following an appropriate incubation time, the hydrolyzed reaction products are separated from the substrates by chromatographic methods. The amount of acylglycerophosphoserine produced is measured by counting tritiated product with the help of a scintillation counter. Various control groups are set up to account for background noise and unincorporated substrate. The final counts represent the tritiated enzyme product [³H]-acylglycerophosphoserine, which is directly proportional to the activity of LIPAM in biological samples.

Lipoxygenase activity of LIPAM can be measured by chromatographic methods. Extracted LIPAM lipoxygenase protein is incubated with 100 μM [¹⁴C] arachidonic acid or other unlabeled fatty acids at 37°C for 30 min. After the incubation, stop solution (acetonitrile:methanol:water, 350:150:1) is added. The samples are extracted and analyzed by reverse-phase HPLC using a solvent system of methanol/water/acetic acid, 85:15:0.01 (vol/vol) at a flow rate of 1 ml/min. The effluent is monitored at 235 nm and analyzed for the presence of the major arachidonic metabolite such as 12-HPETE (catalyzed by 12-LOX). The fractions are also subjected to liquid scintillation counting. The final counts represent the products, which is directly proportional to the activity of LIPAM in biological samples. For stereochemical analysis, the metabolites of arachidonic acid are analyzed further by chiral phase-HPLC and by mass spectrometry (Sun, D. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:33540-33547).

Sialidase activity of LIPAM is assayed using various substrates, including but not limited to 2'-(4-methylumbelliferyl)α-D-N-acetylneuramic acid, 2'-O-(o-nitrophenyl)α-D-N-acetylneuramic acid, 2'-O-(p-nitrophenyl)α-D-N-acetylneuramic acid, and α(2-3)- and α(2-6)-sialyllactose. The reaction mixture contains 30 nmol substrate, 0.2 mg bovine serum albumin, 10 μmol sodium acetate (pH 4.6), 0.2 mg Triton X-100, and purified LIPAM (or a sample containing LIPAM). Following incubation at 37° C for 10-30 min, the released sialic acid is quantified using the thiobarbituric acid method (Aminoff, D. (1961) Biochem. J. 81:384-392). One unit of sialidase activity is defined as the amount of LIPAM that catalyzes the release of 1 nmol of sialic acid from substrate per hour (Hasegawa, T. et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:8007-8015).

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

to those skilled in molecular biology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Table 1

Incyte Project ID	Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Polynucleotide ID
7472774	1	7472774CD1	10	7472774CB1
2884821	2	2884821CD1	11	2884821CB1
72852842	3	72852842CD1	12	72852842CB1
7484271	4	7484271CD1	13	7484271CB1
7474074	5	7474074CD1	14	7474074CB1
72024970	6	72024970CD1	15	72024970CB1
6131380	7	6131380CD1	16	6131380CB1
643681	8	643681CD1	17	643681CB1
6897474	9	6897474CD1	18	6897474CB1

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Table 2

Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	GenBank ID NO:	Probability Score	GenBank Homolog
1	7472774CD1	g4866978	1.6E-161	[Homo sapiens] cytosolic phospholipase A2 beta; cytochrome b5, C. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:17063-17066
2	2884821CD1	g14669826	0.0	[Alpoidia sp.] phospholipase C delta-1 [Lee, W. K. et al. (2003) FEBS Lett. 498:16-21]
3	72852842CD1	g4894788	2.5E-126	[Mus musculus] phospholipase C delta-1 [Lee, W. K. et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 261:393-399]
4	7484271CD1	g2138183	2.7E-11	[Mus musculus] polycystic kidney disease 1 protein [Lohning, C. et al. (1997) Mann. Genome 6:307-311]
5	7474074CD1	g4090960	3.1E-63	[Homo sapiens] phosphatidylserine-specific phospholipase A1 [Kagari, Y. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:11053-11059]
6	72024970CD1	g13560384	1.0E-109	[Saccharomyces cerevisiae] phospholipase C-1 [Otsuki, M. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:97-103]
7	6131380CD1	g5771350	0.0	[Mus musculus] M-Rgp2 retinal degeneration protein B subtype 2 [Lu, C. et al. (1999) J. Neurosci. 19:7317-7325]
8	643661CD1	g452870	1.2E-36	[Mus musculus] membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein [Akawa, Y. et al. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. 236:559-564]
9	6897474CD1	g6651241	3.8E-188	[Homo sapiens] lipopolysaccharide specific response-68 protein

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Table 3

SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
1	7472774CD1	996	S34 S46 S54 S133 S151 S169 S183 S219 S273 S294 S418 S557 S652 S662 S769 S928 T17 T21 T87 T104 T227 T248 T366 T603 T722 T775 T808 T916 T952 Y38 T664	N201 N362 N718 N834 N914	Transmembrane domains: E276-L30L, S696-S720 N Terminus JS CYCLOSILIC CYTOSOLIC PHOSPHOLIPASE A2 CPLA2 INCLUDES: PHOSPHATIDYLCHOLINE 2 ACLYLHYDROLASE LYSOPHOSPHOLIPASE HYDROLASE LIPID PD014471: G342-L711, G612-N914	TRAP
2	2884821CD1	372	S2 S30 S57 S145 S229 S238 S352 T38 T96 T104 T148 T163 T178 T240 T292 T313 T369		SYNTHETASE LIPOIC ACID LIPSON LIPONATE IRON/SULFUR SYNTHASE PRECURSOR MITOCHONDRIAL PRESENT: PD05849: L80-D135 PD009028: G311-E357 GG SYNTHETASE; LIPOIC; ACID; BL0547885275 [79-413: K36-K370 D082726 [E34963] [1-210: L74-K355 D082726 [E34943] [1-320: L74-K355 D082726 [P25845] [1-320: K65-K355 Cell attachment sequence: R217-D219 C2 domain: E355-E313	BLAST- PRODOM
3	7285282CD1	649	S313 S419 S429 S542 S574 T244 T56 T667 T820 T287 T303	N417 N578	phosphatidylinositol-specific phospholipase C. A domain: D136-K300	NCITFS HMMER-PPM HMMER-PPM

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
3	7484271CD1	2020	T381 T397 T440 T452 Y526		Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, Y domain: A389-R506 phosphatidylinositol-specific phospholipase signature BL50007: L161-G206, T220-Q237, L284-K300, E439-G480, Q600-L636 Phospholipase C signature PR00390: P160-Q178, W186-G206, T283-K300, I444-W465, W465-M483, L614-R624 PHOSPHOLIPASE C PHOSPHODIESTERASE HYDROLASE PHOSPHATIDYLINOSITOL SBISPHOSPHATE LIPID DEGRADATION TRANSDUCER PHOSPHOINOSITIDESPECIFIC: PD001214: D156-K300 PD001202: E390-R506 PHOSPHOLIPASE PHOSPHATIDYLINOSITOL4 SBISPHOSPHATE PHOSPHODIESTERASE HYDROLASE LIPID DEGRADATION TRANSDUCER C CALCIUMBINDING: PD004439: R4-Q155 1-PHOSPHATIDYLINOSITOL-4, 5-BISPHOSPHATE PHOSPHODIESTERASE D: DM00855 P51L78 64-472: W5-E312 DM00712 P51L78 474-754: K378-V645 DM00855 A48047 58-521: R47-S350 DM00855 P10894 E2-503: R47-D328 PLAV/LH2 [Polycystin-1, Lipoxigenase, Alpha-Toxin/Lipoxigenase homology] domain: N769-E886, T1632-F1749, F431-Y550, Y522-L1039, V1901-L2016, I43-Y159, V1207-R1322, A300-L419, V1505-C1620, V561-E677, F172-M286, V1053-L1177, I1374-R1489, T1763-E1883	HMWER-PPAM BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-DOMO HMWER-PPAM

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
4			S960 S965 S1139 S1167 S1192 S1312 S1339 S1349 S1406 S1424 S1535 S1578 S1607 S1715 S1723 S1737 S1739 S1800 T16 T292 T360 T427 T462 T636 T827 T949 T963 T996 T1092 T1166 T1173 T1184 T1250 T1298 T1382 T1487 T1745 T1763 T1840 T1882 T1884 T1909 T1932 T1950 T2012 T1771 T1796 T1180 M1325 T1429	N1790 N1799 N1988	Transmembrane domains: L31-D53, A1071-R1095, T1487-W1512 N terminus is non-cytosolic PROTEIN FOLYCYSTIC KIDNEY DISEASE REPEAT TRANSMEMBRANE POLYCYSTIN PRECURSOR AUTOSOMAL DOMINANT: ED010179: Y1634-K1793 Cell attachment sequence: R1462-D1484, R2007-S2009 ATP/GTP-binding site motif A (P-loop): G1239-S1246	TMAP BLAST-PRODOM MOTIFS MOTIFS
5	7474074CD1	415	S145 S161 S232 S311 T327 T364 T135 T304 T371 T411	N18 N351	signal cleavage: M1-S43 ligase: M1-L275 Transmembrane domains: D106-T134, T278-R306 N terminus is non-cytosolic	SFSCAN HMMER-PFAM TMAP

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
5					Lipases, serine proteases BL00120: N62-I76, D106-S120, Y183-C193 Triacylglycerol lipase family signature PR00821: N107-K125, C206-T221, N19-X38, I64-R79 Vespid venom allergen phospholipase A1 signature PR00825: P148-H165, L171-P191 LIPASE PRECURSOR SIGNAL HYDROLASE LIPID DEGRADATION GLYCOPROTEIN PANCREATIC PROTEIN PANCREAS: PD001492: N6-L314	BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS BLIMPS-PRINTS BLAST-PRODOM BLAST-DOMO
6	72024970C01	1152	S79 S91 S124 S154 S186 S235 S276 S350 S445 S483 S487 S543 S550 S558 S565 S577 S584 S591 S649 S681 S681 S918 S932 S980 S1100 S1111 T134 T173 T236 T387 T504 T512 T615	N290 N303 N472 N534	PH domain: A44-N151 Phosphatidylinositol-specific phospholipase: D323-K468, A621-C736 EF hand: W159-L197, E205-M234 Phosphatidylinositol-specific phospholipase X-box domain protein BL50007: F669-G710, D835-I871, L328-G373, T387-Q424, L452-K468 C2 domain signature PR00360: R777-I789, N807-N820, V829-D837 Phospholipase C signature PR00390: P327-Q345, D353-G373, T451-K468, L674-W695, W695-L713, L849-R859	HMMER-PFAM HMMER-PFAM HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS BLIMPS-PRINTS

Table 4

Polynucleotide SEQ ID NO./ Incyte ID/ Sequence Length	Sequence Fragments		
	10/747274CBI/	3879	
11/2084821CBI/ 1623	1-326, 1-588, 310-588, 463-2162, 665-811, 1490-2112, 1491-1672, 1491-1787, 1491-1823,	1491-1889, 1491-1929, 1491-1972, 1491-2022, 1491-2065, 1491-2119, 1491-2170,	
	1491-2190, 1491-2236, 1491-2280, 1491-2320, 1491-2365, 1491-2405, 1491-2450, 1491-2497,	1491-2544, 1491-2588, 1491-2630, 1491-2675, 1491-2720, 1491-2765, 1491-2810, 1491-2855,	
	1491-2900, 1491-2945, 1491-2990, 1491-3035, 1491-3080, 1491-3125, 1491-3170, 1491-3215,	1491-3260, 1491-3305, 1491-3350, 1491-3395, 1491-3440, 1491-3485, 1491-3530, 1491-3575,	
	1491-3620, 1491-3665, 1491-3710, 1491-3755, 1491-3800, 1491-3845, 1491-3890, 1491-3935,	1491-3980, 1491-4025, 1491-4070, 1491-4115, 1491-4160, 1491-4205, 1491-4250, 1491-4295,	
	1491-4340, 1491-4385, 1491-4430, 1491-4475, 1491-4520, 1491-4565, 1491-4610, 1491-4655,	1491-4700, 1491-4745, 1491-4790, 1491-4835, 1491-4880, 1491-4925, 1491-4970, 1491-5015,	
	1491-5060, 1491-5105, 1491-5150, 1491-5195, 1491-5240, 1491-5285, 1491-5330, 1491-5375,	1491-5420, 1491-5465, 1491-5510, 1491-5555, 1491-5600, 1491-5645, 1491-5690, 1491-5735,	
	1491-5780, 1491-5825, 1491-5870, 1491-5915, 1491-5960, 1491-6005, 1491-6050, 1491-6095,	1491-6140, 1491-6185, 1491-6230, 1491-6275, 1491-6320, 1491-6365, 1491-6410, 1491-6455,	
	1491-6500, 1491-6545, 1491-6590, 1491-6635, 1491-6680, 1491-6725, 1491-6770, 1491-6815,	1491-6860, 1491-6905, 1491-6950, 1491-6995, 1491-7040, 1491-7085, 1491-7130, 1491-7175,	
	1491-7220, 1491-7265, 1491-7310, 1491-7355, 1491-7400, 1491-7445, 1491-7490, 1491-7535,	1491-7580, 1491-7625, 1491-7670, 1491-7715, 1491-7760, 1491-7805, 1491-7850, 1491-7895,	
	1491-7940, 1491-7985, 1491-8030, 1491-8075, 1491-8120, 1491-8165, 1491-8210, 1491-8255,	1491-8300, 1491-8345, 1491-8390, 1491-8435, 1491-8480, 1491-8525, 1491-8570, 1491-8615,	
	1491-8660, 1491-8705, 1491-8750, 1491-8795, 1491-8840, 1491-8885, 1491-8930, 1491-8975,	1491-9020, 1491-9065, 1491-9110, 1491-9155, 1491-9200, 1491-9245, 1491-9290, 1491-9335,	
12/72852842CBI/ 2199	1-445, 1-560, 1-675, 336-1614, 1197-1839, 1200-1840, 1249-1569, 1249-1573, 1251-1569,	1251-1573, 1288-1569, 1288-1573, 1300-2058, 1335-2135, 1343-1818, 1383-2137, 1551-1814,	
	1551-2164, 1577-2137, 1583-1835, 1727-2137, 1734-2197, 1758-2198, 1765-2197, 1768-2137,	1769-2197, 1791-2137, 1798-2137, 1851-2137, 2004-2137, 2004-2199, 2042-2137, 2058-2197,	
	1-130, 1-131, 1-341, 1-522, 1-712, 922-131, 45-131, 34-129, 67-579, 69-91, 129-149,	129-150, 158-285, 158-288, 158-527, 158-652, 158-672, 179-648, 192-858, 193-684, 226-248,	
	227-248, 234-1071, 264-1071, 443-1071, 577-1071, 591-1071, 869-1267, 1177-1440, 1177-1693, 1321-,	565-1071, 568-1071, 574-1821, 1374-2040, 1377-1998, 1377-2040, 1613-1935, 1884-2040, 1889-,	
	2700, 1373-2040, 1374-1821, 1374-2040, 1377-1998, 1377-2040, 1613-1935, 1884-2040, 1889-,	2040, 1894-2040, 2061-2421, 2061-2504, 2061-2553, 2061-2570, 2061-2576, 2061-,	
	2528, 2061-2671, 2061-2674, 2061-2738, 2061-2812, 2062-2253, 2062-2448, 2062-2572, 2062-,	2580, 2062-2672, 2062-2674, 2062-2687, 2066-2639, 2129-2891, 2140-2639, 2145-2646, 2149-,	
	2674, 2152-2768, 2155-2674, 2156-2783, 2160-2778, 2196-2930, 2198-2918, 2212-2513, 2212-,	2639, 2212-2643, 2212-2656, 2212-2670, 2212-2683, 2212-2689, 2212-2700, 2218-,	
	2700, 2213-2904, 2234-2952, 2249-2700, 2251-2907, 2251-2912, 2266-2700, 2493-2964, 2494-,	2946, 2538-2700, 2553-2700, 2608-2700, 2691-3263, 2738-3245, 2741-3238, 2741-3263,	
	13/7484271CBI/ 6326	1-318, 52-352, 60-246, 60-318, 60-362, 60-371, 60-743, 61-307, 63-314, 63-341, 81-391,	88-366, 96-371, 99-725, 107-351, 111-803, 124-380, 168-791, 231-672, 269-905, 263-932,
		368-636, 381-610, 381-845, 389-658, 389-833, 420-1067, 471-698, 524-1054, 654-1087, 681-,	1236, 721-1285, 765-1317, 770-1271, 838-1233, 856-1078, 856-1245, 856-1321, 856-1512,
		879-1524, 952-1152, 1021-496, 1050-1623, 1076-1449, 1089-1623, 1136-1313, 1153-1595,	1182-1333
1-445, 1-560, 1-675, 336-1614, 1197-1839, 1200-1840, 1249-1569, 1249-1573, 1251-1569,		1251-1573, 1288-1569, 1288-1573, 1300-2058, 1335-2135, 1343-1818, 1383-2137, 1551-1814,	
1551-2164, 1577-2137, 1583-1835, 1727-2137, 1734-2197, 1758-2198, 1765-2197, 1768-2137,		1769-2197, 1791-2137, 1798-2137, 1851-2137, 2004-2137, 2004-2199, 2042-2137, 2058-2197,	
1-130, 1-131, 1-341, 1-522, 1-712, 922-131, 45-131, 34-129, 67-579, 69-91, 129-149,		129-150, 158-285, 158-288, 158-527, 158-652, 158-672, 179-648, 192-858, 193-684, 226-248,	
227-248, 234-1071, 264-1071, 443-1071, 577-1071, 591-1071, 869-1267, 1177-1440, 1177-1693, 1321-,		565-1071, 568-1071, 574-1821, 1374-2040, 1377-1998, 1377-2040, 1613-1935, 1884-2040, 1889-,	
2700, 1373-2040, 1374-1821, 1374-2040, 1377-1998, 1377-2040, 1613-1935, 1884-2040, 1889-,		2040, 1894-2040, 2061-2421, 2061-2504, 2061-2553, 2061-2570, 2061-2576, 2061-,	
2528, 2061-2671, 2061-2674, 2061-2738, 2061-2812, 2062-2253, 2062-2448, 2062-2572, 2062-,		2580, 2062-2672, 2062-2674, 2062-2687, 2066-2639, 2129-2891, 2140-2639, 2145-2646, 2149-,	
2674, 2152-2768, 2155-2674, 2156-2783, 2160-2778, 2196-2930, 2198-2918, 2212-2513, 2212-,		2639, 2212-2643, 2212-2656, 2212-2670, 2212-2683, 2212-2689, 2212-2700, 2218-,	
2700, 2213-2904, 2234-2952, 2249-2700, 2251-2907, 2251-2912, 2266-2700, 2493-2964, 2494-,		2946, 2538-2700, 2553-2700, 2608-2700, 2691-3263, 2738-3245, 2741-3238, 2741-3263,	

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Table 4 (cont.)

Polynucleotide SEQ ID NO./ Incyte ID/ Sequence Length	Sequence Fragments	
	13 (cont.)	
14/7474074CBI/ 1561	2741-3226, 2837-3362, 2837-3362, 2837-3368, 2837-3451, 2865-4748, 5870-3645, 2897-3573, 2893-3405, 2913-3489, 2916-3648, 2926-3548, 2932-3332, 2933-3642, 2937-3271, 2938-3648, 2943-3648, 2952-3648, 2975-3342, 2978-3439, 2986-3648, 2989-3648, 2999-3648, 3012-3648, 3032-3551, 3033-3606, 3037-3648, 3043-3648, 3059-3648, 3053-3641, 3074-3646, 3092-3648, 3103-3648, 3107-3644, 3111-3648, 3117-3648, 3125-3648, 3128-3648, 3132-3648, 3141-3648, 3145-3648, 3151-3648, 3157-3648, 3158-3648, 3159-3648, 3183-3648, 3249-3648, 3319-3648, 3479-3648, 3653-3951, 4338-6616, 4338-4865, 4397-4762, 4397-5019, 4464-5142, 4542-5043, 4633-5264, 4658-5249, 4722-5189, 4723-5280, 4798-5285, 4867-5400, 4890-5522, 4967-5582, 5024-5890, 5045-5079, 5045-5084, 5045-5091, 5048-5706, 5158-5713, 5178-5779, 5214-5890, 5240-5889, 5269-5815, 5275-5892, 5290-5929, 5363-5620, 5373-5951, 5381-5924, 5397-5747, 5478-6326, 5539-5915, 5801-6246, 5801-6298, 5801-6326, 5852-5898, 5855-5898, 5856-5898	
15/72024970CBI/ 4941	1-362, 132-1114, 260-322, 646-763, 646-897, 718-771, 718-856, 718-857, 718-859, 718-860, 770-1161, 1099-1561, 1100-1290, 1100-1556, 1100-1561, 1165-1561, 1273-1561, 1290-1559, 1302-1559, 1395-1556	
15/72024970CBI/ 4941	1-698, 1-722, 1-740, 1-744, 1-753, 1-762, 1-764, 1-818, 8-506, 109-686, 123-681, 160-756, 212-870, 281-804, 299-824, 338-862, 389-615, 418-1240, 426-1240, 428-822, 430-885, 431- 1240, 435-1019, 443-1240, 445-1094, 445-1107, 448-1240, 451-1138, 454-1000, 454-1240, 456-1240, 463-1056, 470-1019, 471-1019, 471-1240, 488-646, 488-1191, 488-1217, 488-1223, 488-1236, 488-1240, 491-1240, 511-1008, 516-958, 520-979, 532-1240, 534-1240, 538-1166, 541-1240, 548-1132, 571-1239, 578-1240, 582-1153, 607-1011, 607-1240, 622-1094, 626-1240, 634-1240, 637-1240, 639-666, 641-686, 645-1240, 654-946, 654-1198, 654-1199, 657-1240, 663-1240, 668-1240, 670-1240, 675-1240, 676-1240, 677-761, 682-1240, 684-1240, 685-1240, 696-1240, 703-1240, 728-1240, 736-1240, 737-1166, 744-1084, 747-1554, 754-1240, 798-1240, 807-1240, 812-1240, 823-1240, 831-1107, 852-1240, 854-1240, 873-1239, 873-1240, 877-1240, 903-1240, 909-1240, 910-1554, 912-1240, 913-1240, 915-1240, 928-1240, 941-1240, 949-1077, 949-1379, 949-1418, 949-1423, 949-1437, 949-1462, 949-1463, 949-1469, 949-1473, 949-1493, 950-1493, 951-1493, 955-1493, 956-1493, 982-1240, 982-1487, 988-1012, 988-1015, 988-1016, 990-1015, 994-1229, 994-1236, 994-1240, 996-1240, 996-1630, 1031-1493, 1090- 1631, 1090-1668, 1090-1670, 1096-1635, 1096-1689, 1100-1630, 1119-1548, 1134-1665, 1134- 1698, 1134-1734, 1157-1740, 1158-1687, 1158-1689, 1165-1771, 1237-1493, 1259-1391,	

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Table 5

Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Project ID	Representative Library
10	7472774CB1	MREPTX02
11	2884821CB1	TDYMN008
12	72852842CB1	TESNNO17
13	7484271CB1	BONREFC01
14	7474074CB1	UTRSMOR01
15	72024970CB1	LIVRTXS02
16	6131380CB1	NERDIDN03
17	643681CB1	PENITV01
18	6897474CB1	LIVRDMR01

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Table 6

Library	Vector	Library Description
BONRPEC01	P1NCY	This large size-fractionated library was constructed using RNA isolated from rib bone tissue removed from a Caucasian male fetus who died from Patau's syndrome (trisomy 13) at 20-weeks' gestation. Serologies were negative.
LIVRTRH01	PCDMA2.1	This random primed library was constructed using RNA isolated from liver tissue removed from a 62-year-old Caucasian female during partial hepatectomy and exploratory laparotomy. Pathology for the matched tumor tissue indicated metastatic intermediate grade neuroendocrine carcinoma, consistent with islet cell tumor, forming nodules ranging in size, in the lateral and medial left liver lobe. The pancreas showed fibrosis, chronic inflammation and fat necrosis consistent with pseudocyst. The gallbladder showed mild chronic cholecystitis. Patient history included malignant neoplasm of the pancreas tail, pulmonary embolism, hyperlipidemia, thrombophlebitis, joint pain in multiple joints, type II diabetes, benign hypertension, cerebrovascular disease, and normal delivery. Previous surgeries included distal pancreatectomy, total splenectomy, and partial hepatectomy. Family history included pancreas cancer with secondary liver cancer, benign hypertension, and hyperlipidemia.
LIVRTRX02	P1NCY	This subtracted C3A liver tumor cell line tissue library was constructed using 6.4 million clones from a treated C3A hepatocyte cell line library and was subjected to two rounds of subtraction hybridization with 1.72 million clones from an untreated C3A hepatocyte cell line library. The starting library for subtraction was constructed using RNA isolated from a treated C3A hepatocyte cell line which is a derivative of Hep G2, a cell line derived from a hepatoblastoma removed from a 15-year-old Caucasian male. The cells were treated with 3-methylcholanthrene (MCA). The hybridization probe for subtraction was derived from a similarly constructed library from RNA isolated from untreated C3A hepatocyte cells tissue from the same cell line. Subtractive hybridization conditions were based on the methodologies of Swarcop, et al., MAR 19 (1991):1954 and Bonaldo, et al. Genome Research 6 (1996):791.
MYEPTXU02	P1NCY	The library was constructed using RNA isolated from a treated K-562 cell line, derived from chronic myelogenous leukemia precursor cells removed from a 53-year-old female. The cells were treated with 1 micromolar PMA for 96 hours.
NEROTOM03	P1NCY	This normalized dorsal root ganglion tissue library was constructed from 1.05 million independent clones from a dorsal root ganglion tissue library. Starting RNA was made from dorsal root ganglion tissue removed from the cervical spine of a 32-year-old Caucasian male who died from acute pulmonary edema, acute bronchopneumonia, bilateral pleural effusions, pericardial effusion, and malignant lymphoma (natural killer cell

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Table 6 (cont.)

Library	Vector	Library Description
NERDUT03 (cont.)		The patient presented with pyrexia of unknown origin, malaise, fatigue, and gastrointestinal bleeding. Patient history included probable cytomegalovirus infection, liver congestion, and steatosis, splenomegaly, hemorrhagic cystitis, thyroid hemorrhage, respiratory failure, pneumonia of the left lung, natural killer cell lymphoma of the pharynx, Bell's palsy, and tobacco and alcohol abuse. Previous surgeries included colonoscopy, closed colon biopsy, adenotonsillectomy, and nasopharyngeal endoscopy and biopsy. Patient medications included Diflucan (Fluconazole), Deltasone (prednisone), hydrocodone, Lortab, Alprazolam, Reaxodone, ProMace-Cytabom, Etoposide, Cisplatin, Cyclophosphamide, and dexamethasone. The patient received radiation therapy and multiple blood transfusions. The library was normalized in 2 rounds using conditions adapted from Soares et al., PNAS (1994) 91:9228-9232 and Bonaldo et al., Genome Research 6 (1996):791, except that a significantly longer (48 hours/round) reannealing hybridization was used.
PENITUT01	P1NCY	Library was constructed using RNA isolated from tumor tissue removed from the penis of a 64-year-old Caucasian male during penile amputation. Pathology indicated a fungating invasive grade 4 squamous cell carcinoma involving the inner wall of the foreskin and extending onto the glans penis. Patient history included benign neoplasm of the large bowel, atherosclerotic coronary artery disease, angina pectoris, gout, and obesity. Family history included malignant pharyngeal neoplasm, chronic lymphocytic leukemia, and chronic liver disease.
TESTNOT17	P1NCY	Library was constructed from testis tissue removed from a 26-year-old Caucasian male who died from head trauma due to a motor vehicle accident. Serologies were negative. Patient history included a hernia at birth, tobacco use (1 1/2 pbd), marijuana use, and daily alcohol use (beer and hard liquor).
TLYMNOT08	P1NCY	The library was constructed using RNA isolated from anergicallogenic T-lymphocyte tissue removed from an adult (40-50-year-old) Caucasian male. The cells were incubated for 3 days in the presence of 1 microgram/ml OKT3 mAb and 5% human serum.
UTRSNOR01	P1NCY	Library was constructed using RNA isolated from uterine endometrium tissue removed from a 29-year-old Caucasian female during a vaginal hysterectomy and cystocele repair. Pathology indicated the endometrium was secretory, and the cervix showed mild chronic cervicitis with focal squamous metaplasia. Pathology for the associated tumor tissue indicated intramural uterine leiomyoma. Patient history included hypothyroidism, pelvic floor relaxation, and paraplegia. Family history included benign hypertension, type II diabetes, and hyperlipidemia.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Table 7

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Table 7 (cont.)

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

What is claimed is:

1. An isolated polypeptide selected from the group consisting of:
 - a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9,
 - b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5-6, and SEQ ID NO:9,
 - c) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 91% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2-4 and SEQ ID NO:7,
 - d) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 99% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:8,
 - e) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and
 - f) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.
2. An isolated polypeptide of claim 1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.
3. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 1.
4. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 2.
5. An isolated polynucleotide of claim 4 comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18.
6. A recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a polynucleotide of claim 3.
7. A cell transformed with a recombinant polynucleotide of claim 6.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

8. A transgenic organism comprising a recombinant polynucleotide of claim 6.
9. A method of producing a polypeptide of claim 1, the method comprising:
- 5 a) culturing a cell under conditions suitable for expression of the polypeptide, wherein said cell is transformed with a recombinant polynucleotide, and said recombinant polynucleotide comprises a promoter sequence operably linked to a polynucleotide encoding the polypeptide of claim 1, and
- b) recovering the polypeptide so expressed.
- 10 10. A method of claim 9, wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.
11. An isolated antibody which specifically binds to a polypeptide of claim 1.
- 15 12. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of:
- a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18,
- b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-16 and SEQ ID NO:18,
- 20 c) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 91% identical to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:17,
- d) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of a),
- e) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of b),
- 25 f) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of c), and
- g) an RNA equivalent of a)-f).
13. An isolated polynucleotide comprising at least 60 contiguous nucleotides of a polynucleotide of claim 12.
- 30 14. A method of detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide of claim 12, the method comprising:
- a) hybridizing the sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides

WO 02/063005

PCT/US02/03813

- comprising a sequence complementary to said target polynucleotide in the sample, and which probe specifically hybridizes to said target polynucleotide, under conditions whereby a hybridization complex is formed between said probe and said target polynucleotide or fragments thereof, and
- 5 b) detecting the presence or absence of said hybridization complex, and, optionally, if present, the amount thereof.
15. A method of claim 14, wherein the probe comprises at least 60 contiguous nucleotides.
- 10 16. A method of detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide of claim 12, the method comprising:
- a) amplifying said target polynucleotide or fragment thereof using polymerase chain reaction amplification, and
- b) detecting the presence or absence of said amplified target polynucleotide or fragment
- 15 thereof, and, optionally, if present, the amount thereof.
17. A composition comprising a polypeptide of claim 1 and a pharmaceutically acceptable excipient.
- 20 18. A composition of claim 17, wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.
19. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional LIPAM, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition of
- 25 claim 17.
20. A method of screening a compound for effectiveness as an agonist of a polypeptide of claim 1, the method comprising:
- a) exposing a sample comprising a polypeptide of claim 1 to a compound, and
- 30 b) detecting agonist activity in the sample.
21. A composition comprising an agonist compound identified by a method of claim 20 and a pharmaceutically acceptable excipient.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

22. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional LIPAM, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition of claim 21.
- 5 23. A method of screening a compound for effectiveness as an antagonist of a polypeptide of claim 1, the method comprising:
- a) exposing a sample comprising a polypeptide of claim 1 to a compound, and
 - b) detecting antagonist activity in the sample.
- 10 24. A composition comprising an antagonist compound identified by a method of claim 23 and a pharmaceutically acceptable excipient.
25. A method for treating a disease or condition associated with overexpression of functional LIPAM, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition of claim 24.
- 15 26. A method of screening for a compound that specifically binds to the polypeptide of claim 1, the method comprising:
- a) combining the polypeptide of claim 1 with at least one test compound under suitable conditions, and
 - 20 b) detecting binding of the polypeptide of claim 1 to the test compound, thereby identifying a compound that specifically binds to the polypeptide of claim 1.
27. A method of screening for a compound that modulates the activity of the polypeptide of claim 1, the method comprising:
- 25 a) combining the polypeptide of claim 1 with at least one test compound under conditions permissive for the activity of the polypeptide of claim 1,
 - b) assessing the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound, and
 - 30 c) comparing the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound with the activity of the polypeptide of claim 1 in the absence of the test compound, wherein a change in the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of the polypeptide of claim 1.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

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

- 5 a) exposing a sample comprising the target polynucleotide to a compound, under conditions suitable for the expression of the target polynucleotide,
- b) detecting altered expression of the target polynucleotide, and
- c) comparing the expression of the target polynucleotide in the presence of varying amounts of the compound and in the absence of the compound.

10 29. A method of assessing toxicity of a test compound, the method comprising:

- a) treating a biological sample containing nucleic acids with the test compound,
- b) hybridizing the nucleic acids of the treated biological sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides of a polynucleotide of claim 12 under conditions whereby a specific hybridization complex is formed between said probe and a target polynucleotide in the biological sample, said target polynucleotide comprising a polynucleotide sequence of a polynucleotide of claim 12 or fragment thereof,
- 15 c) quantifying the amount of hybridization complex, and
- d) comparing the amount of hybridization complex in the treated biological sample with the amount of hybridization complex in an untreated biological sample, wherein a difference in the amount of hybridization complex in the treated biological sample is
- 20 indicative of toxicity of the test compound.

30. A diagnostic test for a condition or disease associated with the expression of LIPAM in a biological sample, the method comprising:

- 25 a) combining the biological sample with an antibody of claim 11, under conditions suitable for the antibody to bind the polypeptide and form an antibody:polypeptide complex, and
- b) detecting the complex, wherein the presence of the complex correlates with the presence of the polypeptide in the biological sample.

30 31. The antibody of claim 11, wherein the antibody is:

- a) a chimeric antibody,
- b) a single chain antibody,

WO 02/063005

PCT/US02/03813

- c) a Fab fragment,
 - d) a F(ab')₂ fragment, or
 - e) a humanized antibody.
- 5 32. A composition comprising an antibody of claim 11 and an acceptable excipient.
33. A method of diagnosing a condition or disease associated with the expression of LIPAM in a subject, comprising administering to said subject an effective amount of the composition of claim 32.
- 10 34. A composition of claim 32, wherein the antibody is labeled.
35. A method of diagnosing a condition or disease associated with the expression of LIPAM in a subject, comprising administering to said subject an effective amount of the composition of claim 15 34.
36. A method of preparing a polyclonal antibody with the specificity of the antibody of claim 11, the method comprising:
- 20 a) immunizing an animal with a polypeptide consisting of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an antibody response,
 - b) isolating antibodies from said animal, and
 - 25 c) screening the isolated antibodies with the polypeptide, thereby identifying a polyclonal antibody which binds specifically to a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.
37. A polyclonal antibody produced by a method of claim 36.
38. A composition comprising the polyclonal antibody of claim 37 and a suitable carrier.
- 30 39. A method of making a monoclonal antibody with the specificity of the antibody of claim 11, the method comprising:
- a) immunizing an animal with a polypeptide consisting of an amino acid sequence

WO 02/063005

PCT/US02/03813

- selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an antibody response,
- b) isolating antibody producing cells from the animal,
- c) fusing the antibody producing cells with immortalized cells to form monoclonal antibody-producing hybridoma cells,
- 5 d) culturing the hybridoma cells, and
- e) isolating from the culture monoclonal antibody which binds specifically to a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.
- 10 40. A monoclonal antibody produced by a method of claim 39.
41. A composition comprising the monoclonal antibody of claim 40 and a suitable carrier.
- 15 42. The antibody of claim 11, wherein the antibody is produced by screening a Fab expression library.
43. The antibody of claim 11, wherein the antibody is produced by screening a recombinant immunoglobulin library.
- 20 44. A method of detecting a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9 in a sample, the method comprising:
- a) incubating the antibody of claim 11 with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the polypeptide, and
- 25 b) detecting specific binding, wherein specific binding indicates the presence of a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9 in the sample.
45. A method of purifying a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from
- 30 the group consisting of SEQ ID NO:1-9 from a sample, the method comprising:
- a) incubating the antibody of claim 11 with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the polypeptide, and
- b) separating the antibody from the sample and obtaining the purified polypeptide

WO 02/063005

PCT/US02/03813

comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.

- 5 13. 46. A microarray wherein at least one element of the microarray is a polynucleotide of claim
47. A method of generating an expression profile of a sample which contains polynucleotides, the method comprising:
- 10 a) labeling the polynucleotides of the sample,
b) contacting the elements of the microarray of claim 46 with the labeled polynucleotides of the sample under conditions suitable for the formation of a hybridization complex, and
c) quantifying the expression of the polynucleotides in the sample.
- 15 48. An array comprising different nucleotide molecules affixed in distinct physical locations on a solid substrate, wherein at least one of said nucleotide molecules comprises a first oligonucleotide or polynucleotide sequence specifically hybridizable with at least 30 contiguous nucleotides of a target polynucleotide, and wherein said target polynucleotide is a polynucleotide of claim 12.
- 20 49. An array of claim 48, wherein said first oligonucleotide or polynucleotide sequence is completely complementary to at least 30 contiguous nucleotides of said target polynucleotide.
50. An array of claim 48, wherein said first oligonucleotide or polynucleotide sequence is completely complementary to at least 60 contiguous nucleotides of said target polynucleotide.
- 25 51. An array of claim 48, wherein said first oligonucleotide or polynucleotide sequence is completely complementary to said target polynucleotide.
52. An array of claim 48, which is a microarray.
- 30 53. An array of claim 48, further comprising said target polynucleotide hybridized to a nucleotide molecule comprising said first oligonucleotide or polynucleotide sequence.

WO 02/063005
PCT/US02/03813

PCT/US02/03813

54. An array of claim 48, wherein a linker joins at least one of said nucleotide molecules to said solid substrate.

55. An array of claim 48, wherein each distinct physical location on the substrate contains multiple nucleotide molecules, and the multiple nucleotide molecules at any single distinct physical location have the same sequence, and each distinct physical location on the substrate contains nucleotide molecules having a sequence which differs from the sequence of nucleotide molecules at another distinct physical location on the substrate.

10 56. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

57. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

15 58. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.

59. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.

60. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:5.

20 61. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6.

62. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:7.

63. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:8.

25 64. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:9.

65. A polynucleotide of claim 12, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:10.

30 66. A polynucleotide of claim 12, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:11.

67. A polynucleotide of claim 12, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:12.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

68. A polynucleotide of claim 12, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:13.
69. A polynucleotide of claim 12, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:14.
- 5 70. A polynucleotide of claim 12, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:15.
71. A polynucleotide of claim 12, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:16.
72. A polynucleotide of claim 12, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:17.
- 10 73. A polynucleotide of claim 12, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:18.

WO 02/063005

PCT/US02/03813

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
 DAS, Debopriya
 YAO, Monique G.
 ARVIZU, Chandra
 BAUGHN, Mariah R.
 LU, Yan
 HAFALTA, April J.A.
 WALIA, Narinder K.
 GRIFFIN, Jennifer A.
 LU, Dyung Aina M.
 YUE, Henry
 DING, Li
 TOWNLEY, David J.
 ELLIOTT, Vicki S.
 FORSYTHE, Ian J.
 RAMKUMAR, Jayalaxmi
 GANDHI, Ameena R.
 ISON, Craig H.
 WARREN, Bridget A.
 TANG, Y. Tom
 EMERLING, Brooke M.
 HONCHELL, Cynthia D.

<120> LIPID-ASSOCIATED MOLECULES

<130> PI-0358 PCT

<140> To Be Assigned
 <141> Herewith

<150> 60/266,910; 60/276,891; 60/276,855; 60/279,760;
 60/283,818; 60/285,405

<151> 2001-02-06; 2001-03-16; 2001-03-16; 2001-03-28;
 2001-04-13; 2001-04-20

<160> 18
 <170> PERL Program

<210> 1
 <211> 996
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7472774CD1

<400> 1
 Met Lys Arg Ser Arg Pro Met His Pro Ile Cys Leu Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Thr Pro Arg Ala Ile Pro Ala Thr Ala Lys Leu Trp Pro Gly
 20 25 30
 Arg Trp Ser Ser Glu Ser Glu Tyr Lys Phe Leu Ile Leu Pro Pro
 35 40 45
 Ser Trp Arg Ala Ala Val Met Leu Leu Arg Gln Met His Ala Arg

WO 02/063005

PCT/US02/03813

	50		55		60
Val Ser His Ser	Leu Pro Asp Pro Cys Gln Ala Glu Asp Ser Arg				
	65		70		75
Pro Ser Ala Thr	Cys Ala Leu Lys Ala Pro Gln Thr Ser Trp Asp				
	80		85		90
Gly Leu Leu Arg	Glu Gly Leu Ser Pro Cys His Leu Leu Thr Val				
	95		100		105
Arg Val Ile Arg	Met Lys Asn Val Arg Gln Ala Asp Met Gln Pro				
	110		115		120
Val Gly Ile Glu	Leu Ala Pro Cys Leu Gln Ala Pro Ser Val Pro				
	125		130		135
Glu Thr Asp Leu	Lys Gly Val Val Gln Ala Arg Gly Gly Gly Ala				
	140		145		150
Ser Val Leu Glu	Lys Pro Arg Glu Gly Phe Lys Arg Ala Glu Gln				
	155		160		165
Val Pro Val Ser	Gln Thr Asp Cys Phe Val Ser Leu Trp Leu Pro				
	170		175		180
Thr Ala Ser Gln	Lys Lys Leu Arg Thr Arg Thr Ile Ser Asn Cys				
	185		190		195
Pro Asn Pro Glu	Trp Asn Glu Ser Phe Asn Phe Gln Ile Gln Ser				
	200		205		210
Arg Val Lys Asn	Val Leu Glu Leu Ser Val Cys Asp Glu Asp Thr				
	215		220		225
Val Thr Pro Asp	Asp His Leu Leu Thr Val Leu Tyr Asp Leu Thr				
	230		235		240
Lys Leu Cys Phe	Arg Lys Lys Thr His Val Lys Phe Pro Leu Asn				
	245		250		255
Pro Gln Gly Met	Glu Glu Leu Glu Val Glu Phe Leu Leu Glu Glu				
	260		265		270
Ser Pro Ser Pro	Pro Glu Thr Leu Val Thr Asn Gly Val Leu Val				
	275		280		285
Val Ile Ile Phe	Leu Gly Ser Cys Ser Ser Arg Gly His Gly Trp				
	290		295		300
Leu Leu Leu Ser	Gly Glu Gln Asp Gln Gly Arg Lys Gln Trp Ala				
	305		310		315
Gln Leu Gly Leu	Cys Pro Ile Leu Thr Ser Ala Gly Val Arg Leu				
	320		325		330
Asn Glu Ala Ser	Gln Met Gly His Arg Gln His Trp Gly Thr Ser				
	335		340		345
Trp Gly Phe Cys	Thr Glu Gly Gly Val Lys Asp Leu Leu Val Met				
	350		355		360
Val Asn Glu Ser	Phe Glu Asn Thr Gln Arg Val Arg Pro Cys Leu				
	365		370		375
Glu Pro Cys Cys	Pro Thr Ser Ala Cys Phe Gln Thr Ala Ala Cys				
	380		385		390
Phe His Tyr Pro	Lys Tyr Phe Gln Ser Gln Val His Val Glu Val				
	395		400		405
Pro Lys Ser His	Trp Ser Cys Gly Leu Cys Cys Arg Ser Arg Lys				
	410		415		420
Lys Gly Pro Ile	Ser Gln Pro Leu Asp Cys Leu Ser Asp Gly Gln				
	425		430		435
Val Met Thr Leu	Pro Val Gly Glu Ser Tyr Glu Leu His Met Lys				
	440		445		450
Ser Thr Pro Cys	Pro Glu Thr Leu Asp Val Arg Leu Gly Phe Ser				
	455		460		465
Leu Cys Pro Ala	Glu Leu Glu Phe Leu Gln Lys Arg Lys Val Val				

WO 02/063005

PCT/US02/03813

	470		475		480									
Val	Ala	Lys	Ala	Leu	Lys	Gln	Val	Leu	Gln	Leu	Glu	Glu	Asp	Leu
	485				490				495					
Gln	Glu	Asp	Glu	Val	Pro	Leu	Ile	Ala	Ile	Met	Ala	Thr	Gly	Gly
	500				505				510					
Gly	Thr	Arg	Ser	Met	Thr	Ser	Met	Tyr	Gly	His	Leu	Leu	Gly	Leu
	515				520				525					
Gln	Lys	Leu	Asn	Leu	Leu	Asp	Cys	Ala	Ser	Tyr	Ile	Thr	Gly	Leu
	530				535				540					
Ser	Gly	Ala	Thr	Trp	Thr	Met	Ala	Thr	Leu	Tyr	Arg	Asp	Pro	Asp
	545				550				555					
Trp	Ser	Ser	Lys	Asn	Leu	Glu	Pro	Ala	Ile	Phe	Glu	Ala	Arg	Arg
	560				565				570					
His	Val	Val	Lys	Asp	Lys	Leu	Pro	Ser	Leu	Phe	Pro	Asp	Gln	Leu
	575				580				585					
Arg	Lys	Phe	Gln	Glu	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Ser	Gln	Glu	Gly	Tyr
	590				595				600					
Arg	Val	Thr	Phe	Thr	Asp	Phe	Trp	Gly	Leu	Leu	Ile	Glu	Thr	Cys
	605				610				615					
Leu	Gly	Asp	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Lys	Leu	Ser	Asp	Gln	Arg	Ala
	620				625				630					
Ala	Leu	Ser	Cys	Gly	Gln	Asn	Pro	Leu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Thr	Ile
	635				640				645					
Asn	Val	Lys	Asp	Asp	Val	Ser	Asn	Gln	Asp	Val	Arg	Trp	Phe	Glu
	650				655				660					
Phe	Ser	Pro	Tyr	Glu	Val	Gly	Leu	Gln	Lys	Tyr	Gly	Ala	Phe	Ile
	665				670				675					
Pro	Ser	Glu	Leu	Phe	Gly	Ser	Glu	Phe	Phe	Met	Gly	Arg	Leu	Val
	680				685				690					
Lys	Arg	Ile	Pro	Glu	Ser	Arg	Ile	Cys	Tyr	Met	Leu	Gly	Leu	Trp
	695				700				705					
Ser	Ser	Ile	Phe	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Asp	Ala	Trp	Asn	Leu	Ser
	710				715				720					
His	Thr	Ser	Glu	Glu	Phe	Phe	His	Arg	Trp	Thr	Arg	Glu	Lys	Val
	725				730				735					
Gln	Asp	Ile	Glu	Asp	Glu	Pro	Ile	Leu	Pro	Glu	Ile	Pro	Lys	Cys
	740				745				750					
Asp	Ala	Asn	Ile	Leu	Glu	Thr	Thr	Val	Val	Ile	Pro	Gly	Ser	Trp
	755				760				765					
Leu	Ser	Asn	Ser	Phe	Arg	Glu	Ile	Leu	Thr	His	Arg	Ser	Phe	Val
	770				775				780					
Ser	Glu	Phe	His	Asn	Phe	Leu	Ser	Gly	Leu	Gln	Leu	His	Thr	Asn
	785				790				795					
Tyr	Leu	Gln	Asn	Gly	Gln	Phe	Ser	Arg	Trp	Lys	Asp	Thr	Val	Leu
	800				805				810					
Asp	Gly	Phe	Pro	Asn	Gln	Leu	Thr	Glu	Ser	Ala	Asn	His	Leu	Cys
	815				820				825					
Leu	Leu	Asp	Thr	Ala	Phe	Phe	Val	Asn	Ser	Ser	Tyr	Pro	Pro	Leu
	830				835				840					
Leu	Arg	Pro	Glu	Arg	Lys	Ala	Asp	Leu	Ile	Ile	His	Leu	Asn	Tyr
	845				850				855					
Cys	Ala	Gly	Ser	Gln	Thr	Lys	Pro	Leu	Lys	Gln	Thr	Cys	Glu	Tyr
	860				865				870					
Cys	Thr	Val	Gln	Asn	Ile	Pro	Phe	Pro	Lys	Tyr	Glu	Leu	Pro	Asp
	875				880				885					
Glu	Asn	Glu	Asn	Leu	Lys	Glu	Cys	Tyr	Leu	Met	Glu	Asn	Pro	Gln

WO 02/063005

PCT/US02/03813

```

      890                895                900
Glu Pro Asp Ala Pro Ile Val Thr Phe Phe Pro Leu Ile Asn Asp
      905                910                915
Thr Phe Arg Lys Tyr Lys Ala Pro Gly Val Glu Arg Ser Pro Glu
      920                925                930
Glu Leu Glu Gln Gly Gln Val Asp Ile Tyr Gly Pro Lys Thr Pro
      935                940                945
Tyr Ala Thr Lys Glu Leu Thr Tyr Thr Glu Ala Thr Phe Asp Lys
      950                955                960
Leu Val Lys Leu Ser Glu Tyr Asn Ile Leu Asn Asn Lys Asp Thr
      965                970                975
Leu Leu Gln Ala Leu Arg Leu Ala Val Glu Lys Lys Lys Arg Leu
      980                985                990
Lys Gly Gln Cys Pro Ser
      995

```

<210> 2

<211> 372

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2884821CD1

<400> 2

```

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

```

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Val Ala Leu Ser Gly Leu Asp Val Tyr Ala His Asn Val Glu Thr
 230 235 240
 Val Pro Glu Leu Gln Ser Lys Val Arg Asp Pro Arg Ala Asn Phe
 245 250 255
 Asp Gln Ser Leu Arg Val Leu Lys His Ala Lys Lys Val Gln Pro
 260 265 270
 Asp Val Ile Ser Lys Thr Ser Ile Met Leu Gly Leu Gly Glu Asn
 275 280 285
 Asp Glu Gln Val Tyr Ala Thr Met Lys Ala Leu Arg Glu Ala Asp
 290 295 300
 Val Asp Cys Leu Thr Leu Gly Gln Tyr Met Gln Pro Thr Arg Arg
 305 310 315
 His Leu Lys Val Glu Glu Tyr Ile Thr Pro Glu Lys Phe Lys Tyr
 320 325 330
 Trp Glu Lys Val Gly Asn Glu Leu Gly Phe His Tyr Thr Ala Ser
 335 340 345
 Gly Pro Leu Val Arg Ser Ser Tyr Lys Ala Gly Glu Phe Phe Leu
 350 355 360
 Lys Asn Leu Val Ala Lys Arg Lys Thr Lys Asp Leu
 365 370

<210> 3

<211> 649

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 72852842CD1

<400> 3

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

	185		190		195
Cys Arg Cys Leu	Glu Ile Asp Cys Trp	Asp Gly Ala Gln Asn Glu			
	200		205		210
Pro Val Val Tyr	His Gly Tyr Thr Leu	Thr Ser Lys Leu Leu Phe			
	215		220		225
Lys Thr Val Ile	Gln Ala Ile His Lys	Tyr Ala Phe Met Thr Ser			
	230		235		240
Asp Tyr Pro Val	Val Leu Ser Leu Glu	Asn His Cys Ser Thr Ala			
	245		250		255
Gln Gln Glu Val	Met Ala Asp Asn Leu	Gln Ala Thr Phe Gly Glu			
	260		265		270
Ser Leu Leu Ser	Asp Met Leu Asp Asp	Phe Pro Asp Thr Leu Pro			
	275		280		285
Ser Pro Glu Ala	Leu Lys Phe Lys Ile	Leu Val Lys Asn Lys Lys			
	290		295		300
Ile Gly Thr Leu	Lys Glu Thr His Glu	Arg Lys Gly Ser Asp Lys			
	305		310		315
Arg Gly Lys Val	Glu Glu Trp Glu Glu	Glu Val Ala Asp Gly Glu			
	320		325		330
Glu Glu Glu Glu	Glu Glu Glu Glu Glu	Glu Glu Glu Glu Asp			
	335		340		345
Lys Phe Lys Glu	Ser Glu Val Leu Glu	Ser Val Leu Gly Asp Asn			
	350		355		360
Gln Asp Lys Glu	Thr Gly Val Lys Lys	Leu Pro Gly Val Met Leu			
	365		370		375
Phe Lys Lys Lys	Lys Thr Arg Lys Leu	Lys Ile Ala Leu Ala Leu			
	380		385		390
Ser Asp Leu Val	Ile Tyr Thr Lys Ala	Glu Lys Phe Lys Ser Phe			
	395		400		405
Gln His Ser Arg	Leu Tyr Gln Gln Phe	Asn Glu Asn Asn Ser Ile			
	410		415		420
Gly Glu Thr Gln	Ala Arg Lys Leu Ser	Lys Leu Arg Val His Glu			
	425		430		435
Phe Ile Phe His	Thr Arg Lys Phe Ile	Thr Arg Ile Tyr Pro Lys			
	440		445		450
Ala Thr Arg Ala	Asp Ser Ser Asn Phe	Asn Pro Gln Glu Phe Trp			
	455		460		465
Asn Ile Gly Cys	Gln Met Val Ala Leu	Asn Phe Gln Thr Pro Gly			
	470		475		480
Leu Pro Met Asp	Leu Gln Asn Gly Lys	Phe Leu Asp Asn Gly Gly			
	485		490		495
Ser Gly Tyr Ile	Leu Lys Pro His Phe	Leu Arg Glu Ser Lys Ser			
	500		505		510
Tyr Phe Asn Pro	Ser Asn Ile Lys Glu	Gly Met Pro Ile Thr Leu			
	515		520		525
Thr Ile Arg Leu	Ile Ser Gly Ile Gln	Leu Pro Leu Thr His Ser			
	530		535		540
Ser Ser Asn Lys	Gly Asp Ser Leu Val	Ile Ile Glu Val Phe Gly			
	545		550		555
Val Pro Asn Asp	Gln Met Lys Gln Gln	Thr Arg Val Ile Lys Lys			
	560		565		570
Asn Ala Phe Ser	Pro Arg Trp Asn Glu	Thr Phe Thr Phe Ile Ile			
	575		580		585
His Val Pro Glu	Leu Ala Leu Ile Arg	Phe Val Val Glu Gly Gln			
	590		595		600
Gly Leu Ile Ala	Gly Asn Glu Phe Leu	Gly Gln Tyr Thr Leu Pro			

WO 02/063005

PCT/US02/03813

```

605          610          615
Leu Leu Cys Met Asn Lys Gly Tyr Arg Arg Ile Pro Leu Phe Ser
620          625          630
Arg Met Gly Glu Ser Leu Glu Pro Ala Ser Leu Phe Val Tyr Val
635          640          645
Trp Tyr Val Arg

```

```

<210> 4
<211> 2020
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7484271CD1

```

```

<400> 4
Met Ser Gly Gly Leu Val Pro Ile Tyr Val Ile Ala Gly Val Val
1          5          10          15
Thr Arg Lys Gly Arg Arg Gly Trp Asp Ile Met Met Gln Leu Thr
20          25          30
Leu Asn Thr Leu Phe Pro Val Val Ser Thr Pro Ala Ile Thr Tyr
35          40          45
Ile Val Thr Val Phe Thr Gly Asp Val Arg Gly Ala Gly Thr Lys
50          55          60
Ser Lys Ile Tyr Leu Val Met Tyr Gly Ala Arg Gly Asn Lys Asn
65          70          75
Ser Gly Lys Ile Phe Leu Glu Gly Gly Val Phe Asp Arg Gly Arg
80          85          90
Thr Asp Ile Phe His Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu Ser Pro Leu
95          100          105
Ser Arg Val Ser Val Gly His Gly Asn Val Gly Val Asn Arg Gly
110          115          120
Trp Phe Cys Glu Lys Val Val Ile Leu Cys Pro Phe Thr Gly Ile
125          130          135
Gln Gln Thr Phe Pro Cys Ser Asn Trp Leu Asp Glu Lys Lys Ala
140          145          150
Asp Gly Leu Ile Glu Arg Gln Leu Tyr Glu Met Val Ser Leu Arg
155          160          165
Lys Lys Arg Leu Lys Lys Phe Pro Trp Ser Leu Trp Val Trp Thr
170          175          180
Thr Asp Leu Lys Lys Ala Gly Thr Asn Ser Pro Ile Phe Ile Gln
185          190          195
Ile Tyr Gly Gln Lys Gly Arg Thr Asp Glu Ile Leu Leu Asn Pro
200          205          210
Asn Asn Lys Trp Phe Lys Pro Gly Ile Ile Glu Lys Phe Arg Ile
215          220          225
Glu Leu Pro Asp Leu Gly Arg Phe Tyr Lys Ile Arg Val Trp His
230          235          240
Asp Lys Arg Ser Ser Gly Ser Gly Trp His Leu Glu Arg Met Thr
245          250          255
Leu Met Asn Thr Leu Asn Lys Asp Lys Tyr Asn Phe Asn Cys Asn
260          265          270
Arg Trp Leu Asp Ala Asn Glu Asp Asp Asn Glu Ile Val Arg Glu
275          280          285

```

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Met Thr Ala Glu Gly Pro Thr Val Arg Arg Ile Met Gly Met Ala
 290 295 300
 Arg Tyr His Val Thr Val Cys Thr Gly Glu Leu Glu Gly Ala Gly
 305 310 315
 Thr Asp Ala Asn Val Tyr Leu Cys Leu Phe Gly Asp Val Gly Asp
 320 325 330
 Thr Gly Glu Arg Leu Leu Tyr Asn Cys Arg Asn Asn Thr Asp Leu
 335 340 345
 Phe Glu Lys Gly Asn Ala Asp Glu Phe Thr Ile Glu Ser Val Thr
 350 355 360
 Met Arg Asn Val Arg Arg Val Arg Ile Arg His Asp Gly Lys Gly
 365 370 375
 Ser Gly Ser Gly Trp Tyr Leu Asp Arg Val Leu Val Arg Glu Glu
 380 385 390
 Gly Gln Pro Glu Ser Asp Asn Val Glu Phe Pro Cys Leu Arg Trp
 395 400 405
 Leu Asp Lys Asp Lys Asp Asp Gly Gln Leu Val Arg Glu Leu Leu
 410 415 420
 Pro Ser Asp Ser Ser Ala Thr Leu Lys Asn Phe Arg Tyr His Ile
 425 430 435
 Ser Leu Lys Thr Gly Asp Val Ser Gly Ala Ser Thr Asp Ser Arg
 440 445 450
 Val Tyr Ile Lys Leu Tyr Gly Asp Lys Ser Asp Thr Ile Lys Gln
 455 460 465
 Val Leu Leu Val Ser Asp Asn Asn Leu Lys Asp Tyr Phe Glu Arg
 470 475 480
 Gly Arg Val Asp Glu Phe Thr Leu Glu Thr Leu Asn Ile Gly Asn
 485 490 495
 Ile Asn Arg Leu Val Ile Gly His Asp Ser Thr Gly Met His Ala
 500 505 510
 Ser Trp Phe Leu Gly Ser Val Gln Ile Arg Val Pro Arg Gln Gly
 515 520 525
 Lys Gln Tyr Thr Phe Pro Ala Asn Arg Trp Leu Asp Lys Asn Gln
 530 535 540
 Ala Asp Gly Arg Leu Glu Val Glu Leu Tyr Pro Ser Glu Val Val
 545 550 555
 Glu Ile Gln Lys Leu Val His Tyr Glu Val Glu Ile Trp Thr Gly
 560 565 570
 Asp Val Gly Gly Ala Gly Thr Ser Ala Arg Val Tyr Met Gln Ile
 575 580 585
 Tyr Gly Glu Lys Gly Lys Thr Glu Val Leu Phe Leu Ser Ser Arg
 590 595 600
 Ser Lys Val Phe Glu Arg Ala Ser Lys Asp Thr Phe Gln Leu Glu
 605 610 615
 Ala Ala Asp Val Gly Glu Val Tyr Lys Leu Arg Leu Gly His Thr
 620 625 630
 Gly Glu Gly Phe Gly Pro Ser Trp Phe Val Asp Thr Val Trp Leu
 635 640 645
 Arg His Leu Val Val Arg Glu Val Asp Leu Thr Pro Glu Glu Glu
 650 655 660
 Ala Arg Lys Lys Lys Glu Lys Asp Lys Leu Arg Gln Leu Leu Lys
 665 670 675
 Lys Glu Arg Leu Lys Ala Lys Leu Gln Arg Lys Lys Lys Lys Arg
 680 685 690
 Lys Gly Ser Asp Glu Glu Asp Glu Gly Glu Glu Glu Ser Ser
 695 700

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Ser Ser Glu Glu Ser Ser Ser Glu Glu Glu Glu Met Glu Glu Glu 710 715 720
 Glu Glu Glu Glu Glu Phe Gly Pro Gly Met Gln Glu Val Ile Glu 725 730 735
 Gln His Lys Phe Glu Ala His Arg Trp Leu Ala Arg Gly Lys Glu 740 745 750
 Asp Asn Glu Leu Val Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Gly 755 760 765
 Pro Glu Arg Asn Thr Tyr Glu Val Gln Val Val Thr Gly Asn Val 770 775 780
 Pro Lys Ala Gly Thr Asp Ala Asn Val Tyr Leu Thr Ile Tyr Gly 785 790 795
 Glu Glu Tyr Gly Asp Thr Gly Glu Arg Pro Leu Lys Lys Ser Asp 800 805 810
 Lys Ser Asn Lys Phe Glu Gln Gly Gln Thr Asp Thr Phe Thr Ile 815 820 825
 Tyr Ala Ile Asp Leu Gly Ala Leu Thr Lys Ile Arg Ile Arg His 830 835 840
 Asp Asn Thr Gly Asn Arg Ala Gly Trp Phe Leu Asp Arg Ile Asp 845 850 855
 Ile Thr Asp Met Asn Asn Glu Ile Thr Tyr Tyr Phe Pro Cys Gln 860 865 870
 Arg Trp Leu Ala Val Glu Glu Asp Asp Gly Gln Leu Ser Arg Glu 875 880 885
 Leu Leu Pro Val Asp Glu Ser Tyr Val Leu Pro Gln Ser Glu Glu 890 895 900
 Gly Gly Gly Gly Gly Asp Asn Asn Pro Leu Asp Asn Leu Ala Leu 905 910 915
 Glu Gln Lys Asp Lys Ser Thr Thr Phe Ser Val Thr Ile Lys Thr 920 925 930
 Gly Val Lys Lys Asn Ala Gly Thr Asp Ala Asn Val Phe Ile Thr 935 940 945
 Leu Phe Gly Thr Gln Asp Asp Thr Gly Met Thr Leu Leu Lys Ser 950 955 960
 Ser Lys Thr Asn Ser Asp Lys Phe Glu Arg Asp Ser Ile Glu Ile 965 970 975
 Phe Thr Val Glu Thr Leu Asp Leu Gly Asp Leu Trp Lys Val Arg 980 985 990
 Leu Gly His Asp Asn Thr Gly Lys Ala Pro Gly Trp Phe Val Asp 995 1000 1005
 Trp Val Glu Val Asp Ala Pro Ser Leu Gly Lys Cys Met Thr Phe 1010 1015 1020
 Pro Cys Gly Arg Trp Leu Ala Lys Asn Glu Asp Asp Gly Ser Ile 1025 1030 1035
 Ile Arg Asp Leu Phe His Ala Glu Leu Gln Thr Arg Leu Tyr Thr 1040 1045 1050
 Pro Phe Val Pro Tyr Glu Ile Thr Leu Tyr Thr Ser Asp Val Phe 1055 1060 1065
 Ala Ala Gly Thr Asp Ala Asn Ile Phe Ile Ile Ile Tyr Gly Cys 1070 1075 1080
 Asp Ala Val Cys Thr Gln Gln Lys Tyr Leu Cys Thr Asn Lys Arg 1085 1090 1095
 Glu Gln Lys Gln Phe Phe Glu Arg Lys Ser Ala Ser Arg Phe Ile 1100 1105 1110
 Val Glu Leu Glu Asp Val Gly Glu Ile Ile Glu Lys Ile Arg Ile 1115 1120 1125

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Gly His Asn Asn Thr Gly Met Asn Pro Gly Trp His Cys Ser His
 1130 1135 1140
 Val Asp Ile Arg Arg Leu Leu Pro Asp Lys Asp Gly Ala Glu Thr
 1145 1150 1155
 Leu Thr Phe Pro Cys Asp Arg Trp Leu Ala Thr Ser Glu Asp Asp
 1160 1165 1170
 Lys Lys Thr Ile Arg Glu Leu Val Pro Tyr Asp Ile Phe Thr Glu
 1175 1180 1185
 Lys Tyr Met Lys Asp Gly Ser Leu Arg Gln Val Tyr Lys Glu Val
 1190 1195 1200
 Glu Glu Pro Leu Asp Ile Val Leu Tyr Ser Val Gln Ile Phe Thr
 1205 1210 1215
 Gly Asn Ile Pro Gly Ala Gly Thr Asp Ala Lys Val Tyr Ile Thr
 1220 1225 1230
 Ile Tyr Gly Asp Leu Gly Asp Thr Gly Glu Arg Tyr Leu Gly Lys
 1235 1240 1245
 Ser Glu Asn Arg Thr Asn Lys Phe Glu Arg Gly Thr Ala Asp Thr
 1250 1255 1260
 Phe Ile Ile Glu Ala Ala Asp Leu Gly Val Ile Tyr Lys Ile Lys
 1265 1270 1275
 Leu Arg His Asp Asn Ser Lys Trp Cys Ala Asp Trp Tyr Val Glu
 1280 1285 1290
 Lys Val Glu Ile Trp Asn Asp Thr Asn Glu Asp Glu Phe Leu Phe
 1295 1300 1305
 Leu Cys Gly Arg Trp Leu Ser Leu Lys Lys Glu Asp Gly Arg Leu
 1310 1315 1320
 Glu Arg Leu Phe Tyr Glu Lys Glu Tyr Thr Gly Asp Arg Ser Ser
 1325 1330 1335
 Asn Cys Ser Ser Pro Ala Asp Phe Trp Glu Ile Ala Leu Ser Ser
 1340 1345 1350
 Lys Met Ala Asp Val Asp Ile Ser Thr Val Thr Gly Pro Met Ala
 1355 1360 1365
 Asp Tyr Val Gln Glu Gly Pro Ile Ile Pro Tyr Tyr Val Ser Val
 1370 1375 1380
 Thr Thr Gly Lys His Lys Asp Ala Ala Thr Asp Ser Arg Ala Phe
 1385 1390 1395
 Ile Phe Leu Ile Gly Glu Asp Asp Glu Arg Ser Lys Arg Ile Trp
 1400 1405 1410
 Leu Asp Tyr Pro Arg Gly Lys Arg Gly Phe Ser Arg Gly Ser Val
 1415 1420 1425
 Glu Glu Phe Tyr Val Ala Gly Leu Asp Val Gly Ile Ile Lys Lys
 1430 1435 1440
 Ile Glu Leu Gly His Asp Gly Ala Ser Pro Glu Ser Cys Trp Leu
 1445 1450 1455
 Val Glu Glu Leu Cys Leu Ala Val Pro Thr Gln Gly Thr Lys Tyr
 1460 1465 1470
 Met Leu Asn Cys Asn Cys Trp Leu Ala Lys Asp Arg Gly Asp Gly
 1475 1480 1485
 Ile Thr Ser Arg Val Phe Asp Leu Leu Asp Ala Met Val Val Asn
 1490 1495 1500
 Ile Gly Val Lys Val Leu Tyr Glu Met Thr Val Trp Thr Gly Asp
 1505 1510 1515
 Val Val Gly Gly Gly Thr Asp Ser Asn Ile Phe Met Thr Leu Tyr
 1520 1525 1530
 Gly Ile Asn Gly Ser Thr Glu Glu Met Gln Leu Asp Lys Lys Lys
 1535 1540 1545

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Ala Arg Phe Glu Arg Glu Gln Asn Asp Thr Phe Ile Met Glu Ile
 1550 1555 1560
 Leu Asp Ile Ala Pro Phe Thr Lys Met Arg Ile Arg Ile Asp Gly
 1565 1570 1575
 Leu Gly Ser Arg Pro Glu Trp Phe Leu Glu Arg Ile Leu Leu Lys
 1580 1585 1590
 Asn Met Asn Thr Gly Asp Leu Thr Met Phe Tyr Tyr Gly Asp Trp
 1595 1600 1605
 Leu Ser Gln Arg Lys Gly Lys Lys Thr Leu Val Cys Glu Met Cys
 1610 1615 1620
 Ala Val Ile Asp Glu Glu Glu Met Met Glu Trp Thr Ser Tyr Thr
 1625 1630 1635
 Val Ala Val Lys Thr Ser Asp Ile Leu Gly Ala Gly Thr Asp Ala
 1640 1645 1650
 Asn Val Phe Ile Ile Ile Phe Gly Glu Asn Gly Asp Ser Gly Thr
 1655 1660 1665
 Leu Ala Leu Lys Gln Ser Ala Asn Trp Asn Lys Phe Glu Arg Asn
 1670 1675 1680
 Asn Thr Asp Thr Phe Asn Phe Pro Asp Met Leu Ser Leu Gly His
 1685 1690 1695
 Leu Cys Lys Leu Arg Val Trp His Asp Asn Lys Gly Ile Phe Pro
 1700 1705 1710
 Gly Trp His Leu Ser Tyr Val Asp Val Lys Asp Asn Ser Arg Asp
 1715 1720 1725
 Glu Thr Phe His Phe Gln Cys Asp Cys Trp Leu Ser Lys Ser Glu
 1730 1735 1740
 Gly Asp Gly Gln Thr Val Arg Asp Phe Ala Cys Ala Asn Asn Lys
 1745 1750 1755
 Ile Cys Asp Glu Leu Glu Glu Thr Thr Tyr Glu Ile Val Ile Glu
 1760 1765 1770
 Thr Gly Asn Gly Gly Glu Thr Arg Glu Asn Val Trp Leu Ile Leu
 1775 1780 1785
 Glu Gly Arg Lys Asn Arg Ser Lys Glu Phe Leu Met Glu Asn Ser
 1790 1795 1800
 Ser Arg Gln Arg Ala Phe Arg Lys Gly Thr Thr Asp Thr Phe Glu
 1805 1810 1815
 Phe Asp Ser Ile Tyr Leu Gly Asp Ile Ala Ser Leu Cys Val Gly
 1820 1825 1830
 His Leu Ala Arg Glu Asp Arg Phe Ile Pro Lys Arg Glu Leu Ala
 1835 1840 1845
 Trp His Val Lys Thr Ile Thr Ile Thr Glu Met Glu Tyr Gly Asn
 1850 1855 1860
 Val Tyr Phe Phe Asn Cys Asp Cys Leu Ile Pro Leu Lys Arg Lys
 1865 1870 1875
 Arg Lys Tyr Phe Lys Val Phe Glu Val Thr Lys Thr Thr Glu Ser
 1880 1885 1890
 Phe Ala Ser Lys Val Gln Ser Leu Val Pro Val Lys Tyr Glu Val
 1895 1900 1905
 Ile Val Thr Thr Gly Tyr Glu Pro Gly Ala Gly Thr Asp Ala Asn
 1910 1915 1920
 Val Phe Val Thr Ile Phe Gly Ala Asn Gly Asp Thr Gly Lys Arg
 1925 1930 1935
 Glu Leu Lys Gln Lys Met Arg Asn Leu Phe Glu Arg Gly Ser Thr
 1940 1945 1950
 Asp Arg Phe Phe Leu Glu Thr Leu Glu Leu Gly Glu Leu Arg Lys
 1955 1960 1965

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Val Arg Leu Glu His Asp Ser Ser Gly Tyr Cys Ser Gly Trp Leu
 1970 1975 1980
 Val Glu Lys Val Glu Val Thr Asn Thr Ser Thr Gly Val Ala Thr
 1985 1990 1995
 Ile Phe Asn Cys Gly Arg Trp Leu Asp Lys Lys Arg Gly Asp Gly
 2000 2005 2010
 Leu Thr Trp Arg Asp Leu Phe Pro Ser Val
 2015 2020

<210> 5
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7474074CD1

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

```

275                280                285
Thr Tyr Pro Phe Cys Thr Tyr Tyr Phe Val Leu Ser Ile Ile Val
290                295                300
Pro Asp Lys Thr Met Met Asp Gly Ser Phe Ser Phe Lys Leu Leu
305                310                315
Asn Gln Leu Glu Met Ile Glu Glu Pro Arg Leu Tyr Glu Lys Asn
320                325                330
Lys Pro Phe Tyr Lys Leu Gln Glu Val Lys Ile Leu Ala Gln Phe
335                340                345
Tyr Asn Asp Phe Val Asn Ile Ser Ser Ile Gly Leu Thr Tyr Phe
350                355                360
Gln Ser Ser Asn Leu Gln Cys Ser Thr Cys Thr Tyr Lys Ile Gln
365                370                375
Ser Leu Met Leu Lys Ser Leu Thr Tyr Pro Lys Arg Pro Pro Leu
380                385                390
Cys Arg Tyr Asn Ile Val Leu Lys Glu Arg Glu Glu Val Phe Leu
395                400                405
Asn Pro Asn Thr Cys Thr Pro Lys Asn Thr
410                415

```

<210> 6

<211> 1152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 72024970CD1

<400> 6

```

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

```

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Lys Leu Asn Val Asn Leu Pro Arg Gln Arg Val Lys Gln Met Phe 225
 200 205
 Arg Glu Ala Asp Thr Asp Asp His Gln Gly Thr Leu Gly Phe Glu 225
 215 220
 Glu Phe Cys Ala Phe Tyr Lys Met Met Ser Thr Arg Arg Asp Leu 240
 230 235
 Tyr Leu Leu Met Leu Thr Tyr Ser Asn His Lys Asp His Leu Asp 255
 245 250
 Ala Ala Ser Leu Gln Arg Phe Leu Gln Val Glu Gln Lys Met Ala 270
 260 265
 Gly Val Thr Leu Glu Ser Cys Gln Asp Ile Ile Glu Gln Phe Glu 285
 275 280
 Pro Cys Pro Glu Asn Lys Ser Lys Gly Leu Leu Gly Ile Asp Gly 300
 290 295
 Phe Thr Asn Tyr Thr Arg Ser Pro Ala Gly Asp Ile Phe Asn Pro 315
 305 310
 Glu His His His Val His Gln Asp Met Thr Gln Pro Leu Ser His 330
 320 325
 Tyr Phe Ile Thr Ser Ser His Asn Thr Tyr Leu Val Gly Asp Gln 345
 335 340
 Leu Met Ser Gln Ser Arg Val Asp Met Tyr Ala Trp Val Leu Gln 360
 350 355
 Ala Gly Cys Arg Cys Val Glu Val Asp Cys Trp Asp Gly Pro Asp 375
 365 370
 Gly Glu Pro Ile Val His His Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Lys Ile 390
 380 385
 Leu Phe Lys Asp Val Ile Glu Thr Ile Asn Lys Tyr Ala Phe Ile 405
 395 400
 Lys Asn Glu Tyr Pro Val Ile Leu Ser Ile Glu Asn His Cys Ser 420
 410 415
 Val Ile Gln Gln Lys Lys Met Ala Gln Tyr Leu Thr Asp Ile Leu 435
 425 430
 Gly Asp Lys Leu Asp Leu Ser Ser Val Ser Ser Glu Asp Ala Thr 450
 440 445
 Thr Leu Pro Ser Pro Gln Met Leu Lys Gly Lys Ile Leu Val Lys 465
 455 460
 Gly Lys Lys Leu Pro Ala Asn Ile Ser Glu Asp Ala Glu Glu Gly 480
 470 475
 Glu Val Ser Asp Glu Asp Ser Ala Asp Glu Ile Asp Asp Asp Cys 495
 485 490
 Lys Leu Leu Asn Gly Asp Ala Ser Thr Asn Arg Lys Arg Val Glu 510
 500 505
 Asn Thr Ala Lys Arg Lys Leu Asp Ser Leu Ile Lys Glu Ser Lys 525
 515 520
 Ile Arg Asp Cys Glu Asp Pro Asn Asn Phe Ser Val Ser Thr Leu 540
 530 535
 Ser Pro Ser Gly Lys Leu Gly Arg Lys Ser Lys Ala Glu Glu Asp 555
 545 550
 Val Glu Ser Gly Glu Asp Ala Gly Ala Ser Arg Arg Asn Gly Arg 570
 560 565
 Leu Val Val Gly Ser Phe Ser Arg Arg Lys Lys Lys Gly Ser Lys 585
 575 580
 Leu Lys Lys Ala Ala Ser Val Glu Glu Gly Asp Glu Gly Gln Asp 600
 590 595
 Ser Pro Gly Gly Gln Ser Arg Gly Ala Thr Arg Gln Lys Lys Thr 615
 605 610

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Met Lys Leu Ser Arg Ala Leu Ser Asp Leu Val Lys Tyr Thr Lys 620 625 630
 Ser Val Ala Thr His Asp Ile Glu Met Glu Ala Ala Ser Ser Trp 635 640 645
 Gln Val Ser Ser Phe Ser Glu Thr Lys Ala His Gln Ile Leu Gln 650 655 660
 Gln Lys Pro Ala Gln Tyr Leu Arg Phe Asn Gln Gln Gln Leu Ser 665 670 675
 Arg Ile Tyr Pro Ser Ser Tyr Arg Val Asp Ser Ser Asn Tyr Asn 680 685 690
 Pro Gln Pro Phe Trp Asn Ala Gly Cys Gln Met Val Ala Leu Asn 695 700 705
 Tyr Gln Ser Glu Gly Arg Met Leu Gln Leu Asn Arg Ala Lys Phe 710 715 720
 Ser Ala Asn Gly Gly Cys Gly Tyr Val Leu Lys Pro Gly Cys Met 725 730 735
 Cys Gln Gly Val Phe Asn Pro Asn Ser Glu Asp Pro Leu Pro Gly 740 745 750
 Gln Leu Lys Lys Gln Leu Val Leu Arg Ile Ile Ser Gly Gln Gln 755 760 765
 Leu Pro Lys Pro Arg Asp Ser Met Leu Gly Asp Arg Gly Glu Ile 770 775 780
 Ile Asp Pro Phe Val Glu Val Glu Ile Ile Gly Leu Pro Val Asp 785 790 795
 Cys Ser Arg Glu Gln Thr Arg Val Val Asp Asp Asn Gly Phe Asn 800 805 810
 Pro Thr Trp Glu Glu Thr Leu Val Phe Met Val His Met Pro Glu 815 820 825
 Ile Ala Leu Val Arg Phe Leu Val Trp Asp His Asp Pro Ile Gly 830 835 840
 Arg Asp Phe Ile Gly Gln Arg Thr Leu Ala Phe Ser Ser Met Met 845 850 855
 Pro Gly Tyr Arg His Val Tyr Leu Glu Gly Met Glu Glu Ala Ser 860 865 870
 Ile Phe Val His Val Ala Val Ser Asp Ile Ser Gly Lys Val Lys 875 880 885
 Gln Ala Leu Gly Leu Lys Gly Leu Phe Leu Arg Gly Pro Lys Pro 890 895 900
 Gly Ser Leu Asp Ser His Ala Ala Gly Arg Pro Pro Ala Arg Pro 905 910 915
 Ser Val Ser Gln Arg Ile Leu Arg Arg Thr Ala Ser Ala Pro Thr 920 925 930
 Lys Ser Gln Lys Pro Gly Arg Arg Gly Phe Pro Glu Leu Val Leu 935 940 945
 Gly Thr Arg Asp Thr Gly Ser Lys Gly Val Ala Asp Asp Val Val 950 955 960
 Pro Pro Gly Pro Gly Pro Ala Pro Glu Ala Pro Ala Gln Glu Gly 965 970 975
 Pro Gly Ser Gly Ser Pro Arg Gly Lys Ala Pro Ala Ala Val Ala 980 985 990
 Glu Lys Ser Pro Val Arg Val Arg Pro Pro Arg Val Leu Asp Gly 995 1000 1005
 Pro Gly Pro Ala Gly Met Ala Ala Thr Cys Met Lys Cys Val Val 1010 1015 1020
 Gly Ser Cys Ala Gly Val Asn Thr Gly Gly Pro Gln Arg Glu Arg 1025 1030 1035

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Pro Pro Ser Pro Gly Pro Ala Ser Arg Gln Ala Ala Ile Arg Gln
 1040 1045 1050
 Gln Pro Arg Ala Arg Ala Asp Ser Leu Gly Ala Pro Cys Cys Gly
 1055 1060 1065
 Leu Asp Pro His Ala Ile Pro Gly Arg Ser Arg Glu Ala Pro Lys
 1070 1075 1080
 Gly Pro Gly Ala Trp Arg Gln Gly Pro Gly Gly Ser Gly Ser Met
 1085 1090 1095
 Ser Ser Asp Ser Ser Ser Pro Asp Ser Pro Gly Ile Pro Glu Arg
 1100 1105 1110
 Ser Pro Arg Trp Pro Glu Gly Ala Cys Arg Gln Pro Gly Ala Leu
 1115 1120 1125
 Gln Gly Glu Met Ser Ala Leu Phe Ala Gln Lys Leu Glu Glu Ile
 1130 1135 1140
 Arg Ser Lys Ser Pro Met Phe Ser Ala Val Arg Asn
 1145 1150

<210> 7

<211> 1294

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 6131380CD1

<400> 7

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

WO 02/063005

PCT/US02/03813

	215	220	225
Gln Ala Trp Cys	Trp Gln Asp Glu Trp	Tyr Gly Leu Ser Met Glu	235
	230	235	240
Asn Ile Arg Glu	Leu Glu Lys Glu Ala	Gln Leu Met Leu Ser Arg	245
	245	250	255
Lys Met Ala Gln	Phe Asn Glu Asp Gly	Glu Glu Ala Thr Glu Leu	260
	265	270	275
Val Lys His Glu	Ala Val Ser Asp Gln	Thr Ser Gly Glu Pro Pro	280
	285	290	295
Glu Pro Ser Ser	Ser Asn Gly Glu Pro	Leu Val Gly Arg Gly Leu	300
	295	300	305
Lys Lys Gln Trp	Ser Thr Ser Ser Lys	Ser Ser Arg Ser Ser Lys	310
	315	320	325
Arg Gly Ala Ser	Pro Ser Arg His Ser	Ile Ser Glu Trp Arg Met	330
	335	340	345
Gln Ser Ile Ala	Arg Asp Ser Asp Glu	Ser Ser Asp Asp Glu Phe	350
	355	360	365
Phe Asp Ala His	Glu Asp Leu Ser Asp	Thr Glu Glu Met Phe Pro	370
	375	380	385
Lys Asp Ile Thr	Lys Trp Ser Ser Asn	Asp Leu Met Asp Lys Ile	390
	395	400	405
Glu Ser Pro Glu	Pro Glu Asp Thr Gln	Asp Gly Leu Tyr Arg Gln	410
	415	420	425
Gly Ala Pro Glu	Phe Arg Val Ala Ser	Ser Val Glu Gln Leu Asn	430
	435	440	445
Ile Ile Glu Asp	Glu Val Ser Gln Pro	Leu Ala Ala Pro Pro Ser	450
	455	460	465
Lys Ile His Val	Leu Leu Val Leu His	Gly Gly Thr Ile Leu	470
	475	480	485
Asp Thr Gly Ala	Gly Asp Pro Ser Ser	Lys Lys Gly Asp Ala Asn	490
	495	500	505
Thr Ile Ala Asn	Val Phe Asp Thr Val	Met Arg Val His Tyr Pro	510
	515	520	525
Ser Ala Leu Gly	Arg Leu Ala Ile Arg	Leu Val Pro Cys Pro Pro	530
	535	540	545
Val Cys Ser Asp	Ala Phe Ala Leu Val	Ser Asn Leu Ser Pro Tyr	550
	555	560	565
Ser His Asp Glu	Gly Cys Leu Ser Ser	Ser Gln Asp His Ile Pro	570
	575	580	585
Leu Ala Ala Leu	Pro Leu Leu Ala Thr	Ser Ser Pro Gln Tyr Gln	590
	595	600	605
Glu Ala Val Ala	Thr Val Ile Gln Arg	Ala Asn Leu Ala Tyr Gly	610
	615	620	625
Asp Phe Ile Lys	Ser Gln Glu Gly Met	Thr Phe Asn Gly Gln Val	630
	635	640	645
Cys Leu Ile Gly	Asp Cys Val Gly Gly	Ile Leu Ala Phe Asp Ala	650
	655	660	665
Leu Cys Tyr Ser	Asn Gln Pro Val Ser	Glu Ser Gln Ser Ser Ser	670
	675	680	685
Arg Arg Gly Ser	Val Val Ser Met Gln	Asp Asn Asp Leu Leu Ser	690
	695	700	705
Pro Gly Ile Leu	Met Asn Ala Ala His	Cys Cys Gly Gly Gly Gly	710
	715	720	725
Gly Gly Gly Gly	Gly Gly Ser Ser	Gly Gly Gly Gly Ser Ser	730
	735	740	745
Gly Gly Ser Ser	Leu Glu Ser Ser Arg	His Leu Ser Arg Ser Asn	750

WO 02/063005

PCT/US02/03813

	635	640	645
Val Asp Ile Pro Arg Ser Asn Gly Thr		Glu Asp Pro Lys Arg Gln	
	650	655	660
Leu Pro Arg Lys Arg Ser Asp Ser Ser		Thr Tyr Glu Leu Asp Thr	
	665	670	675
Ile Gln Gln His Gln Ala Phe Leu Ser		Ser Leu His Ala Ser Val	
	680	685	690
Leu Arg Thr Glu Pro Cys Ser Arg His		Ser Ser Ser Thr Met	
	695	700	705
Leu Asp Gly Thr Gly Ala Leu Gly Arg		Phe Asp Phe Glu Ile Thr	
	710	715	720
Asp Leu Phe Leu Phe Gly Cys Pro Leu		Gly Leu Val Leu Ala Leu	
	725	730	735
Arg Lys Thr Val Ile Pro Ala Leu Asp		Val Phe Gln Leu Arg Pro	
	740	745	750
Ala Cys Gln Gln Val Tyr Asn Leu Phe		His Pro Ala Asp Pro Ser	
	755	760	765
Ala Ser Arg Leu Glu Pro Leu Leu Glu		Arg Arg Phe His Ala Leu	
	770	775	780
Pro Pro Phe Ser Val Pro Arg Tyr Gln		Arg Tyr Pro Leu Gly Asp	
	785	790	795
Gly Cys Ser Thr Leu Leu Asp Val Leu		Gln Thr His Asn Ala Ala	
	800	805	810
Phe Gln Glu His Gly Ala Pro Ser Ser		Pro Gly Thr Ala Pro Ala	
	815	820	825
Ser Arg Gly Phe Arg Arg Ala Ser Glu		Ile Ser Ile Ala Ser Gln	
	830	835	840
Val Ser Gly Met Ala Glu Ser Tyr Thr		Ala Ser Ser Ile Ala Gln	
	845	850	855
Val Ala Ala Lys Trp Trp Gly Gln Lys		Arg Ile Asp Tyr Ala Leu	
	860	865	870
Tyr Cys Pro Asp Ala Leu Thr Ala Phe		Pro Thr Val Ala Leu Pro	
	875	880	885
His Leu Phe His Ala Ser Tyr Trp Glu		Ser Thr Asp Val Val Ser	
	890	895	900
Phe Leu Leu Arg Gln Val Met Arg His		Asp Asn Ser Ser Ile Leu	
	905	910	915
Glu Leu Asp Gly Lys Glu Val Ser Val		Phe Thr Pro Ser Lys Pro	
	920	925	930
Arg Glu Lys Trp Gln Arg Lys Arg Thr		His Val Lys Leu Arg Asn	
	935	940	945
Val Thr Ala Asn His Arg Ile Asn Asp		Ala Leu Ala Asn Glu Asp	
	950	955	960
Gly Pro Gln Val Leu Thr Gly Arg Phe		Met Tyr Gly Pro Leu Asp	
	965	970	975
Met Val Thr Leu Thr Gly Glu Lys Val		Asp Val His Ile Met Thr	
	980	985	990
Gln Pro Pro Ser Gly Glu Trp Leu Tyr		Leu Asp Thr Leu Val Thr	
	995	1000	1005
Asn Asn Ser Gly Arg Val Ser Tyr Thr		Ile Pro Glu Ser His Arg	
	1010	1015	1020
Leu Gly Val Gly Val Tyr Pro Ile Lys		Met Val Val Arg Gly Asp	
	1025	1030	1035
His Thr Phe Ala Asp Ser Tyr Ile Thr		Val Leu Pro Lys Gly Thr	
	1040	1045	1050
Glu Phe Val Val Phe Ser Ile Asp Gly		Ser Phe Ala Ala Ser Val	

WO 02/063005

PCT/US02/03813

1055 1060 1065
 Ser Ile Met Gly Ser Asp Pro Lys Val Arg Ala Gly Ala Val Asp
 1070 1075 1080
 Val Val Arg His Trp Gln Asp Leu Gly Tyr Leu Ile Ile Tyr Val
 1085 1090 1095
 Thr Gly Arg Pro Asp Met Gln Lys Gln Arg Val Val Ala Trp Leu
 1100 1105 1110
 Ala Gln His Asn Phe Pro His Gly Val Val Ser Phe Cys Asp Gly
 1115 1120 1125
 Leu Val His Asp Pro Leu Arg His Lys Ala Asn Phe Leu Lys Leu
 1130 1135 1140
 Leu Ile Ser Glu Leu His Leu Arg Val His Ala Ala Tyr Gly Ser
 1145 1150 1155
 Thr Lys Asp Val Ala Val Tyr Ser Ala Ile Ser Leu Ser Pro Met
 1160 1165 1170
 Gln Ile Tyr Ile Val Gly Arg Pro Thr Lys Lys Leu Gln Gln Gln
 1175 1180 1185
 Cys Gln Phe Ile Thr Asp Gly Tyr Ala Ala His Leu Ala Gln Leu
 1190 1195 1200
 Lys Tyr Ser His Arg Ala Arg Pro Ala Arg Asn Thr Ala Thr Arg
 1205 1210 1215
 Met Ala Leu Arg Lys Gly Ser Phe Gly Leu Pro Gly Gln Gly Asp
 1220 1225 1230
 Phe Leu Arg Ser Arg Asn His Leu Leu Arg Thr Ile Ser Ala Gln
 1235 1240 1245
 Pro Ser Gly Pro Ser His Arg His Glu Arg Thr Gln Ser Gln Ala
 1250 1255 1260
 Asp Gly Glu Gln Arg Gly Gln Arg Ser Met Ser Val Ala Ala Gly
 1265 1270 1275
 Cys Trp Gly Arg Ala Met Thr Gly Arg Leu Glu Pro Gly Ala Ala
 1280 1285 1290
 Ala Gly Pro Lys

<210> 8
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 643681CD1

<400> 8
 Met Asp Met Val Arg Trp Cys Gly Glu Asp Val Arg Lys Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Phe Ile Thr Ser Gln Gly Ala Ser Glu Tyr Arg Gly Lys Lys
 20 25 30
 Thr Thr Lys Arg Gln Ala Gln Gly Glu Ser Thr Ile Lys Asp Ile
 35 40 45
 Pro Met Pro Ala Ser Ile Ala Ala Pro Ala Leu Leu Ala Gly His
 50 55 60
 Leu Pro Gln Leu His Leu Pro Ser Lys Leu Phe Asn Phe His Thr
 65 70 75
 Val Ser

WO 02/063005

PCT/US02/03813

<210> 9
 <211> 576
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 6897474CD1

<400> 9
 Met Ala Gln Gly Val Leu Trp Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Ser Asp Pro Gly Thr Ala Ser Leu Pro Leu Leu Met Asp Ser Val
 20 25 30
 Ile Gln Ala Leu Ala Glu Leu Glu Gln Lys Val Pro Ala Ala Lys
 35 40 45
 Thr Arg His Thr Ala Ser Ala Trp Leu Met Ser Ala Pro Asn Ser
 50 55 60
 Gly Pro His Asn Arg Leu Tyr His Phe Leu Leu Gly Ala Trp Ser
 65 70 75
 Leu Asn Ala Thr Glu Leu Asp Pro Cys Pro Leu Ser Pro Glu Leu
 80 85 90
 Leu Gly Leu Thr Lys Glu Val Ala Arg His Asp Val Arg Glu Gly
 95 100 105
 Lys Glu Tyr Gly Val Val Leu Ala Pro Asp Gly Ser Thr Val Ala
 110 115 120
 Val Glu Pro Leu Leu Ala Gly Leu Glu Ala Gly Leu Gln Gly Arg
 125 130 135
 Arg Val Ile Asn Leu Pro Leu Asp Ser Met Ala Ala Pro Trp Glu
 140 145 150
 Thr Gly Asp Thr Phe Pro Asp Val Val Ala Ile Ala Pro Asp Val
 155 160 165
 Arg Ala Thr Ser Ser Pro Gly Leu Arg Asp Gly Ser Pro Asp Val
 170 175 180
 Thr Thr Ala Asp Ile Gly Ala Asn Thr Pro Asp Ala Thr Lys Gly
 185 190 195
 Cys Pro Asp Val Gln Ala Ser Leu Pro Asp Ala Lys Ala Lys Ser
 200 205 210
 Pro Pro Thr Met Val Asp Ser Leu Leu Ala Val Thr Leu Ala Gly
 215 220 225
 Asn Leu Gly Leu Thr Phe Leu Arg Gly Ser Gln Thr Gln Ser His
 230 235 240
 Pro Asp Leu Gly Thr Glu Gly Cys Trp Asp Gln Leu Ser Ala Pro
 245 250 255
 Arg Thr Phe Thr Leu Leu Asp Pro Lys Ala Ser Leu Leu Thr Met
 260 265 270
 Ala Phe Leu Asn Gly Ala Leu Asp Gly Val Ile Leu Gly Asp Tyr
 275 280 285
 Leu Ser Arg Thr Pro Glu Pro Arg Pro Ser Leu Ser His Leu Leu
 290 295 300
 Ser Gln Tyr Tyr Gly Ala Gly Val Ala Arg Asp Pro Gly Phe Arg
 305 310 315
 Ser Asn Phe Arg Arg Gln Asn Gly Ala Ala Leu Thr Ser Ala Ser
 320 325 330
 Ile Leu Ala Gln Gln Val Trp Gly Thr Leu Val Leu Leu Gln Arg
 335 340 345

WO 02/063005

PCT/US02/03813

Leu Glu Pro Val His Leu Gln Leu Gln Cys Met Ser Gln Glu Gln
 350 355 360
 Leu Ala Gln Val Ala Ala Asn Ala Thr Lys Glu Phe Thr Glu Ala
 365 370 375
 Phe Leu Gly Cys Pro Ala Ile His Pro Arg Cys Arg Trp Gly Ala
 380 385 390
 Ala Pro Tyr Arg Gly Arg Pro Lys Leu Leu Gln Leu Pro Leu Gly
 395 400 405
 Phe Leu Tyr Val His His Thr Tyr Val Pro Ala Pro Pro Cys Thr
 410 415 420
 Asp Phe Thr Arg Cys Ala Ala Asn Met Arg Ser Met Gln Arg Tyr
 425 430 435
 His Gln Asp Thr Gln Gly Trp Gly Asp Ile Gly Tyr Ser Phe Val
 440 445 450
 Val Gly Ser Asp Gly Tyr Val Tyr Glu Gly Arg Gly Trp His Trp
 455 460 465
 Val Gly Ala His Thr Leu Gly His Asn Ser Arg Gly Phe Gly Val
 470 475 480
 Ala Ile Val Gly Asn Tyr Thr Ala Ala Leu Pro Thr Glu Ala Ala
 485 490 495
 Leu Arg Thr Val Arg Asp Thr Leu Pro Ser Cys Ala Val Arg Ala
 500 505 510
 Gly Leu Leu Arg Pro Asp Tyr Ala Leu Leu Gly His Arg Gln Leu
 515 520 525
 Val Arg Thr Asp Cys Pro Gly Asp Ala Leu Phe Asp Leu Leu Arg
 530 535 540
 Thr Trp Pro His Phe Thr Ala Thr Val Lys Pro Arg Pro Ala Arg
 545 550 555
 Ser Val Ser Lys Arg Ser Arg Arg Glu Pro Pro Pro Arg Thr Leu
 560 565 570
 Pro Ala Thr Asp Leu Gln
 575

<210> 10

<211> 3879

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 7472774CB1

<400> 10

aggctccctgg ccacagctcc tggggstacca agccatgaaa ctgaagtgga gttgggagcg 60
 acggtcgcac cctectagag gggcatctat gaqccatgac ctctataagc tgaagagata 120
 gagctttccc aaattatggc gggctagtcc tacagtcacg tgggtccagt gtcctctctc 180
 tgccaccacac tgtgcccttg aagcctggc cattctgagt ggtgggggc tacagactgc 240
 tgaccccaaa gaccagagcc ctgcccgtcc ctgtatttct atgacctgaa gacctgtgat 300
 ttctttgata tgaagagatc taggcccacg caccctatct gtctaccac tcaaaccaact 360
 cccagagcaa tcccagctac tgccaagctg tggccaggaa ggtggagctc tgaagtcagag 420
 tataagtccc tgatcttgcc acccagctgg agagctgccg tgatgctcct gaggcagatg 480
 cagccagggg tctcccactc cctgccagac ccatgccaaag cagaagacag cagccctcg 540
 gccaccctgtg ccttgaaggg tcccagact tcatgggatg gtttctctgag ggaagggctg 600
 tctccatgcc acctgttgac agtgagggtc atccggatga aaaatgtccg gcaggctgat 660
 atgcaaccag taggtataga gctggcaccg tcctgcagg ctcccagcgt accggagaca 720
 gacctgaagg gtgtggtcca ggcctgggtt gggggggcca gtgtttctgga aaagccaagg 780

WO 02/063005

PCT/US02/03813

```

gaagggltca agagggctga gcaggttccct gtgagccaga cagactgttt tgtgagcctc 840
tggtgcccac cggcctctca gaagaagctg aggacaagga ccatctccaa ctgcccuaat 900
ccagagtggg atgaagcctt caacttccag atccagagcc gagtgaagaa cgtgctagag 960
ttgagtgtct gtgatgaaga cacagtgaca ccagatgacc atctctctgac agttctctat 1020
gacctaccac agctctgttt ccgaaagaaa accccagctga agtttccact caaccccag 1080
ggcatgggaa agctgaggtt ggagttcctg ctggaggaga gtccctctcc acctgagacc 1140
ctctgaccac atggcgtgct ggttgtaatt atctctctgt gtctctctag ctccagagcc 1200
cacggctggc tgcctgctct aggggaacag gaccaaggga gaaaacagtg ggcccagctt 1260
ggtctctgct ctatctctgac ctctcgagga gttagactaa acgagccag ccaaatgggg 1320
cacaggcagc actggggcac gagctggggc ttctgtacag agggagaggt gaaggacctc 1380
ctgtgcatgg tgaacgaate ctttgagAAC acccagctgt tccggccctg cttggaacct 1440
tgcctcccua cctctgctgt cttccaaacc gctgctgct tccactacc caagtaactc 1500
cagtcccagg tycacgtgga agtgcacca agtcaactgga gctgtgggct ttgctgccc 1560
tctcgcaaga agggcccact cagccagccc ctgactgccc ttccgatgg tcaggtgatg 1620
accctgctgt tgggtgagag ttaTgaatta cacatgaagt ctacacctg cctgagaca 1680
ctggaactgc ggtctggcctt cagcctgtcc ccagcagagc tggagttct gcagaagcgg 1740
aaggtcgtgg tggccaagge cctgaagcag gtgctgcagc tggaggaaga cctgcaggag 1800
gacgaggtgc cgtctgtagc catctggccc actgggggtg gaacaagatc catgacctcc 1860
atgtatggcc acctgctggg gctgcagaag ctgaacctcc tggactgtgc cagctacatc 1920
actggtctat caggggccac ctggaccatg gctacctgt accgtgacc tgactgttcc 1980
tccaaaaact tggagcctgc tatctttgag gctcggagac atgtgtgtaa ggacaagctc 2040
ccctccctgt tcccagacca gctccgcaaa ttccagagg agctccggca gcgagccag 2100
gaaggtaca gggtcacctt tacagacttc tggggcctgc tgatagagac ctgctgggg 2160
gacgagagaa atgaatgcaa actctcagat cagcgtgctg ctttgagctg cggccagaac 2220
ccctgcccac tctacctcac catcaatgtc aaggatgatg taagcaacca ggalgtcaga 2280
tggttcagat tctcccctca cagagtgggc ctgcagaagt atggggcctt catcccctcc 2340
gagctctctg gctccgagtt cttcatgggg cggctggtag agaggatccc ggaagtctga 2400
atctgtaca tgcctagcct gtggcagcgc atcttctccc tgaacctgct ggaTgcctg 2460
aacctgtcac acacctcgga ggagt.ttttc cacagggtga caaggagaa agtgcaggac 2520
atcgaagcag agccgatcct gctgaaatc cccaaatgtg atgtaaatc cctggagacc 2580
acgttagtgt tcccaggtc atggctgtcc aat.tcttccc gagaatcct taacctcgg 2640
tctctgtgt ctgagtttca caactctctg tctgggctgc agctgcacac caactacctc 2700
cagaatggcc agttctctag gtggaagac acagtctag atggtttccc aaaccagctg 2760
accgagtcgg cgaaccacct gtgctgctg gacactgctg tctttgtcaa ctccagctac 2820
cggcccctcc tcaggccaga gccaaaagcc gatctcatca tccactcaa ctactgtgct 2880
gggtcccaga caaagccctt gaaacaaacc tgtgtagtact gcactgtgca gaacatcccc 2940
ttcccuaaat acgagctgcc agatgagaat gaaaatctca agaatgcta cctgagggag 3000
aaccccaggg aaccgatgac cccactctgt actttctccc cactcatcaa tgacacttcc 3060
cgaaaataca aggcaccaggt tgtagagcga agccctgagg agctggagca gggccagggt 3120
gacatttatg gtcccuaaac tccctatgcc accaaggagc tgacatacac agaggccacc 3180
tttgacaagc tggtgaaact ctcaagtat aacatcttga ataataagga cactctctct 3240
cagctctctg ggtctgcagt ggagaagaag aagcgcctga agggccagtg tccctctctag 3300
gccccagggg gectcccctg ttctgttca gcttcaaca tcagaggtgc aggacctctc 3360
agggctgacc aggttactac gcagccagct ctgctctccg gcaatgggtg tgagcaggtt 3420
ggcctgggct tcttaacgaa aagtaaaaaa ttttaaaaag ttgagaaggt cagaagaaga 3480
gagagaggag ctctgttggg gtlttalacc caactagagtt tcttcaagtg ctccctata 3540
gagaaggtgg tctcatagcc acaggctccc acacatctgt ggagaggaaa agcctgggga 3600
agaggtgggg cccccagaaa cctcgactca gagccagagc ccagggctgg cagccctctc 3660
ctctctgtcc tctacctgct gtggcggccc tagggaaaat cacagaagga cctgagagcc 3720
actcggcgtt tcactggaaa aacacttcaa aat.ttaaggc aattctagtc ttgtgat.tt 3780
tggtttttt tagacggagt ctcaactctg tcccaggctt ggagtgcaat ggcgcgatct 3840
cggctcactg caacctctgc ctcccaggtt caagcaatt 3879

```

<210> 11
 <211> 1623
 <212> DNA

WO 02/063005

PCT/US02/03813

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2884821CB1

<400> 11

```

gcttggctgc ttgtcataaa tggagcgacg taatttcgac ctgtcctttc ccgggagtta 60
gcgatccctc aaccctcgca ctgcgctagt cctaaagagg aaatgtctct acgctgctgg 120
gatgcagccc gcaccctggg gccccgggta ttggggagat atttttgcag ccagtcaga 180
cgtttagctc ccttgccaga taaaaaaag gaactcctac agaatggacc agacttcoa 240
gattttgtat ctgggtgtct tgacagacag gcacctggg atgaatataa aggaaacct 300
aaacgccaga aaggagaag gtaagacta cctccatggc taaagacaga gattccctg 360
gggaaaaatt acaataaact gaaaaatac ttgcgggaat taaatctcca tacagtatg 420
gaggaaactc gatgtcccaa tattggagag tttggggag gtggagaata tggccaccgc 480
acagccacga tcatgttgat ggttgacaca gtacaagag gtgcagact ttgtctgtt 540
aagactgcaa gaaatcctcc tccactggat gccagtggc cctacaatac tgcгааaggca 600
atgcagaaat ggggtctgga tlatgtlgtc ctgacatctg tggatcgaga tgatagcct 660
gatgggggag ctgaacacat tgcгааagacc gtatcatatt taaaggaaag gaatccaaa 720
atccttctg agtgtcttac tcctgatatt cgagtgatc tcaaagcaat agaaaaagt 780
ctctgtcag gattagatgt gtatgcacat aatgtgaaa cagtcocgga attacagag 840
aagttctgag atcctcgggc caatttggat cagtccctac gtgtactgaa acatgcaa 900
aagttctcag ctgatgttat ttctaaaca tctataatgt tgggtttagg cgagaatga 960
gagcaagtat atgcaacaat gaaagcactc cgtgagcag atgtagactg cttgactta 1020
ggacaatata tgcagccaac aaggcgtcac ctaaggttg aagaatata tactcctgaa 1080
aaattcaaat actgggaaaa agtaggaat gaacttggat ttcattatac tgcгааaggca 1140
cctttggctc gttcttcata taaagcaggt gaattttcc tgaaaaatc agtggctaaa 1200
agaaaaacaa aagacctcta aacttcaac aagacctca agatcacaga aatttttaa 1260
attgatccc agttaataac agagtggtg ccagaatgcc tggactgcag tggatgta 1320
ccacctcttt gcttaaaaaa aaaaatgtca atagcaggc atagtgctc acgctgtaa 1380
tccagcact tttaggggcc aaggcgggtg gatcacctga ggtcaggagt tgcгааaccg 1440
ctgcccacac atgtgtaaat cctgtctcca ctaaaaacac aaaaattagt caggcgtgt 1500
agtgggtgcc tghtaatcca gctactcggg aggctaaggc aggagaatca cttgaacct 1560
ggagggggag gttgcagtga gccaaagatc ctccattgcc ctccagcctg ggtgacaaga 1620
gca 1623

```

<210> 12

<211> 2199

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 72852842CB1

<400> 12

```

cagctatacc tcttttgaag attttaagaa cttagcctcc tgaacagctt tcttcgaaa 60
tgaaaagtgg taacagctga tgagtatcaa gaaattatct ctgcaaagg ggcagagtta 120
atgtatttg gaaccctga cagcactcac tggggaaga ctctcaagt aggagaacg 180
gctctacagg tcatgaaact atggaatga gatggttttt gtcaaagat caggatgact 240
tcagaggtgg aaaaattaac ctgaaaaaaa ctcaaggtt acttgaanaa ttagatattc 300
ggtgcagtta tattcatgtg aaacagatct taaagacaaa tgcagggctg aaacaaggaa 360
gaatcaccat agaagaatct agagcaatct atcgaatct cagcacaga gaagaatta 420
ttgagatctt caacacatat tctgaaaacc ggaaaatct tttagcaag aatctggctc 480
aattctgac acaagaacaa tatgcagctg agatgagtaa agctattgct tttgagatca 540
ttcagaaata cgagcctatc gaagaagtta ggaaagcaca ccaaatgtca ttagaagtt 600

```

WO 02/063005

PCT/US02/03813

```

ttacaagata catggattca cgtgaatgto tactgtttta aaatgaatgt agaaaagttt 660
atcaagatat gactcatcca ttaaagatt atttlatctt accttcacat aacacatatt 720
tggatctgta tcaattattg ggaccaagt accttggggg atatgtaagt gccctgtgta 780
aagatgcccg ttgtttggag attgactgct gggatggagc acaaaatgaa cctgttgtat 840
atcatggcta cacactcaca agcaacttc tgtttaaact tttatccaa gctatataca 900
agtatgcatc catgacatct gactaccag tgggtcctcc tttagaaaat cactgtctca 960
ctgcccaca agaaagtaat gcagacaatt tgcaggctac ttttggagag tccttgttt 1020
ctgattgctg tgatgatttt cctgatact taccatcacc agggcacta aaattcaaaa 1080
tattagttaa aataagaaa ataggaacct taaggaaac ccatgaaaga aaagttctg 1140
ataagcgtgg taagtgagg gaatgggag aagaagtggc agatggagag gaggaggagg 1200
aggagaagga gaggaggagg gaggaggagg aggataaatt caaagaatca gaagtattgg 1260
aatctgtttt aggagacaat caagacaagg aaacaggggt aaaaaagtta cctggagtaa 1320
tgcttttcaa gaaaaagag accaggaagc taaaaatlyc tctggcctta tctgacttly 1380
tcattatac gaaagctgag aaattcaaaa gctttcaaca tccaagatta tatcagcaat 1440
ttaatgaaaa taattctatt ggggagacac aagcccgaat acctcaaaa ttgcgagtc 1500
atgagtttat ttttcacacc aggaagtcca ttaccagaat atatcccaaa gcaacaagag 1560
cagactcttc taattttaat ccccaagaat ttgggaat atgttgcata atgttggct 1620
taaatctcca gacccttgg ctgccatgag atctgcaaaa tgggaaat ttggtaattg 1680
gtggtctctg atatatattg aaaccacatt tcttaagaga gagtaaatca tactttaacc 1740
caagtaacat aaaagagggt atgccatta cacttacaat aaggtcctac agtggatbcc 1800
agtgcctct tactcattca tcactcaaca aaggtgattc attagtaatt atagaagtt 1860
ttggtgtccc aatgatcaa atgaagcagc agactcgtgt aatataaaaa aatgcttata 1920
gtccaagatg gaatgaaca ttcacattta ttattcatg cccagaattg gcattgatac 1980
gtttgtgtg tgaaggtcaa ggtttaaag caggaatgat atttcttggg caataactt 2040
tgccactct atgcatgaac aaaggttato gtctattcc tctgttttcc agaaggggtg 2100
agagccttga gectgttcca ctgtttgttt atgtttggtg ctccagataa cagtaatga 2160
laaatgacat atcattagct atgcatcgca ataaaaacc 2199

```

```

<210> 13
<211> 6326
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7484271CB1

```

```

<400> 13
aggaaagggga ggaggggggt ggatattatg atgcagctca cattgaacac tctcttctct 60
gttgtttcca caccagctat tacgtatatt gtcaccgtct tcaactggga tgtccggggg 120
gctggtacca atatacgtaa tagctggtgt tgaaccagg aaggggagga ggggtggga 180
tattatgatg cagctcacat tgaacactct ctctcctggt gtttccacac cagctattac 240
gtatattgtc accgtcttca ctggggatgt cgggggggct ggtaccaaat ccaaaactca 300
cttggtcatg tatggggcca gagggataaa gaacagtgag aaaaacttcc tggagggcgg 360
cgtgtttgac cgagggcgca cggacatctt ccacatcgag ctggctgtcc tccttagccc 420
cetgagtcgg gctcctctcg ggcattggca tgggggtgic aacagaggct ggttctgtga 480
gaaggtgggt attctgtgcc ccttcaactg tatccagcag accttccctt gtgcaactg 540
gctggatgag aagaagcgg atgggtgat cgaagggcag ctctatgaga tgggtctctc 600
caggaagaag cggctgaaaa aatcccttgc gtcctctggt gtctggacaa cggactataa 660
gaaagctggt accaactctc ccatcttcat ccagatttat gggcagaagg ggcggacaga 720
tgaattctct ctgaatccca acaacaagt gttcaaaccc ggcataatcg agaagtttag 780
gattgagctc ccggtctctg gcaggttcta taagattcga gtatggcatg ataaaaggag 840
ttctgttctc ggtggcatt tagaaagat gaccctgatg aacactctga acaaaagcaa 900
gtacaactct aattgcaacc gctggctgga tgccaatgag gatgacaatg agatagtgag 960
gaaatgact gcagaaggcc caacagtcg caggtatcag ggcagtcgcc ggtaccatgt 1020
gactgtgtgc acaggtgaac ttgaagtgcc tgggaccgat gccaacgtct atctctgct 1080

```

WO 02/063005

PCT/US02/03813

```

ttttggtagt gttggggaca cgggggaacg gctgctctac aactgcagga ataacacaga 1140
cctgtttgaa aagggcaatg ctgacgagtt cactatcgag tctgtcacca tgcggaatgt 1200
gaagcgggtg aggatcagac acgatgcaa aggctccggc agcggtcgtt acctggacag 1260
agtctctggg agagggaggg ggcagcttga gagcgacaac gttggagtcc catgtctcaag 1320
gtggttggac aagataaagg atgatgggca gctggtccga gagttgctac ccagtgcacag 1380
cagcgcgaca ctgaagaact ttctgataca cctcagcttg aagactgggg atgtctctgg 1440
ggccagcaag gattctagag tctacatcaa gctctatggg gataaatctg acaccatcaa 1500
gcaagttctt cttgtctctg acaacaacct caaagctac tttgaacgtg gccgggtgga 1560
tgagttccac ctccgagacc tgaacattgg aatatcaaac cggcttggta ttgggcatga 1620
cagcaactgg atgeatgcca gctggttcct gggcagcgtt cagatccgtg tgcccogtea 1680
aggaacagca tacacctttc ccgccaaccg ctggctggac aagaaccagg ctgacggggc 1740
cctggagggt gagctgtatc ccagcgaggt ggtggagatc cagaaattgg tccactatga 1800
ggttgagatt tggacaggag atgtgggtgg cgcagggcacc agtgcctgag tctacatgca 1860
gatctatgga gagaaggaca agacagaagt gctctctccc tccagccctt caaagtttt 1920
tgaacggggc tccaaggaca catccagctt tgaggcggcc gacgtggcgg aggtctataa 1980
gctccggctc gggcacacag cggaggcttt tgggcccagc tggttcgtgg acaccgtgtg 2040
gctgcggcac ctggtgggtg gggaggttga cctcaecgag gaggaggagg cccggaagaa 2100
gaagggagaag gacaagctgc ggcagctgtc caagaaggag cggctgaagg ccaagctgca 2160
gaggaagaag aagaagagga agggcagcga cgaagaggac gagggggagg aagaggagtc 2220
gtcctcatca gaggagctct cgtcaagaga ggaggagatg gaagaagagg aggaagagga 2280
gagatltggg ccggggatgc aggaggtgat tgacagcac aagttcgaag cccaccgtg 2340
gctggccggg ggaagggagg acaacgaact tgtctggagg ttggtccag ctggcaagcc 2400
gggtcctgag cgaaacacct atgagttca ggtggtcac gggaaatgtc ccaagggcgg 2460
cactgatgct aactctacc taacctcta cggcaggagg tatggagaca cgggcaaac 2520
accctggaag aagtcagaca agtccaacaa atttggcag ggcagacag acacctcaac 2580
catctatgcc attgacctgg gggccctgac caagattcgg atctgcacag acaacacagg 2640
caacagagca ggtggttcc tggacagaat agacattact gacatgaaca acgagatcac 2700
gtactacttt ccatccaac gttgctggc agtggaggaa gatgatgccc agctgtccag 2760
ggagctgttg ccagtgatg agtctctatg gctgccacag agcgaggagg gtgggggagg 2820
cggtagaac aaccctctc acacctctgc cctggagcag aaagataaat ctaccacatt 2880
ctcagtgacc ataaagactg ggglttaaga gaatgcgggc acagatgcta atgtcttca 2940
cacactcttt ggcacacagg atgacactgg aatgacctcc ctgaagtctt ccaagacaaa 3000
cagcgataag tttgagaggg acagcattga aatcttcacg gttggagcgc tggatctggg 3060
agacctgtgg aagttccggc ttggccatga caacacagc aagggcccag gctggtttgt 3120
agactgggta gagtgatg ccccatctct tgggaagtc atgacgttcc cctgtggcgg 3180
ctggctggcc aaaaagaa agcaggggtc catcaltcaga gacctctccc atgcagagct 3240
tcagacgagg ctgtacacac catctgttcc ttacgagatc accctctaca ccagtgatg 3300
ctttgctgct gggacagatg ccaacatctt catcatcctc tatggctggc atgcccgtgt 3360
caccocgagc aagtatctgt gtaccaaaa gagggaaacg aagcagttct ttgagaggaa 3420
gtctgcctcc cgtctcatcg tagagttaga agatgtggga gaaatcattg aaaaaatcg 3480
gattggccat aataacacgg gcatgaatcc tgggtggcag tgcctctcag ttgacatccg 3540
caggctctcc ceggataaag acggtgcaga gacctgact ttcccacgcy atcggtygct 3600
tgccacctct gaggatgaca aaaagaccaa tcgagaactg gttccatag acatcttca 3660
tgagaatata atgaagatg ggtccttacg gcaagtctac aaggaagtag aagagcctct 3720
ggacattgtg ctgtactcgg tgcagatctt cacagggaac atctctgggg cagggacgga 3780
tgccaaggtg tacatcacca tctatgagaga cctcggggac actgggggagc gataccttg 3840
caagtcagag aaccggacca acaagtcca gagaggaaag gctgacacct tcatcatgca 3900
ggccgctgac ctaggcgtca tctacaagat caagctccgc catgacaact ccaagtgtg 3960
cgcagactgg tacgtggaga agttggagat ctggaatgac accaacaggg acgagttcct 4020
gttccatgac gggcgtctggc tctccctgaa gaaggaggat gggcgactcg agaggctct 4080
ttacaggaag gactacactg gggaccgca cagcaactgc agcagcctg ctgacttctg 4140
ggagatgccc ctgagctcca agatggcga tctcagatc agcacagtga cggggccca 4200
ggctgactac gttcaagagg gcccattat tcctctatct gtgtcagta ccactgggaa 4260
gcacaaggac cggccactg acagccagc cttcatctt ctcacgggg aggatgatga 4320
acgtagtaag cgcactcgtt tggactacce ccgagggaa aggggttca gccctggctc 4380
tgtggaggag ttctaogtcc caggcttga tgtgggacc atcaagaaaa tagagctggg 4440

```

WO 02/063005

PCT/US02/03813

```

ccatgacggg gctcccctg agagctgctg gctggtggaa gagttgtgtt tggcagtgcc 4500
caccagggc accaagtaca tgttgaactg taactgctgg ctggccaagg acagaggcga 4560
cggcatcacc tcccgtgctc tcgacctctt ggatgctcgt gttgtgaaca ttgggtgaa 4620
ggttctctat gaaatgacgg tgggacagg ggatgtgtt ggcggggca ctgactcaa 4680
catctctcat accctctacg gcatcaacgg gaggcacagg gagatgacg tggacaaaa 4740
gaaagccagg ttgagcggg agcagaacga caccctcacc atggagatcc tagacattgc 4800
tcattctacc aagatgcgga tccggtatga tggcctgggc agtggccgg agtggttcct 4860
ggagaggatc ctactgaaga acatgaacac tggagacctg accatgttct actatgaga 4920
ctgctatcc cagcggaaag gcaagaagac cctggtgtgt gaaatgtgt ccgttatoga 4980
tgaggaagaa atgatggagt ggaacctcta caccctgcca gtttaagacca ggcacatcc 5040
gggagcaggc actgatgcca acgtgttcat catcatcttc ggggagaacg gggatagtg 5100
gacctggcc ctgaaagcagt cggcaacctg gaacaagttt gaggggaaca acacggcac 5160
attcaacttc cctgacatgc tgagcttggg ccacctctgc aagctgaggg tctggcacga 5220
caacaaagg atatttctct gctggcactt gactatgtc gatgtgagg acaactccc 5280
cgacgagacc tccaacttcc agtgtgactg ctggctctcc aagagtgagg gtgacgggca 5340
gacggtccgc gacttgcct gtgcaacaa caagatctgt gatgactgg aagagaccac 5400
ctacgagatc gtcatagaaa cgggcaacgg agcgaaacc agggagaac tctggctcat 5460
cctggagggc aggaagaacc gatcaaaa gtctctcatg gaaaaattct ctaggcagcg 5520
ggcctttagg aaggggacca cagacacgtt tgagtttgac agcatctact tgggggacat 5580
tgccctccct tgtgtgggcc accttgccag ggaagaccgg ttatcccca agagagaact 5640
tgccctggat gtaagacca tcaccatcac cgagatggag tacggcaatg tglactlct 5700
taactgtgac tgcctctacc cctcaagag gaagaggaag tactcaagg tattcgaggt 5760
taccagagc acagagagct ttgccaagaa ggtccagagc ctgggtcccg tcaagtaga 5820
agtcatctgt acaacaggct atgaccaggg gccagccact gatcccaag tcttctgac 5880
catcttlygg gccaacggag acacaggcaa gcgggagctg aagcagaaaa tgcgcaacct 5940
cttcgagcgg gccagcacag accgcttctt cctggagacg ctggagctgg gtgagctgcg 6000
caagtgccg ctggagcacg acagcagtgg ctactgctca gctggctgg tggagaaggt 6060
ggaggtcacc aacaccagca ccgctgtgg caccatcttc aacttgcca ggtggctgga 6120
caagaagcgg ggggatggac tcacctggag agacctcttc cctctgtct gagggctag 6180
ggccccacc ctctactga gatcccaaa tctcacatt ctgcccctca ccttggcgtt 6240
cagcagccct tcaaacctc tagcattggc actgggggct agcagtcac tgagaacttc 6300
atgggtctct gctcccacc ctacc 6326

```

<210> 14

<211> 1561

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 7474074CB1

<400> 14

```

gctgaccag tactcagctt gactgacatt ttcttatttc agataataa agaccatgcc 60
ttgaattctc tcagctaagt gtaaaggatt ccttcagaga tttatttatt ccgagaatag 120
agaccttct gatgatgtat acaaggaaca acctaaactg tgcagacca ctgtttgaa 180
aaataaactc acttaattgt aatttcaaca cacaaaagaa aacagtctgg cttattcaag 240
gatacagacc agtaggctcc atcccattat ggttcagaa cttcgttaagg attttctga 300
atgaagaaga tatgaatgta atgtagtag actggagccc ggggtctaca acttttatt 360
ataatagagc agttaaanaac accagaaaag ttgctgtgag tttgagtgt cacattaana 420
atcttttgaa gcatggtgca tctcttgaca atttctatt cataggtgt agcttagggg 480
ctcatatcag tggatttgtt ggaagataat ttcatggtca acttgaaga ataacaggtc 540
tgccccctgc tggccaagg ttctccagaa aaccaccata tagcagatta gattacacgg 600
atgcaaatgt tgtggatgtc atccattctg actccaatgg tttaggcatt caagagccct 660
tgggacatat agatttttat ccaaatggag gaaataaaca acctggctgt cctaatcaa 720
ttttctcagg aattcaattc attaaatgca accaccagag agcagttcac ttgttcatgg 780

```

WO 02/063005

PCT/US02/03813

```

catctttaga acaaaactgc aattttatt catttccttg tegtteatac aaagattaca 840
agactagctt atgtgtggac tgtgactgtt ttaaggaaaa atcatgtect eggtgggtt 900
atcaagccaa gctattttaa ggtgttttaa aagaaaggtat ggaaggaaga cctcttaga 960
ccactgtgtt ttggatatac agtggtaacat atccattctg tacctattat ttgtttctca 1020
gtataattgt tccagataaa actatgatgg atggctcgtt ttcattttaa ttattaaatc 1080
agcttgaat gattgaagag ccaaggcttt atgaaaagaa caaccattt tataaacttc 1140
aagaagtcaa gattcttgct caattttata atgactttgt aaatatttca agcattgggt 1200
tgaatattt ccagagctca aatctgcagt gtccacatg cacatacaag atccagagtc 1260
tcagttaaa atcacttacc tacccaaaa gaccaccatg ttgcaggtat aatattgtac 1320
ttaaagaaa agaggaagtg ttctttaatc caaacacatg tacgccaaag aacacataag 1380
atgctctctt ccatcaaatg cacttgcttg tgaatlaaty gacttlylaaa tgaacaatg 1440
caatcagctt tttataatc actgttcaat ttgagatcca agtatttcta ttctctgtaa 1500
aaaaatttaa gaatcaaaaa taaagaaaat aaaaagtcca tacagttaaa cattcaaaaa 1560
a 1561

```

```

<210> 15
<211> 4941
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 72024970CB1

```

```

<400> 15
attccttggg ggcctggag ggtggatagg ctggcctggg ggccatcagg acagcaggtg 60
acggtcagcg caatgccagc cggcctggg cacagccctg tggggcttc ggagggccct 120
gaggaggag agaaagaggc agagagagaa agcccaccag gaggctctgt cgcagcgcct 180
gccactgcct gacctccgtt gcccaagggc cgggtgggct ctgtggcctc cgtgaagcag 240
gcccggctgt cgtcaggcca tgtctgttcc atggccctcc cccgacagcc ggaccaaggg 300
aacggtggcc tggctgggg aggtactcct ctggttggag ggagtgtgtt gctgtcttca 360
gagtgccagc tggccctcct ggtggagcgg tgcattgggt ccatgcaaga ggggatcgag 420
atggtgaagc tgcgtgggg ctccaagggc ctggtccgct tctactact ggaagagcac 480
cgtctctgca tccgtggag gccctcagc aagaacgaga aggccaaagt ctccatcgac 540
tccatccagg aggtgagtga gggggcagc tcggaggtct tccagccta cctgaagcc 600
agcttcgacc ccaactgctg ctccagcact taccacggca gccaccgca gtcctggagc 660
ctggtctcca ccagcagcga ggtggcggc acctgggtca ctggcctgcy ctacctcatg 720
gcccgcacca gcagcagcga cagcctggct cgcggccagc gcaccagga ccagtggctg 780
aagcagacgt ttgacgagcc cgaacaagac ggggatggca gcctgagcat tggcagagtc 840
ctgcagctgc tgcacaagct caactgaaac ctgccccggc agagggtgaa gcagatgttc 900
aggsaagcgg acacggatga ccaccaaggg acgctgggtt ttgaagagt ctgtgccttc 960
tacaagatga tctccaccg ccgggacctc taactgctca tgtgacctc cagcaaccac 1020
aaggaccacc tggatggcgc cagcctcagc cgtctctgc aggtggagca gaagatggcg 1080
ggtgtgaccc tggagagctg ccagacatc atcgagcagt ttgagccatg ccagaaaaac 1140
aagatgaagg ggtctctggg caltgatggc ttcaaccaat acaccaggag ccctgctggt 1200
gacatcttca accctgagca ccacctgtg caccaggaca tgaccagcc gctgagccac 1260
tacttcaata cctctgacca caacaactac ctctgggtg accagctcat gtcacagtca 1320
cgggtggaca tgtatgcttg ggtcctgca gctggctgcc gctgctgga ggtgagctgc 1380
tgggatgggc ccagcgggga gccctatgtg caccatggct acactctgac ttccaagatc 1440
ctctcaag agtcatlga aaccaacaac aaatgtcct tcatcaagaa tgagtaccca 1500
gtgatctctg ccatcgaaaa ccaatgcagt gtcatccagc agaagaaaat ggcccaglat 1560
ctgactgaca tcttgggga caagctggac ctgtcatcag tgagcagtga agatgccacc 1620
acactccctt tccacagat gctcaagggc aagatcctcg tgaaggggaa gaagctccca 1680
gccaacatca gcagagatgc ggaggaagcc gagggtgtctg atgaggacag tgcgtatgag 1740
attgacgatg actgcaagct cctcaatggg gatgcaccca ccaatcgaaa gcgtgtagaa 1800
aaactgcta agaggaact ggattccctc atcaaaagat cgaagattcg ggaactgtgag 1860

```

WO 02/063005

PCT/US02/03813

```

gacccccaa acttctccgt ctcccaactg tccccactg gaaagctcg acgcaagagc 1920
aaggctgaag aggacgtgga gtctggggag gatgccgggg ccagcagacg caatggccgc 1980
ctcgtcgttg gaagcttctc caggcccaag aagaagggga gcaagctgaa gaaggccgac 2040
agcgtggagg agggagatga ggttcaggac tccccgggag gccagagccg agggccgacc 2100
cggcagaaga agaccatgaa gctgtcccgg gccctctctg acctggtgaa gtacaccaag 2160
tccgtggcca cccacgacat agagatggag gggcggtcca gctggcaggt gtctctctc 2220
agcagacca agcccacca gatctctcag cagaagccgg ccagctacct acgcttcaac 2280
oagcagagcc tctcccgcac ctaccctccc tctaccctg tggactccag caactacaac 2340
ccgagccctc tctggaacgc cggctgccaa atggttgccc tgaactacca gtcagagggg 2400
cggatgctgc agctgaaccg agccaaagttc agcgcacaag gtggctgggg ctacgtactc 2460
aagcctgggt gcactgtgcca gggcgtgttc aaccccactc cggaggaccg cctgcccggg 2520
cagctcaaga agcagctggt gctccggatc atcagtgccc agcagcttcc caagcccgcc 2580
gactccatgc tgggggaccg tggggagatc atccgacctc ttgtggaggt gtagalcatc 2640
gggtccctgg tggactgcag caggagcagc acccgcgtgg tggacgacaa cgggttcaac 2700
cccacctggg agggagacct ggttttcacg gtgcacatgc cggagatcgc gctggtccgc 2760
ttccctgctc gggaccacga tcccactggg cgtgacctca ttggccagag gacgctggcc 2820
ttcagcagca tgatgccagg ctacagacac gtgtacctag aagggatgga agagccctcc 2880
atctctgtgc atgtggctgt cagtgcacac agcggtaagg tcaagcaggg tctgggctca 2940
aaagccctc tctcccagg cccaagccc ggcctgcctg acagtcatgc tgcggggcgc 3000
ccccccgccc ggcctccctg tagccagcgg atcctgcctg gccagccagc cgcctccgac 3060
aaagaccaga agcccggccg caggggcttc ccggagctgg tcttgggtac acgggacaca 3120
ggctccaagg ggggtggcaga cgaatgtgtg cccccggggc ccggacctgc tccggaagcc 3180
ccagcccagg aggggcccgg cagcggcagc ccccgaggta agggcccagc tgcgtggca 3240
gagaagagcc ctgtgcagat gggcccctg cgtgtcctgg accgcccggc gcctgctggg 3300
atggccgcca catgcatgaa gtgtgtggtg ggtcctcgcg ccggcgtgaa caccgggggc 3360
ccgacagagg agcggccacc cagcccgggg cctgcaagca ggcaggcagc cattcgccag 3420
cagcccgggg cccgggctga ctcaactggg gcccccctgc ttggcctgga cctcaagct 3480
atcccgggga gaagcagaga ggccccaga ggtcctgggg cctggagcca ggttcaagcc 3540
ggtagcggct ccatgtctc ggactccagc agcccagaca gccgggcat cccgaaagg 3600
tccccccgct ggcctgaggg tgctgcagc caaccggggc cctgcaggg agagatgagt 3660
gcctgttttg ctcaaaagct ggagagatc agggatlaaa ccccattgt ctccgcctt 3720
aggaactgag agcggcgagt gacagacacc cgcctctctc ccagcagcg gccactcccc 3780
ccactgtgca gccggaaac catcgtgag gagcccgccc caggccctgg tccccccca 3840
ccagggctgt tccccccag ctcttctcag ggagccccc cataccacc agggaccaga 3900
gccaatgtgg caagcccct agaggaact agggagcccc gagacagcag gctcggccg 3960
tgcaacggcg agggcccggg cgggcbatac gagaggccc ccggcagcca gacggagcc 4020
aggaagcagc cccggacct gggccacctg cccgtgatta gaagggtgaa gactgaggg 4080
caggtgccca cggagcccc gggaggggtg cggccctggy ccgctcctt tccagctct 4140
gcccgtactc ccgatccac gggcagtgac ccgctgtggc agcggctgga gccatgtgyc 4200
caccgagaca cgtttcctc ctctccagc atgtcatcca ggcactgtg cattgacctc 4260
tccctgcccc gctgggccc gggccgagc cgtgagaacc tgcgtggagc ccacatggga 4320
cgctgcccc ccaggccca ctccgctcgc gctgcccgc cagacctgce acctgtaec 4380
aagagcaaat caaaccccaa ccttcgggct acaggccagc ggcctccat acctgacga 4440
ctgacgcca ggtccctggc cccaaggatg gctggcctcc ccttcgggce tccctggggc 4500
tgcttctcc tgggtggcgt gcaggactgc cccgtggctg ccaagtccaa gagcctgggc 4560
gacctcact ctgatgactt tgcccctagc tttagggggc gctcccgag actgagccac 4620
agcctgggccc tcccggagg gacacggcgg gtgtcggggc cagggtgaga cgggacaccc 4680
tgacagagca cctgcgctgg ctcaactgtct tccagcagcc agggacatc acgtcaacca 4740
ccagctggg cccggctggg ggggggtgg caggggccc ggttttgtgc ggcctcctc 4800
ctcccagcgc acagcggctg cgtgcattgc agcggccgca ggcggagcg ccgaaactga 4860
ggctggggcg gggcccagc gggggggccc cggggccgct tgggccaagt gtgtttccgc 4920
tcaggctgg ctcccttacc t 4941

```

<210> 16
 <211> 4159
 <212> DNA

WO 02/063005

PCT/US02/03813

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 6131380CB1

<400> 16

```

tctcgggtctt cgggtgcgaga tcaacttgtt cctggagaca gtgtacagag cttggaattc 60
tctgaggggt tctgagagat gcgcattca agccagggg ttgaatagct tgactcttca 120
tttcagcagc acgattgacc cctcagtgga tcagcagcga ttcattccac acgtatttag 180
ggtccttggg gaattttgtc atggttattt aaggaacctt gctcagaagt cccaacttgc 240
agttcccocat cgcggggaag gcttggaact caagatgatt ataaaggaat atcggattcc 300
tctgccaatg accgtggagg agtaccgcat cgtccagctg tacatgatac agaagaagag 360
cgttaacagag acatattggcg aagcagcggc cgtggagatc ctggagaacc ggcctgtcac 420
agatggccca ggcggctctg ggcagtacac acacaagggt tatcatgtgg gcctgtcac 480
tccagctctg ttcgctcca tctgcacca ggagccctg cgggtgtgtg aggagtctt 540
gaatgectac ccttacaacc gaaccaggtt cacctgtcct ttcgtggaga aattctccat 600
cgacattgaa accttttata aaactgatgc tggagaaaac cccgacgtgt tcaactcttc 660
tctctgggaa aagaaccagc tgacaatcga ctcatcgac atgtcaaaag accctgtgcc 720
cacaacagag tataagcagc aagagggacc caagctgttc cagtcaacca agaccagcg 780
ggggcccctg tccgagaact ggatcgagga gtacaagaag caggtcttcc ccatcatgtg 840
cgatacaag ctctgcaagg tggagtctcc ctactggggc atgcagtcca agatcgagag 900
gttcatccac gacaccggac tacggagggt gatggtcggc gctcaccggc aggcctggtg 960
ctggcaggac gattgttatg ggtgatgact ggagaaatc cgggagctgg agaaggagcc 1020
acagctcatg ctttcccgtc agatggccca gttcaatgag gatggtgagg aggccactga 1080
gctcgtcaag cagcaagccc tctccacca gacctctggg gagccccggg agcccagcag 1140
cagcaatggg gagcccctag tggggcggcg cctcaagaaa cagtggtcca catcctccaa 1200
gtcgtctcgg tcttccaagc ggggagcgag tcttcccgcc cacagcatct cagagtggag 1260
gatgcagagt attgccaagg actcggatga gagctcagat gatgagttct tcgatgccca 1320
cgagagcctg tccgacacag aggaatgtt ccccaaggac atcacaagt ggagtcccaa 1380
tgacctcatg gacaagatcg agagcccaga gccggaagac acacaagatg gctatgtacc 1440
ccaggtggcc cctgactca ggtggcctc cagtggtggg cagctgaaca tcataagaga 1500
cgaggttagc cagccgctgg ctgcaccgcc ctccaagatc cacgtctgc tactggtgct 1560
gcacggagcc accatctggt acacagggcc cggggaccoc agtccaaga agggcgtatc 1620
taacaccatc gccaacgtgt tcyacaccgt catgcygctg cactacccca ggcgctggg 1680
ccgecttggc atccgctgg tgcctgccc gccctctgc tctgacgect ttgcccctgg 1740
ctccaacctc agcccctaca gccatgacga aggcctgtct tccagcagtc aggaccacat 1800
tcccctggct gccctcccc tgcctggcca ctctctcccc cagtaccag aggcagltgc 1860
cacagtgatt cagcgagcca accttgccca tggggacttc atcaagtccc agggggcaat 1920
gacctcaat gggcaggctc gctgatgg ggactcgtc gggggcatcc tggcattlga 1980
tgcctgtgac tacagtaacc agccggtgct tgagagtcag agcagcagcc cccggggcag 2040
cgtggtcagc atgcaggaca atgacctgct gtccccggc atcctgatga atgcagcaca 2100
ctgctcgggt ggtggcgtg gcggcgtgg cgtggtggc agcagtgttg gtggtggcag 2160
tagtggtagc tccagcctgg agagcagtcg gcaactgagc cgaagcaacg tcgacatccc 2220
ccgagcaacc ggcactgagg accccaagg gcaactgccc cgaagagga gccactcatc 2280
caactcagag ctggatacca tccagcagca ccaggccttc ctgtccagcc tccatgccag 2340
cgtgctgagg actgagccct gctcacgcca ttccagcagc tccaccatgc tggatggca 2400
aggtgccctg ggcaggtttg actttgagat caaccgacct ttcctcttgc ggtgccgct 2460
gggctggtc ctggccttga ggaagactgt catcccagcc ctggatgttt tccagctgcy 2520
gccggcctgc cagcaagtct acaacctctt caaccgccg gaccgctcag cttcacgct 2580
ggagccgctg ctggaagggc gcttcaagc cctgcccctc ttcagctcc cccgtacca 2640
acgtaccctg ctgggggatg gcttctccac gctcgtggat gctgtccaga cccacaatgc 2700
agccttccaa gagctggcg ccccctctc gccgggcaat gccctgccca gtcgtgctt 2760
ccgcccagcc agtgagalca gcactgccag ccaggtgtca ggcattgctg agagctaac 2820
ggcatccagc atcggccagc tgcgtcaaa gtggtggggc cagaagcga tcgactaac 2880
cctgactgac cctgagcctc tcaaggcctt ccccaggtg gctctgcctc acctcttca 2940

```

WO 02/063005

PCT/US02/03813

```

cgccagctac tgggagtcac cagacgtggt ctcctttctg ctgagacagg tcatgagcca 3000
tgacaactcc agcatcttgg agctggatgg caaggaagtg tccgtgttca cccctcaaaa 3060
gccaaaggag aatgggcagc gcaagcggac ccacgtgaag ctgcgggaac tgacggccaa 3120
ccaccggatc aatgatgcc ttgccaatga ggaaggcccc caggttctga cgggcaggtt 3180
catgtatggg cccctggaca tggcaccct gactggggag aaggtggatg tgcacatcat 3240
gaccaccgag cctcaggcga agtgacctc cctggatacg ctggtgacca acaacagtgg 3300
gggtgtctcc tacaccatcc ctgagtegea ccgctggggc gtgggtgtct accctatcaa 3360
gatggtggtc agggagagacc acacgtttgc cgaagctaac aagcagcagg tgccaagg 3420
cacagagttc tgggtcttca gcctcgagcg ttcctttgcc gctagcgtgt ccatcatggg 3480
cagcgacccc aaggtggggg ccggggccgt ggacgtgggt cggcactggc aggaacctgg 3540
ctaccctacc atctacgtga cggggccggc cgaatgcag aagcagcagg tgggtggcgt 3600
gctggccag cacaacttcc cccatggcgt ggtgtccttc tglgagcggc tgggtcatga 3660
cccgtcggg cacaaggcca acttcttcaa gctgtctacc tccgagctgc acctgctcgt 3720
gcacgggccc tatggctcca ccaaggacct ggcgtgtatc agcgcatta gccctgcccc 3780
catgcagatc tacatcgtgg gccggccca caagaagtg cagcagcagt gccagttcat 3840
cacggatggc tacgcccacc acctggcgca gctgaagtac agccaccggg ccggccccc 3900
tcgcaacacg gccaccggca tggcctcggc caaggcagc ttcggctcgc ccggccagg 3960
cgactttctg cgtcccggga accactctgt tccgaccatc tccgcccagg ccagcggggc 4020
cagccaccgg cagcagcggga cacagagcca ggcggtggc gagcagcggg gccagcggag 4080
catgagtgtg gcggccggct gctggggccc gcacctgact ggcgctctgg agccgggggc 4140
agcccgggc cccaagtac 4159

```

```

<210> 17
<211> 1481
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> incyte ID No: 643681CB1

```

```

<400> 17
atttgtgtaa tgtctttgtc tccattagac ctttattatt tgatttacgt ctggtottga 60
actcctgacc tcaggtggtc cacccgcctc ggcctcccaa agtgctggca ttacaggcgt 120
gaaccaccgt gccctggccg aagcttttaa aaaaataaagt gattctactc ttctaagctt 180
acagagacca gaccaggtga atgtcaactgg gaaaaatcaa gatggtaact ctctgcatta 240
tcccgcgaga cactgtatct tatgcattca tgcctaggat acagttgtaa aaitaanaag 300
tttagagggc agatgcaatt gtggcaagtg acctgccaat aaagcagtg cagctataga 360
agctggcata ggtatatact taatgggtgt ttctccctgg gcttctcttt ttgttgttt 420
ttttccccta tattcagaag ctcttgaga agtgataaac acctccagct ttctaacatc 480
ctccccacac catctcaaca tatccatctc ccagatcca tctgcattca gctaaggggc 540
ggaaactgac ctagtgcctg tgttgcagac catttctgag gtctccacca tccaaggagg 600
cacagccgctc attactgtcc tccatgcctt cagcagcccc cctccagctc aaggtacata 660
ccaccctctc tgcgcgcctc ccaccctcgg caccagggtc ttctgtctct tatgtctaaa 720
gggatcactc atattlaact gcctcagtga cctaacctct ttcttctcat gtgccagatg 780
ttaagatgaa ggaggaatac aacacatact caagcctcag cctgtttagt tgttttcact 840
ggggctcgtc ttctgggac ggtatttatt atcagactgg caagcctaac tccataggtt 900
tacagggaagt agggatattt ttataaaaaca atgtgtctct ccccacattt tgcatagtta 960
atatttgctt ctaacaattt gcaagctgtt cactttttcc tcatttctct ctaagtgtga 1020
ggctttgttg gaggggacag agcacaggaa cagccttgac agtctgtaat tattgtacag 1080
atattttaat agcatalaaa laagtatatt cctctttatt tgaacaaaa atgatcagac 1140
actgoccttt gtgtgtttgc tgccctgtgc atcctttttt aaaaagactg ttacatatta 1200
aaatagtgta catatataaa tattacctct ttgtgtatc agttgtgata gagactgaag 1260
attttatttt ttgtgtgott ttataagaaa aaaaattaat acactaaga atcttctga 1320
tgtgattgta atglacctat gtaacttatt tactttttaa tgttctctg tatctttaa 1380
ccttttatta aataagttt taaaattaa aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1440

```

WO 02/063005

PCT/US02/03813

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa c

1481

<210> 18

<211> 1841

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 6897474CB1

<400> 18

```

gctctgctca gttctctgtg cctgtctccc tccagcactg cggaggttct ctgccgagc 60
caaccagaaa taccoccttg aagctggaat cctgcaacaa tggcccaggg tgcctctgg 120
atcctactcg gattgctact gtggtcagac ccagggacag cctccctgcc cctgctcatg 180
gactctgtca tccaggccct ggctgagctg gagcagaaa lgccagctgc caagaccaga 240
cacacagctt ctgctgtgct gatgctagct ccaaaactctg gcccccacaa tgcctctac 300
cacttctctg tgggggcatg gagcctcaat gctacagagt tggatccctg cccactaacg 360
ccagagctgt taggcctgac caaggagggtg gcccgacatg acgtacgaga agggaaagaa 420
tatgggtggtg tgctgacacc tgatggctcg accytggctg tggagcctct gctggcgggg 480
ctggaggcag ggctgcaagg gcgcagggtc ataaattlgc ccttggacag catggctgcc 540
ccttgggaga ctggagatag ctttccagat gttgtggcca ttgctcaga tgttaagacc 600
acctctccc caggactcag ggtggctctc ccagatgcca ccactgcaga tattggagcc 660
aacactccag atgctacaaa aggtgtcca gatgtccaag ctctctgccc agatgcaaaa 720
gccaaagtccc caccgacct ggtggacagc ctctgtgacg tcacctggc tggaaacctg 780
ggcctgacct tctccgagc tccctcagacc cagagccatc cagacctggg aactgagggc 840
tgctgggacc agctctctgc cctcggacc tttaagcttt tggacctcaa ggcctctctg 900
ttaacctagg ccttctcaa tggcgcctcg gatgggtoa tcttggaga ctacctgagc 960
cggactcctg agccccggcc atccctcagc cacttgctga gccagtacta tggggctggg 1020
gtggccagag acccagggtt ccgcagcaac ttccgagcc agaacgtgct tgcctgact 1080
tcagctcca tctggccca gcaggtgtg ggaaccttg tcttctaca gaggtggag 1140
ccagtacacc tccagctca gtgatgagc caagaacagc tggcccaggt ggcctgcaat 1200
gctaccaagg aattcactga ggcttctctg ggatgcccg ccatccacc ccgctgccgc 1260
tggggagcgg cgccttatcg ggcgcgccg aagctgctc agctgcccct gggattcttg 1320
tacgtgcatc acacctagct gcctgcacca cctgcacgg acttaecgcy ctgccagcc 1380
aacatgcctc ccatcagcg ctaccaccag gacacgcaag cctggggaga catcgctac 1440
agtttctgtg tgggtcggaa cggctacgtg tacgagggac cggctggca ctgggtggc 1500
gcccaacgcy tggccacaa tcccccgggc ttccggctgg ccatagttgg caactacac 1560
ggggcctgcy ccaccgagc cgtctctgcy acggtgccc acacgtccc gagggtggc 1620
gtggcgcggc gctctctgcy gccagactac gcgctgctg gccaccgca gctggctgcy 1680
accgactgcc ccggcgagcy gctctctgac ctgctgcca cctggccgca cttcaccgcy 1740
actgttaagc caagacctgc caggagtgtc tctaaagat ccaggagggg gccaccacca 1800
aggacctgcy cagccacaga cctccaataa agacagcatg g 1841

```

【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
15 August 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/063005 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/47, A01K 67/00, C12Q 1/68, A61K 38/17,
G01N 33/50, C07K 16/18

(21) International Application Number: PCT/US02/03813

(22) International Filing Date: 6 February 2002 (06.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60266,910 6 February 2001 (06.02.2001) US
60276,891 16 March 2001 (16.03.2001) US
60276,855 16 March 2001 (16.03.2001) US
60279,760 28 March 2001 (28.03.2001) US
60283,818 13 April 2001 (13.04.2001) US
60285,405 20 April 2001 (20.04.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): INCYTE
GENOMICS, INC. [US/US]; 3160 Porter Drive, Palo
Alto, CA 94304 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DAS, Debopriya
[IN/US]; 1267 Parkington Avenue, Sunnyvale, CA 94087
(US). YAO, Monique, G. [US/US]; 1189 Woodgate
Drive, Carmel, IN 46033 (US). ARVIZU, Chandra
[US/US]; 1706 Morocco Drive, San Jose, CA 95125
(US). BAUGHN, Mariah, R. [US/US]; 14244 San-
tiago Road, San Leandro, CA 94577 (US). LU, Yan
[US/US]; 3885 Corrine Way, Palo Alto, CA 94303 (US).
HAFALIA, April, J., A. [US/US]; 2227 Calle de Primavera,
Santa Clara, CA 95054 (US). WALIA, Narinder,
K. [US/US]; 890 Davis Street #205, San Leandro, CA
94577 (US). GRIFFIN, Jennifer, A. [US/US]; 33691
Mello Way, Fremont, CA 94555 (US). LI, Dyung, Aina,
M. [US/US]; 233 Coy Drive, San Jose, CA 95123 (US).
YUE, Henry [US/US]; 826 Lois Avenue, Sunnyvale,
CA 94087 (US). DING, Li [CN/US]; 3353 Alma Street,
#146, Palo Alto, CA 94306 (US). ELLIOTT, Vicki, S.
[US/US]; 3770 Poltan Place Way, San Jose, CA 95121
(US). FORSYTHE, Ian [US/US]; 308 Roble Avenue,Redwood City, CA 94061 (US). RAMKUMAR, Jay-
alaxmi [IN/US]; 34359 Maybird Circle, Fremont, CA
94555 (US). GANDHI, Ameena, R. [US/US]; 705 5th
Avenue, San Francisco, CA 94118 (US). ISON, Craig, H.
[US/US]; 1242 Weathersfield Way, San Jose, CA 95118
(US). WARREN, Bridget, A. [US/US]; 10130 Parkwood
Drive #2, Cupertino, CA 95014 (US). TANG, Y., Tom
[US/US]; 4230 Ranwick Court, San Jose, CA 95118 (US).
EMERLING, Brooke, M. [US/US]; 1735 Woodland
Avenue #71, Palo Alto, CA 94303 (US). HONCHELL,
Cynthia, D. [US/US]; 400 Laurel Street #203, San Carlos,
CA 94070 (US). LYNE, Michael [GB/GB]; 4 Ramsden
Square, Cambridge CB4 2BJ, Cambridgeshire (GB).
BARROSO, Ines [PT/GB]; 38 Eden Street, Cambridge,
CB1 1EL (GB).(74) Agents: HAMLET-COX, Diana et al.; Inceyte Genomics,
3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).(81) Designated States (national): AT, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW);
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM);
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent
(BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
6 February 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/063005 A3

(54) Title: LIPID-ASSOCIATED MOLECULES

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

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 02/03813
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 A01K67/00 C12Q1/68 A61K38/17 G01N33/50 C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A01K C12Q A61K G01N		
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, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL-EST [Online] EBI; Accession number T94164, Entry HS16466, 14 April 1995 (1995-04-14) HILLIER L ET AL: "Homo sapiens cDNA clone" XP002207786 sequence ---	3,13
E	WO 02 31160 A (BAYER AG ;ZHU ZHIMIN (US)) 18 April 2002 (2002-04-18) SEQ ID NOs 1,5,7,9 --- ---	3,13
-/--		
<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 citation or other special reason (see specification) "C" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" 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 "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 July 2002		Date of mailing of the international search report 22. 10. 2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5918 Patentstrasse 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2040, Tx. 81 651 epo nl, Fax: (+31-70) 840-2016		Authorized officer ESPEN, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 02/03813
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DATABASE EMBL-EST [Online] EBI; Accession number BG743628, Entry BG743628, 16 May 2001 (2001-05-16) NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, MAMMALIAN GENE COLLECTION: "Homo sapiens cDNA clone" XP002207787 sequence ---	3,13
A	EP 0 509 719 A (LILLY CO ELI) 21 October 1992 (1992-10-21) -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 02/03813
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:	
	see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	in part: 21.22.24.25
	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:		
see additional sheet		
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	<input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	56, 65; in part:1-55; all as far as applicable
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/US 02/03813

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 33,35 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
Although claims 19,22,25 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.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: in part: 21.22.24.25

Present claims 21,22,24,25 relate/refer to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being an agonist/antagonist.

The claims cover all compounds 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 compounds. 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 compound 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 antibodies binding relating to SEQ ID NO: 1.

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

International Application No. PCT/US 02/03813

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1; Claims 56,65; in part:1-55; all as far as applicable

Polypeptide relating to SEQ ID NO 1 and fragment thereof.
Polynucleotide encoding said polypeptide, in particular SEQ ID NO 10. Cell transformed with said polynucleotide.
Transgenic organism comprising said polynucleotide.
Antibodies binding to said polypeptide. Methods of detecting a target polynucleotide in a sample. Pharmaceutical composition comprising said polypeptide. Methods of screening for agonists/antagonists of said polypeptide. Methods of screening for a compound that binds/modulates to/the activity of said polypeptide.
Diagnostic test using said antibodies. Methods of detecting said polypeptide. Methods of purifying said polypeptide.
Microarray wherein at least one element is said polynucleotide. Array relating to said polynucleotide.

Inventions 2-9; Claims 57-64,66-73; in part:1-55; all as far as applicable

as invention 1 but limited to subject-matter relating to SEQ ID NOs 2-9 and 11-20; wherein
invention 2 is limited to SEQ ID NOs 2 and 11
invention 3 is limited to SEQ ID NOs 3 and 12, etc ...
invention 9 is limited to SEQ ID Nos 9 and 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 02/03813

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0231160	A	AU 9560201 A WO 0231160 A2	22-04-2002 18-04-2002
EP 0509719	A	CA 2066111 A1 EP 0509719 A1 ES 2169025 T3 JP 5103677 A JP 8029103 B US 5328842 A	18-10-1992 21-10-1992 01-07-2002 27-04-1993 27-03-1996 12-07-1994

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 9/00	A 6 1 P 25/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06	C 0 7 K 1/22	
C 0 7 K 1/22	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 1/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 15/00	F
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

- (31)優先権主張番号 60/279,760
(32)優先日 平成13年3月28日(2001.3.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/283,818
(32)優先日 平成13年4月13日(2001.4.13)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/285,405
(32)優先日 平成13年4月20日(2001.4.20)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 ヤオ、モニーク・ジー
アメリカ合衆国インディアナ州46033・カメル・ウッドゲートドライブ 1189
(72)発明者 アービズ、チャンドラ
アメリカ合衆国カリフォルニア州95125・サンノゼ・モロッコドライブ 1706
(72)発明者 ボーグン、マライア・アール

- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 7 7 ・ サンレアンドロ ・ サンティアゴロード 1 4 2 4 4
 (72)発明者 リュ、ヤン
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 3 ・ パロアルト ・ コリーナウェイ 3 8 8 5
 (72)発明者 ハファリア、エープリル、ジェイ・、エイ
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 4 ・ サンタクララ ・ コーレデブリマベータ 2 2 2 7
 (72)発明者 チョーラ、ナリンダー・ケイ
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 8 7 ・ ユニオンシティ ・ # 7 1 2 ・ ユニオンスクエア 3
 3
 (72)発明者 グリフィン、ジェニファー・エイ
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 5 5 ・ フレモント ・ メローウェイ 3 3 6 9 1
 (72)発明者 リュ、デュング・アイナ・エム
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 3 ・ サンノゼ ・ コイドライブ 2 3 3
 (72)発明者 ユエ、ヘンリー
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 8 7 ・ サニーベイル ・ ルイスアベニュー 8 2 6
 (72)発明者 ディング、リー
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 6 ・ パロアルト ・ # 1 4 6 ・ アルマストリート 3 3 5
 3
 (72)発明者 エリオット、ビッキー・エス
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 1 ・ サンノゼ ・ ボルトンブレイスウェイ 3 7 7 0
 (72)発明者 フォーサイス、イアン
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 6 1 ・ レッドウッドシティ ・ ローブルアベニュー 3 0 8
 (72)発明者 ランクマール、ジャヤラクシミ
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 5 5 ・ フレモント ・ メイバードサークル 3 4 3 5 9
 (72)発明者 ガンディー、アミーナ・アール
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 1 8 ・ サンフランシスコ ・ フィフスアベニュー 7 0 5
 (72)発明者 アイソン、クレイグ・エイチ
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 1 8 ・ サンノゼ ・ ウェザーズフィールドウェイ 1 2 4 2
 (72)発明者 ワレン、ブリジット・エイ
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 1 4 ・ クーペルティノー ・ # 2 ・ パークウッドドライブ
 1 0 1 3 0
 (72)発明者 タング、ワイ・トム
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 1 8 ・ サンノゼ ・ ランウィックコート 4 2 3 0
 (72)発明者 エマーリング、ブルック・エム
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 3 ・ パロアルト ・ # 7 1 ・ ウッドランドアベニュー 1
 7 3 5
 (72)発明者 ホンシェル、シンシア・ディー
- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 7 0 ・ サンカルロス ・ # 2 0 3 ・ ローレルストリート 4
 0 0
 (72)発明者 バロツソ、イネス
- イギリス国ケンブリッジ州 ・ シービー 1 1 イーエル ・ ケンブリッジ ・ エデンストリート 3 8
 (72)発明者 リネ、マイケル
- イギリス国ケンブリッジ州 ・ 2 ビージェイ 1 イーエル ・ ケンブリッジ ・ ラマデンスクエア 4
- F ターム(参考) 2G045 AA40 BB10 BB14 BB50 BB51 CB01 DA36 FA11 FB01 FB03
 FB08 FB12 FB13 GC15
 4B024 AA01 AA12 AA13 AA14 BA80 CA02 CA04 CA09 FA02 HA01
 HA14
 4B029 AA07 CC03 FA15
 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ42 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34
 4B064 AG01 AG27 CA19 CC24 CE13 DA05 DA06 DA07 DA08 DA13
 DA14 DA15

专利名称(译)	脂质结合分子		
公开(公告)号	JP2005503112A	公开(公告)日	2005-02-03
申请号	JP2002562742	申请日	2002-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	ダスデボプリヤ ヤオモニークジー アービズチャンドラ ボーグンマライアアール リュヤン ハファリアエープリルジェイエイ チョーラナリンダーケイ グリフィンジェニファーエイ リュデュングアイナエム ユエヘンリー デイングリー エリオットビッキーエス フォーサイスイアン ランクマールジャヤラクシミ ガンディーアミーナアール アイソクレイグエイチ ワレンブリジットエイ タングワイトム エマーリングブルックエム ホンシエルシンシアディー バロツソイネス リネマイケル		
发明人	ダス、デボプリヤ ヤオ、モニーク・ジー アービズ、チャンドラ ボーグン、マライア・アール リュ、ヤン ハファリア、エープリル、ジェイ、エイ チョーラ、ナリンダー・ケイ グリフィン、ジェニファー・エイ リュ、デュング・アイナ・エム ユエ、ヘンリー デイング、リー エリオット、ビッキー・エス フォーサイス、イアン ランクマール、ジャヤラクシミ ガンディー、アミーナ・アール アイソン、クレイグ・エイチ ワレン、ブリジット・エイ タング、ワイトム エマーリング、ブルック・エム ホンシエル、シンシア・ディー バロツソ、イネス リネ、マイケル		

IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/00 A61P3/06 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N37/00
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/00 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/47
FI分类号	C12N15/00.A A61K45/00 A61P1/00 A61P3/06 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102 C12N15/00.F C12N5/00.A A61K37/02
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA13 4B024/AA14 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/FA02 4B024/HA01 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE13 4B064/DA05 4B064/DA06 4B064/DA07 4B064/DA08 4B064/DA13 4B064/DA14 4B064/DA15 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA361 4C084/ZA661 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C084/ZC331 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA55 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA24 4H045/EA25 4H045/EA26 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/EA51 4H045/EA52 4H045/EA53 4H045/FA74 4H045/GA26
優先権	60/266910 2001-02-06 US 60/276891 2001-03-16 US 60/276855 2001-03-16 US 60/279760 2001-03-28 US 60/283818 2001-04-13 US 60/285405 2001-04-20 US
外部リンク	Espacenet

摘要(译)

本发明提供鉴定和编码LIPAM的人脂质相关分子 (LIPAM) 和多核苷酸。本发明还提供表达载体, 宿主细胞, 抗体, 激动剂和拮抗剂。本发明还提供了用于诊断, 治疗或预防与LIPAM异常表达有关的疾病的方法。

と5を参照)。

接頭コード	解析タイプやプログラムの例
GNN, GFG, ENST	例えば、GENSCAN (Stanford University, CA, USA) または FGENES (Computer Genomics Group, The Sanger Centre, Cambridge, UK)を用いたゲノム配列からのエキソン予測
GBI	手で編集されたゲノム配列の解析
FL	ステッチまたはストレッチゲノム配列(実施例5参照)
INCY	EST 配列のゲノムへのマッピングからの全長転写とエキソンの予想エキソンと転写を予想するために、ゲノム位置と EST 構成データが組み合わされる。