

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-527216

(P2004-527216A)

(43) 公表日 平成16年9月9日(2004.9.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 1/00	4 B O 2 4
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 9/00	4 B O 5 0
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 25/00	4 B O 6 3
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	4 B O 6 4
		(全 219 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-522270 (P2002-522270)	(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13年8月22日 (2001.8.22)	(74) 代理人	100089266 弁理士 大島 陽一
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月18日 (2003.2.18)	(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94555・フレモント・メローウェイ 33691
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/026365		
(87) 国際公開番号	W02002/016597		
(87) 国際公開日	平成14年2月28日 (2002.2.28)		
(31) 優先権主張番号	60/227, 429		
(32) 優先日	平成12年8月23日 (2000.8.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/231, 370		
(32) 優先日	平成12年9月8日 (2000.9.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/233, 212		
(32) 優先日	平成12年9月15日 (2000.9.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂質代謝酵素

(57) 【要約】

本発明はヒト脂質代謝酵素 (LMM) および LMM を同定し、コードするポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニストおよびアンタゴニストをも提供する。本発明はまた、LMM の異常発現に関連する疾患を診断、治療または予防する方法をも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) 乃至 (d) を有する群から選択した単離されたポリペプチド。

(a) SEQ ID NO: 1 - 6 を有する群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) SEQ ID NO: 1 - 6 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90% が同一であるような天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド

(c) SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片

(d) SEQ ID NO: 1 - 6 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 10

【請求項 2】

SEQ ID NO: 1 - 6 を有する群から選択した請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 2 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 7 - 12 を有する群から選択した請求項 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。 20

【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。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。

【請求項 9】

請求項 1 のポリペプチドを生産する方法であって、以下の過程を含む方法。 30

(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されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養するステップと、

(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有することを特徴とする方法。

【請求項 10】

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 11】

以下の (a) 乃至 (d) を有する群から選択した単離されたポリヌクレオチド。 40

(a) SEQ ID NO: 7 - 12 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(b) SEQ ID NO: 7 - 12 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも 90% が同一であるような天然のポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(c) (a) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(d) (b) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(e) (a) ~ (d) の RNA 等価物

【請求項 12】

請求項 11 に記載のポリヌクレオチドの少なくとも 60 の連続したヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 11 に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

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

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

10

【請求項 14】

前記プローブが少なくとも 60 の連続したヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

請求項 11 に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

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

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

20

【請求項 16】

有効量の請求項 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成分。

【請求項 17】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1 - 6 を有する群から選択したアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項 16 に記載の成分。

【請求項 18】

機能的な LMM (新規の薬剤代謝酵素) の発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項 16 の組成物を投与することを特徴とする治療方法。

30

【請求項 19】

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

(a) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、

(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 20】

請求項 19 に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする成分。

40

【請求項 21】

機能的な LMM の発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項 20 の組成物を投与することを特徴とする治療方法。

【請求項 22】

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

(a) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、

(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。

【請求項 23】

50

請求項 2 2 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成分。

【請求項 2 4】

機能性 L M M の過剰発現に関連する疾患又は病状の治療方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項 2 3 に記載の成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2 5】

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

(a) 適切な条件下で請求項 1 に記載のポリペプチドを少なくとも 1 つの試験化合物に結合させる過程と、 10

(b) 請求項 1 に記載のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項 1 に記載のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2 6】

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

(a) 請求項 1 に記載のポリペプチドの活性が許容された条件下で、請求項 1 に記載のポリペプチドを少なくとも 1 つの試験化合物に結合させる過程と、

(b) 請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、 20

(c) 試験化合物の存在下での請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を、試験化合物の不存在下での請求項 1 に記載のポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下での請求項 1 に記載のポリペプチドの活性の変化が、請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示することを特徴とする方法。

【請求項 2 7】

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

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

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程と、 30

(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 2 8】

試験化合物の毒性を算定する方法であって、

(a) 核酸を含む生物学的サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、

(b) 処理した前記生体サンプルの核酸と、請求項 1 1 のポリヌクレオチドの少なくとも 2 0 の連続するヌクレオチドを含むプローブをハイブリダイズさせるステップであって、このハイブリダイゼーションが、前記プローブと前記生体サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項 1 1 のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列またはその断片を含むポリヌクレオチドである、前記ステップと、 40

(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量するステップと、

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

【請求項 2 9】

生物学的サンプル中の L M M の発現に関連する症状または疾患に対する診断試験法であって、

(a) 前記抗体が前記ポリペプチドに結合し、抗体とポリペプチドとの複合体が形成され 50

るのに適した条件下で、前記生物学的サンプルを請求項 10 に記載の抗体と結合する過程と、

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

【請求項 30】

前記抗体が、

(a) キメラ抗体

(b) 単鎖抗体

(c) Fab 断片

(d) F(ab')₂ 断片

(e) ヒト化抗体 のいずれかであることを特徴とする請求項 10 に記載の抗体。

10

【請求項 31】

請求項 10 に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを含む化合物。

【請求項 32】

被検者の LMM の発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項 31 に記載の化合物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 33】

前記抗体が標識されることを特徴とする請求項 31 に記載の化合物。

【請求項 34】

被検者の LMM の発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項 33 に記載の化合物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

20

【請求項 35】

請求項 10 に記載の抗体の特異性を有するポリクローナル抗体を調製する方法であって、(a) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO: 1 - 6 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またはその免疫原性断片を用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体を単離する過程と、

(c) 前記単離された抗体をポリペプチドでスクリーニングし、それによって、SEQ ID NO: 1 - 6 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に特異結合するようなポリクローナル抗体を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

30

【請求項 36】

請求項 35 に記載の方法で産出した抗体。

【請求項 37】

請求項 36 に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。

【請求項 38】

請求項 10 に記載の抗体の特異性を有するモノクローナル抗体を製造する方法であって、(a) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO: 1 - 6 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またはその免疫原性断片を用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、

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

(d) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、

(e) SEQ ID NO: 1 - 6 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に特異結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。

40

【請求項 39】

請求項 38 に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項 40】

請求項 39 に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。

50

【請求項 4 1】

F a b 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 1 0 に記載の抗体。

【請求項 4 2】

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 1 0 に記載の抗体。

【請求項 4 3】

S E Q I D N O : 1 - 6 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サンプル中から検出する方法であって、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドの特異結合を許容する条件下で、サンプルを用いて請求項 1 0 に記載の抗体をインキュベートする過程と、 10

(b) 特異結合を検出する過程とを含み、該特異結合が、S E Q I D N O : 1 - 6 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 4 4】

S E Q I D N O : 1 - 6 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを精製する方法であって、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドの特異結合を許容する条件下で、サンプルを用いて請求項 1 0 に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、S E Q I D N O : 1 - 6 を有する群から選択したアミノ酸配列を有する精製ポリペプチドを得る過程とを含むことを特徴とする方法 20

【請求項 4 5】

S E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 6】

S E Q I D N O : 2 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 7】

S E Q I D N O : 3 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 8】

S E Q I D N O : 4 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。 30

【請求項 4 9】

S E Q I D N O : 5 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 0】

S E Q I D N O : 6 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 1】

S E Q I D N O : 7 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 2】

S E Q I D N O : 8 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチド。 40

【請求項 5 3】

S E Q I D N O : 9 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 4】

S E Q I D N O : 1 0 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 5】

S E Q I D N O : 1 1 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 6】

SEQ ID NO: 12 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 11 に記載のポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、脂質代謝酵素の核酸配列及びアミノ酸配列に関する。本発明はまた、これらの配列を利用した癌、神経系疾患、自己免疫/炎症疾患、胃腸系疾患、および心血管疾患の診断・治療・予防に関する。本発明はさらに、脂質代謝酵素の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の効果についての評価に関する。

【0002】

(発明の背景)

脂質は、クロロフォルムやエーテルのような無極性の溶媒に溶性で、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)は、主要な燃料源とエネルギー貯蔵の役割を果たす。燐脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、コレステロールのような極性脂質は、重要な細胞膜の構造要素である(脂質代謝は、Stryer, L. (1995) Biochemistry, W. H. Freeman and Company, New York NY、Lehninger, A. (1982) Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc. New York NY、及びベーリンガー・マンハイムのウェブサイト「<http://www.expasy.ch/cgibin/searchbiochemindex>」の ExPASy 「Biochemical Pathways」インデックスに概説されている)。

【0003】

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、生物での燃料分子であるトリグリセリドの重要な成分でもある。長鎖脂肪酸は、エイコサノイドの基質ともなり、ある種の複雑な炭水化物とタンパク質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 (CoA) カルボキシラーゼ (ACC) が、アセチルCoA と重炭酸からマロニルCoA を合成する。残りの反応を触媒する酵素が、多機能酵素脂肪酸合成酵素 (FAS) と呼ばれる、1つのポリペプチド鎖に共有結合で結合されている。FAS は、アセチルCoA とマロニルCoA からパルミチン酸の合成を触媒する。FAS には、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、アシルキャリアータンパク質、ケトアシル還元酵素、脱水酵素、エノイル還元酵素及びチオエステラーゼ作用が含まれる。FAS 反応の最終的産物は炭素数16の脂肪酸パルミチン酸である。ER の付随酵素による、パルミチン酸のさらなる伸長と不飽和化によって、個々の細胞で必要な様々な長鎖脂肪酸を生じる。これらの酵素にはNADHシトクロムb₅還元酵素、シトクロムb₅、及び不飽和化酵素が含まれる。

【0004】

トリグリセロイドや中性脂肪とも呼ばれるトリアシルグリセロールは、動物内の主要なエネルギー貯蔵である。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 は、脂肪酸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個の脂肪酸CoA からアシル化され、燐脂質を生じる。燐脂質ホスファターゼは、燐脂質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にアシル化される。燐脂質ホスファターゼとジグリセロイドアシルトランスフェラーゼは、小胞体(ER)膜に結合

10

20

30

40

50

したトリアシルグリセロール合成酵素を形成する。

【0005】

リン脂質の主要な種類として、グリセロールのバックボーン、2つの脂肪酸鎖、及びリン酸化アルコールからなるホスホグリセリドがある。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関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 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に変換される。CDPジアシルグリセロールのジアシルグリセロール基からセリン基への転移によってホスファチジルセリンを生じ、また同ジアシルグリセロール基からイノシトール基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、食物から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) によって、CDPコリンと1, 2ジアシルグリセロールとの反応によって形成される。

【0006】

アルコールが一端に付いた、4個の環状の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のような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、身体から過剰の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から由来する、ファルネソール基とゲラニルゲラニル基は、Rasのようなシグナル伝達に関連するタンパク質、及びRabのようなタンパク質を標的とするタンパク質に翻訳後に加えられ、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)。哺乳動物は、de novo生合成と食物の両方から由来するコレステロールを得る。

【0007】

スフィンゴ脂質は、膜脂質の重要なクラスで、長鎖のアミノアルコールであるスフィンゴシンを含む。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體から成る。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含むスフィンゴミエリンは、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含むガレクトセレブロシドは、脳の特徴である。他のセレブロシドは非神経組織に見つけられる。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、非神経組織には見られない。

【0008】

プロスタグランジン、プロスタシクリン、トロンボキササン、及びロイコトリエンを含むエ

10

20

30

40

50

イコサノイドは、脂肪酸から由来した20炭素数の分子である。エイコサノイドはシグナル伝達分子で、痛み、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塩で、アラキドン酸塩はホスホリパーゼA₂によってリン脂質から、及びジアシルグリセロールリパーゼによってジアシルグリセロールから生成される。ロイコトリエンは、リポキシゲナーゼの作用によってアラキドン酸塩から産出される。

【0009】

細胞内では、脂肪酸は細胞質内の脂肪酸結合タンパク質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、内在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は長鎖及び中間の長さの鎖をもつ脂肪酸CoAエステルと非常に強い親和性で結合し、脂肪酸CoAエステルのキャリアー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 脂肪酸CoA結合タンパク質シグネチャ)。

10

【0010】

肝臓に貯蔵された脂肪、及び脂肪トリグリセリドは加水分解されて血液中に放出され、運ばれる。遊離の脂肪酸は、アルブミンによって血液中を運ばれる。血液中のトリアシルグリセロールとコレステロールのエステルは、リポ蛋白粒子によって運ばれる。粒子は、極性の脂質とアポリ蛋白タンパク質の殻によって囲まれた疎水性脂質のコアから構成されている。タンパク質成分が疎水性脂質の溶解性を提供し、また細胞標的シグナルをも含んでいる。リポタンパク質には、乳状脂粒、乳状脂粒残余、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。血漿中のHDLレベルと早発冠状動脈性心疾患の危険性には、強い逆相関関係がある。

20

【0011】

ミトコンドリアとペルオキシソームのベータ酸化酵素は、CoA活性化脂肪酸から2個の炭素のユニットを次々に除くことによって、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短鎖、中鎖、長鎖の脂肪酸、ジカルボン脂肪酸、分岐脂肪酸、プロスタグランジン、生体異物、胆汁酸中間物を酸化する。ペルオキシソームのベータ酸化の主な役割は、毒性の脂肪親和性カルボン酸を短くしてそれらの分泌を促進させ、ミトコンドリアのベータ酸化の前に非常に長い長鎖脂肪酸を短くすることにある(Mannaerts, G.P. 及び P.P. Van Veldhoven (1993) Biochimie 75:147-158)。ベータ酸化に関する酵素には、アシルCoAシンセターゼ、カルニチンアシルトランスフェラーゼ、アシルCoA脱水素酵素、エノイルCoAヒドラターゼ、L-3ヒドロキシアシルCoA脱水素酵素、 α -ケトチオラーゼ、2,4-ジエノイルCoA還元酵素、及びイソメラーゼが含まれる。

30

40

【0012】

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。

【0013】

リパーゼ

50

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に加水分解される。脂肪細胞は、貯蔵されたトライアシルグリセロールを分解するリパーゼを含み、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。トライアシルグリセロールリパーゼ及びトリブチラーゼとも知られる、トリグリセリドリパーゼ (EXPLASY 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。高度の脊椎動物には、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、セリン残基を中心とした当たりであり、そのセリン残基は原核生物のリパーゼにも存在する。セリン残基での変異は、酵素を不活性にする。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の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、また血漿の脂肪の調整にも主要な役割を果たしている。効率的な食物脂肪の加水分解のために、膵臓リパーゼは補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。補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で同定されており、すべては異常なレベルの循環リポ蛋白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)。

10

20

【0014】

クリアリング因子リパーゼ、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 (EXPLASY 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。そのリポ蛋白には、乳状脂粒、超低比重と中間比重のリポ蛋白質、及び高比重リポ蛋白質 (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固着されており、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欠失は、トリグリセリド過剰血、HDL2欠乏症、及び肥満などの代謝の病気の一因となる (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)。

30

40

【0015】

ホスホリパーゼ

膜の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、リン脂質中で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。アラキドン酸は、リゾ血小板活性因子 (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肪の媒介物にプロセスされる。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痛み、発熱、及び炎症に関与する (Kaïse

50

r, E. 他 (1990) Clin. Biochem. 23:349-370)。さらに、ロイコトリエン-B4は、フィードバックループに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ら (1995) J. Biol. Chem. 270:26543-26549)。

【0016】

分泌性ホスホリパーゼA₂ (PLA₂)スーパーファミリーは、いくつか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。グリセロリン脂質の加水分解によって、遊離脂肪酸とリゾリン酸が放出される。PLA₂活性は、生物活性のある脂肪、ヒドロキシ脂肪酸、及び血小板活性因子の生合成のため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、いくつかの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

【0017】

非常に良く特徴付けられた最初のPLA₂は、蛇毒と蜂毒に見つけられるグループI、II、IIIのPLA₂であった。これらの毒のPLA₂は、共通の触媒作用、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動物のPLA₂と共有する。えじき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。この幅広い病態生理学的効果は、様々な細胞と組織上のこれらの酵素への特異的で高親和性の受容体の存在による(Lambeau, G. 他 (1995) J. Biol. Chem. 270:5534-5540)。

20

【0018】

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すでに記述されており、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は膵臓に見つかり、グループIIAとIICは炎症に関連する組織(例えば、滑膜)から、またグループVは心臓組織から見つかる。膵臓のPLA₂は食物脂質の消化機能を果たし、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案されている。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ている。グループVのPLA₂は脳組織よりクローンされており、心臓組織で強度に発現されている。ヒトのPLA₂は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タンパク質となる様相である。他のPLA₂が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

【0019】

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

50

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15~30 kDの小さいアイソフォームは加水分解酵素として機能し、60 kDを越える大きなアイソフォームは加水分解酵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を含む脂質因子によって調節されている。これらの脂質因子は、炎症反応を含む多くの経路で重要なシグナル分子である (Anderson, R. 他 (1994) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 125: 176-183; Selle, H. 他 (1993); *Eur. J. Biochem.* 212: 411-416)。

10

【0020】

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を含む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。活性化したPLCの役割は、細胞膜の少量の成分である、ホスファチジルイノシトール-4,5-2リン酸 (PIP₂) を加水分解し、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。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、一続きの細胞内反応を誘発する。IP₃ は細胞内の貯蔵からCa²⁺ を放出し、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。両方の経路も、分泌、神経作用、代謝、及び細胞増殖を含んだ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。

20

【0021】

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62~68 kDaの分子量をもち、そのアミノ酸配列は2つの領域に相当の類似性を示す。Xと名づけられた、この最初の領域は約170アミノ酸があり、2番目のY領域は約260アミノ酸を含んでいる。

【0022】

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。ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルイノシトール4-1リン酸 (PIP)、及びホスファチジルイノシトール4,5-2リン酸 (PIP₂) のような共通のイノシトールを含んだリン脂質の、これらのアイソフォームのいずれによる加水分解は、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

【0023】

すべての哺乳類のPLCには、約100アミノ酸の長さで、両親和性のヘリックスの側面に位置する2個の逆平行のシートから成る、プレックストリン相同性 (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)。

40

【0024】

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および他のリン酸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)。

50

【0025】

ホルモン、神経伝達、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タンパク質に連結された受容体に結合するアゴニストを含む広範囲な刺激に反応して、哺乳類細胞内でPLDが活性化される。少なくとも2種類のタイプの哺乳動物のPLD、PLD1とPLD2、が同定されている。PLD1はタンパク質キナーゼCと小さいGTPaseのARFとRhoAによって活性化される(Houle, M.G. 及びS. Bourgoin (1999) Biochim. Biophys. Acta 1439:135-149)。PLD2は、オレイン酸のような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)。

10

【0026】

リボキシゲナーゼ

リボキシゲナーゼ(ExPASy ENZYME EC 1.13.11.12)は非ヘム鉄を含む酵素で、リポ蛋白のような、ある種の多価不飽和の脂肪酸の二原子酸化添加を触媒する。リボキシゲナーゼは植物、真菌、及び動物に広範囲に見つけられる。いくつかの異なるリボ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化添加を触媒する特殊なリボキシゲナーゼがある。これらの酵素は、二原子酸化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。動物のリボキシゲナーゼは、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。リボキシゲナーゼは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。その鉄を含んだ酵素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. 274:23679-23682)。様々のリボ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、酸化防止剤、鉄キレート、基質類似体、リボキシゲナーゼ活性化タンパク質阻害剤、そして最後に表皮成長因子受容体阻害剤が含まれる。

20

【0027】

LOX3又はAloxe3とも知られる3-リボキシゲナーゼが最近、マウス表皮からクローンされた。Aloxe3はマウスの染色体11にあり、Aloxe3の推定アミノ酸配列は12-リボキシゲナーゼの配列と54%同一である(Kinzig, A. (1999) Genomics 58:158-164)。

30

【0028】

アラキドン酸5-オキシドレダクターゼとしても知られる5-リボキシゲナーゼ(5-LOX, ExPASy ENZYME: EC 1.13.11.34)は、通常は白血球、マクロファージ、肥満細胞に見られる。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-HPETE)へ、次にロイコトリエン(LTA4(5,6オキシド7,9,11,14エイコサトリエン))に変換する。ロイコトリエンA4ヒドロラーゼによるロイコトリエンA4の続く変換により、強力な好中球化学誘引物質ロイコトリエンB4が産生される。または、ロイコトリエンC4シクターゼによるLTA4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インロイコトリエンに至らせる。多くのリボキシゲナーゼは、活性化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し、5-LOXに基質を供給する(Lewis, R.A.ら(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ことが発見された(Wright, L.ら(1998) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157:219229)。

40

50

【0029】

12-リポキシゲナーゼ(12-LOX、EXPASy ENZYME: EC 1.13.11.31)は、アラキドン酸を酸素添加して、12-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸(12-HPETE)を形成する。哺乳類の12-リポキシゲナーゼは、その発現の原型の組織をとって命名されている(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12-LOX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見つけられている。白血球タイプの12-LOX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広範囲な分布を示すことが見つけられた。組織分布に加え、白血球タイプの12-LOXは、アラキドン酸基質から12-HPETE(ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸)に加え15-HPETE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12-LOXは15リポキシゲナーゼ(15-LOX)に非常に関連している。その両者は二重特異性リポキシゲナーゼであり、より高度な哺乳類でその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)。

【0030】

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でヒトの単球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. Borngraber (1999) Adv. Exp. Med. Biol. 447:528)。

【0031】

疾患との相関関係

脂質代謝は、ヒトの疾患と傷害に関与する。動脈疾患のアテローム性動脈硬化では、動脈壁の内側に脂肪性病変が形成する。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)。テイーサックス病では、Nアセチルヘキソサミニダーゼ酵素の欠如により、GM2ガングリオシド(ある種のスフィンゴ脂質)が中枢神経系のリソゾームに蓄積する。患者は早期の死に至る神経系変性をこうむる(Fauci, A.S.ら(1998) Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, New York NY, 2171ページ)。ニーマンピック病は脂質代謝の欠陥によって起こる。ニーマンピック病のA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)と他の脂質が中枢神経系に蓄積し、神経系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がリソゾームに蓄積とスフィンゴミエリン分解酵素の活性の二次的な減少に至らせる。大発作、失調症、以前に学んだ言語能力の損失等の神経系症状が生後1~2年後に現れる。推定上のコレステロール感知ドメインを含むNPCタンパク質のある突然変異が、ニーマンピック病タイプCの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)。

【0032】

PLAは様々な病気の過程に関与していると考えられる。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し、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案されている。炎症PLAは、炎症過程の強力な媒介であり、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。炎症PLAは、ほとんどのヒト細胞タイプで見つかっており

、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ている。

【0033】

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によるリゾホスファチジルコリンの加水分解が赤血球膜で溶解を起こさせる (Seille、前出)。同様に、Ender sen, M. J. 他 (1993; Scand. J. Clin. Invest. 53: 733-739) は、子かん前症の女性で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、遊離の脂肪酸を血清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の細胞毒性と細胞融解性の効果から保護することが示された (Anderson、前出)。

10

【0034】

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、喘息、及び癌のような複雑な疾患に寄与し、またウォルマン病やタイプ1高リポ蛋白症のようなシングル遺伝子欠陥に寄与しているとも考えられる。

【0035】

新規の脂質代謝酵素、およびそれらをコードするポリヌクレオチドの発見により、新規の組成物を提供することで当分野の要望に応えることができる。この新規の組成物は、癌、神経疾患、自己免疫/炎症の障害、胃腸疾患、および心臓血管系障害の診断・予防・治療において有用であり、また、脂質代謝酵素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。

20

【0036】

(発明の概要)

本発明は、総称して「LMM」、個別にはそれぞれ「LMM-1」、「LMM-2」、「LMM-3」、「LMM-4」、「LMM-5」および「LMM-6」と呼ぶ脂質代謝酵素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: 1-6を有する群から選択したアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b) SEQ ID NO: 1-6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一である、天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1-6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO: 1-6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片を含む群から選択した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: 1-6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。

30

【0037】

また、本発明は(a) SEQ ID NO: 1-6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチド、(b) SEQ ID NO: 1-6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1-6を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO: 1-6を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる群より選択されたポリペプチドをコードするような単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 1-6を有する群から選択したポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 7-12を有する群から選択される。

40

【0038】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1-6からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチド、(b) SEQ ID NO: 1-6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: 1-6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: 1-6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

50

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。

【0039】

また、本発明は、(a) SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチド、(b) SEQ ID NO: 1 - 6 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 - 6 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 - 6 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。

10

【0040】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチド、(b) SEQ ID NO: 1 - 6 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 - 6 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 - 6 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。

20

【0041】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 7 - 12 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO: 7 - 12 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)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。

30

【0042】

本発明は更に、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは(a) SEQ ID NO: 7 - 12 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: 7 - 12 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配列、および(e) (a) ~ (d)のRNA等価物からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む。検出方法は、(a)サンプル中の標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を含む少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて該サンプルをハイブリダイズする過程と、(b)ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、複合体が存在する場合にはオプシオ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。

40

【0043】

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: 7 - 12 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: 7 - 12 からな

50

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)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。

【0044】

本発明は更に、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とを含む成分を提供する。有効量のポリペプチドは、(a)SEQ ID NO: 1-6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: 1-6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: 1-6からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO: 1-6を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる群れから選択される。一実施例では、SEQ ID NO: 1-6からなる一群から選択されたアミノ酸配列を含む組成物を提供する。更に、本発明は、患者にこの組成物を投与することを含む、機能的LMMの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0045】

本発明はまた、(a)SEQ ID NO: 1-6からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチド、(b)SEQ ID NO: 1-6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有するポリペプチド、(c)SEQ ID NO: 1-6を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO: 1-6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されたポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドを有するサンプルを化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的LMMの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0046】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO: 1-6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: 1-6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: 1-6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: 1-6からなる群から選択したアミノ酸配列のポリペプチドの免疫原性断片からなる群から選択されたポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程とを含む。一実施態様で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む成分を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的LMMの過剰な発現に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0047】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO: 1-6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: 1-6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: 1-6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの

生物学的活性断片、または (d) SEQ ID NO: 1 - 6 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つの試験化合物に結合させる過程と、(b) 試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによってポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

【0048】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択されたアミノ酸配列からなるポリペプチドと、(b) SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列から成るポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択され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と、(d) SEQ ID NO: 1 - 6 の群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片とで構成される群から選択されたポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。

10

【0049】

その方法は、(a) ポリペプチドの活性が許容された条件下で、ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と結合させる過程と、(b) ポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、(c) 試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性を試験化合物の不存在下でのポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性の変化は、ポリペプチドの活性を調節する化合物であることを意味する。

20

【0050】

本発明は更に、標的ポリヌクレオチドの変異発現の有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。標的ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 7 - 12 を有する群から選択した配列を含む。スクリーニング方法は、(a) 標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、(b) 標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程とを含む。

【0051】

本発明は更に、(a) 核酸を含む生物学的サンプルを試験化合物で処理する過程と、(b) (i) SEQ ID NO: 7 - 12 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(ii) SEQ ID NO: 7 - 12 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(iii) (i) に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、(iv) (ii) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v) (i) ~ (iv) のRNA等価物からなる群から選択したポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて、処理した生物学的サンプルの核酸をハイブリダイズする過程とを含む試験化合物の毒性の算定方法を提供する。ハイブリダイゼーションは、上記プローブと生物学的サンプル中の標的ポリヌクレオチドの間に特定のハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で発生し、上記標的ポリヌクレオチドは、(i) SEQ ID NO: 7 - 12 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(ii) SEQ ID NO: 7 - 12 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(iii) (i) のポリヌクレオチドに相補的な配列を有するポリヌクレオチド、(iv) (ii) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、および(v) (i) ~ (iv) のRNA等価物からなる群から選択する。或いは、標的ポリヌクレオチドは、上記(i) ~ (v) からなる群から選択したポリヌクレオチド配列の断片と、(c) ハイブリダイゼーション複合体の量を定量する過程と、(d) 処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量を、非処理の生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程を含み、処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量の差は、試験化合物の毒性を示す。

30

40

【0052】

50

(発明を実施するための形態)

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

【0053】

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

10

【0054】

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株、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。

20

【0055】

(定義)

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

【0056】

用語「アゴニスト」は、LMMの生物学的活性を強めたり、模倣する分子を指す。このアゴニストは、LMMに直接相互作用するか、或いはLMMが関与する生物学的経路の成分と作用して、LMMの活性を調節するタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

30

【0057】

用語「対立遺伝子変異配列」は、LMMをコードする遺伝子の別の形を指す。対立遺伝子変異体は、核酸配列における少なくとも1つの突然変異から作製し得る。また、変異mRNA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。

40

【0058】

LMMをコードする「変異」核酸配列は、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換が起こっても、LMMと同じポリペプチド或いはLMMの機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドを指す。この定義には、LMMをコードするポリヌクレオチド配列の正常な染色体の遺伝子座ではない位置での対立遺伝子変異配列との不適當或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにLMMをコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な或いは検出困難な多型性を含む。コードされたタンパク質も「変異」し得るものであり、サイレント変化を生ぜしめて結果的に機能的に等価なLMMとなるようなアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を含み得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にLMMの活性が保持される範囲で、残基の

50

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

【0059】

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。

10

【0060】

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。

【0061】

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

20

【0062】

「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F_a、F（a b'）₂及びF_v断片を指す。LMMポリペプチドと結合する抗体は、免疫抗原として、そのままのポリペプチド、または目的の小ペプチドを含む断片を用いて作製可能である。動物（マウス、ラット、ウサギ等）を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、RNAの翻訳、または化学合成によって得られるポリペプチドまたはオリゴペプチドに由来し得るもので、好みに応じて担体タンパク質に抱合することも可能である。通常用いられる担体であってペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びスカ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。

30

【0063】

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。

【0064】

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連鎖を有するオリゴヌクレオチドや、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖等の修飾された糖類を有するオリゴヌクレオチドや、或いは5-メチルシトシン、2-デオキシウラシルまたは7-デアザ-2'-デオキシグアノシン等の修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドがある。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」という表現は同センス鎖を意味する。

40

【0065】

50

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LMM、合成のLMM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。

【0066】

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、配列「5' A - G - T 3'」は、相補配列「3' T - C - A 5'」と対を形成する。

【0067】

「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。この成分には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。LMM若しくはLMMの断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。このプローブは、凍結乾燥状態で保存可能であり、糖質などの安定化剤と結合させることが可能である。ハイブリダイゼーションにおいては、塩（例えばNaCl）、界面活性剤（例えばドデシル硫酸ナトリウム；SDS）及びその他の構成成分（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。

10

【0068】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにDNA配列の解析を繰り返し行い、XL-PCRキット（Applied 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重複するcDNAやEST、またはゲノムDNA断片から構築された核酸配列を指す。伸長及び構築の両方を行ってコンセンサス配列を決定する配列もある。

20

【0069】

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され得るアミノ酸と、保存アミノ酸置換と認められるアミノ酸を示している。

30

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	10
Gln	Asn, Glu, His	
Glu	Asp, Gln, His	
Gly	Ala	
His	Asn, Arg, Gln, Glu	
Ile	Leu, Val	
Leu	Ile, Val	20
Lys	Arg, Gln, Glu	
Met	Leu, Ile	
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr	
Ser	Cys, Thr	
Thr	Ser, Val	
Trp	Phe, Tyr	30
Tyr	His, Phe, Trp	
Val	Ile, Leu, Thr	

【 0 0 7 0 】

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。

【 0 0 7 1 】

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。

【 0 0 7 2 】

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、ポリヌクレオチドの化学修飾に含まれ得る。ポリヌクレオチド誘導体は、天然分子の生物学的または免疫学的機能を少なくとも1つは保持しているポリペプチドをコードする。ポリペプチド誘導体は、グリコシル化、ポリエチレングリコール化 (p e g y l a t i o n)、或いは任意の同様なプロセスであって、誘導起源のポリペプチドの少なくとも1つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持するプロセスによって、修飾されたポリペプチドである。

【0073】

「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。

【0074】

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

【0075】

「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。

10

【0076】

用語「断片」は、LMMまたはLMMをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列（parent sequence）と同一であるがその配列より長さが短いものを指す。断片は、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優先的に選択し得る。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示すような最初の250または500アミノ酸（またはポリペプチドの最初の25%または50%）から選択された或る長さの連続したアミノ酸を有し得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施例では、配列表、表及び図面を含む明細書に裏付けされた任意の長さであってよい。

20

【0077】

SEQ ID NO: 7-12の断片には、固有のポリヌクレオチド配列領域が含まれる。

この領域は、SEQ ID NO: 7-12を特異的に同定するものであり、例えばこの断片を得たゲノム中のSEQ ID NO: 7-12以外の配列とは異なるものである。SEQ ID NO: 7-12の断片は、例えば、ハイブリダイゼーション及び増幅技術において、或いは関連するポリヌクレオチド配列からSEQ ID NO: 7-12を区別する類似の方法において有用である。SEQ ID NO: 7-12の断片の正確な長さ及び断片に対応するSEQ ID NO: 7-12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。

30

【0078】

SEQ ID NO: 1-6の断片はSEQ ID NO: 7-12の断片によってコードされている。SEQ ID NO: 1-6の断片はSEQ ID NO: 1-6を特異的に同定する固有のアミノ酸配列の領域を含む。例えば、SEQ ID NO: 1-6の断片は、SEQ ID NO: 1-6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: 1-6の断片及び断片に対応するSEQ ID NO: 1-6の領域の正確な長さは、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

40

【0079】

「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。

【0080】

「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

50

の配列類似性、または配列同一性を意味する。

【0081】

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。

【0082】

ポリヌクレオチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる。このプログラムは、LASERGENEソフトウェアパッケージ(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. 及びP.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153、Higgins, D.G. 他 (1992) CABIOS 8:189-191に記載されている。ポリヌクレオチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。「重み付けされた」残基重み付け表が、デフォルトとして選択された。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。

【0083】

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対を直接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、対話形式で利用できる。「BLAST 2 Sequences」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。

【0084】

10

20

30

40

Matrix: BLOSUM62
 Reward for match: 1
 Penalty for mismatch: -2
 Open Gap: 5 及び Extension Gap: ペナルティ 2
 Gap x drop-off: 50
 Expect: 10
 Word Size: 11
 Filter: on

10

【0085】

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。

【0086】

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。

20

【0087】

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。

30

【0088】

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2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、K t u p l e = 1、g a p p e n a l t y = 3、w i n d o w = 5、「d i a g o n a l s s a v e d」= 5と設定する。デフォルトの残基重み付け表としてPAM250マトリクスを選択する。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、アラインメントされたポリペプチド配列の対の同一性のパーセントは、「類似性パーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

40

【0089】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用いてもよい。例えば、2つのポリペプチド配列を対で比較をする場合、ある者は、デフォルトパラメータで設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12（2000年4月21日）でblastpを使用するであろう。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

【0090】

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: ペナルティ 1

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

【 0 0 9 1 】

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。

10

【 0 0 9 2 】

「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小染色体である。

【 0 0 9 3 】

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。

20

【 0 0 9 4 】

「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同性を共有することを示すものである。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、更にストリンジェントな条件では、非特異結合（即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合）が減少する。核酸配列のアニーリングに対する許容条件は、本技術分野における当業者が慣例的に決定できる。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。

30

【 0 0 9 5 】

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 ら (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。

40

【 0 0 9 6 】

本発明の、ポリヌクレオチドとポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションに対する高ストリンジェンシー条件には、約 0.2 × SSC 及び約 1% の SDS 存在下で約 68 において 1 時間の洗浄条件が含まれる。別法では、65、60、55、または 42 の

50

温度で行う。SSC濃度は、約0.1%のSSD存在下で、約0.1~2×SSCの範囲で変化し得る。通常は、ブロッキング剤を用いて非特異ハイブリダイゼーションを阻止する。このような遮断剤には、例えば、約100~200µg/mlのせん断した変性サケ精子DNAがある。例えばRNAとDNAのハイブリダイゼーションのような特定条件下では、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。

【0097】

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(C₀tまたはR₀t解析等)。或いは、一方の核酸配列が溶解状態で存在し、もう一方の核酸配列が固体支持体(例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラススライド、或いは他の適切な基質であって細胞若しくはその核酸が固定される基質)に固定されているような2つの核酸配列間に形成され得る。

10

【0098】

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追加されるアミノ酸配列或いは核酸配列の変化を指す。

【0099】

「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。

20

【0100】

「免疫原性断片」とは、哺乳動物等の生命体に導入されると免疫応答を誘発し得るようなLMMのポリペプチドまたはオリゴペプチド断片である。「免疫原性断片」の語には、本明細書中で開示したような或いは当分野で既知であるような任意の抗体産出方法において有用なLMMの任意のポリペプチドまたはオリゴペプチド断片も含まれる。

【0101】

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

30

【0102】

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。

【0103】

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

【0104】

「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。

40

【0105】

「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結合する必要がある場合、一般に、機能的に連結した

50

DNA配列は非常に近接するか、或いは連続的に隣接し得る。

【0106】

「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、成分に溶解性を与える。PNAは、相補的一本鎖DNAまたはRNAに優先的に結合して転写の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。

【0107】

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

【0108】

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

【0109】

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。

【0110】

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

【0111】

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キロボ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, Cambridge MA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、各自のソースから得てユーザー固有のニーズを満たすように変更してもよい。)PrimerGenプログラム(英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト-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。

【0112】

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、例えば前出のSambrookらの文献(前出)に記載されているような遺伝子工学的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部を付加、置換または欠失した変異核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモーター配列に機能的に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。

【0113】

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。

【0114】

「調節エレメント」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。調節エレメントは、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。

【0115】

「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。

【0116】

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。

【0117】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。LMMをコードする核酸若し

くはその断片、またはLMM自体を含む疑いのあるサンプルは、体液や、細胞、染色体、細胞小器官または細胞から単離された膜からの抽出物や、細胞や、溶解しているか基質に結合しているゲノムDNA、RNAまたはcDNAや、組織や、組織プリント等から構成され得る。

【0118】

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。

10

【0119】

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。

【0120】

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

20

【0121】

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、ウエハ、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。基質は、壁、溝、ピン、チャネル、孔等、様々な表面形態を有することができ、基質表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0122】

「転写イメージ」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。

【0123】

「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、バクテリオファージまたはウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法がある。「形質転換された細胞」には、導入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主染色体の一部として複製可能である安定的に形質転換された細胞が含まれる。さらに、限られた時間に一時的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

30

40

【0124】

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

50

合によって宿主に導入することができる。本発明のDNAをこのような有機体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrookら(1989)等の参考文献に記載されている。

【0125】

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。ある変異配列は、例えば、「対立遺伝子」変異配列(上述)または「スプライス」変異配列、「種」変異配列、「多型」変異配列と表すことができる。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異なるスプライシングによって通常多数の或いは僅かな数のポリヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメインを有するか或いは参照分子に存在するドメインが欠落していることがある。種変異体は、種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が異なる。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。

10

20

【0126】

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 Sequence s」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastpを実行する。このようなポリペプチド対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示し得る。

【0127】

(発明)

本発明は、新規なヒト脂質代謝酵素(LMM)、LMMをコードするポリヌクレオチド、及び、癌、神経疾患、自己免疫/炎症疾患、胃腸疾患、及び心臓血管系疾患の診断、治療並びに予防にこれらの配列を利用する方法の発見に基づくものである。

30

【0128】

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。

40

【0129】

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(Polypeptide 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 Polypeptide ID)を示す。列3は、GenBankの最も近い相同体のGenBankの識別番号(Genbank

50

ID NO :)を示す。列4は、各ポリペプチドとそのGenBank相同体との間の一致を表す確率スコアを示す。列5は、該当箇所には適当な引用を示すとともにGenBank相同体のアノテーションを示し、これらはすべて本明細書では参考文献に含まれている。

【0130】

表3は、本発明のポリペプチドの多様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 Polypeptide 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。 10

【0131】

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、それら特性が請求の範囲に記載されたポリペプチドが脂質代謝酵素であることを確立している。例えば、SEQ ID NO : 1はヒトのリソソーム酸性リパーゼ(GenBank ID g505053)と53%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 5.2×10^{-116} 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。SEQ ID NO : 1はまた、 α / ヒドロラーゼフォールド(α / hydrolase fold)を有するが、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)。MOTIFS及びPROFILESCAN解析よりのデータは、SEQ ID NO : 1がリパーゼであることをさらに確証する証拠を提供する。別の例として、SEQ ID NO : 4はヒトのpregastricリパーゼ(GenBank ID g579561)と63%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 1.4×10^{-142} であり、これは保存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。SEQ ID NO : 4はまた、 α / ヒドロラーゼフォールド(α / hydrolase fold)を有するが、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)。MOTIFS及びPROFILESCAN解析よりのデータは、SEQ ID NO : 4がリパーゼであることをさらに確証する証拠を提供する。別の例として、SEQ ID NO : 5はヒトのアリアルアセトアミド脱アセチル化酵素(GenBank ID g537514)と35%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 1.6×10^{-47} 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。別の例において、SEQ ID NO : 6はネズミのホスホリパーゼC-L2(GenBank ID g6705987)と51%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって決定されている。(表2参照)。BLAST確率スコアは 2.1×10^{-151} 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。SEQ ID NO : 6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のXとYドメイン、C2ドメイン、プレックストリン相同性ドメインを有する。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 30 40 50

、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PROFILESCAN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証する証拠を提供する。SEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:3は同様の方法で解析してアノテーションを付けた。SEQ ID NO:1-6の解析のためのアルゴリズム及びパラメータが表7で記述されている。

【0132】

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構築した。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列識別番号(Polynucleotide SEQ ID NO)およびそれ
10
に対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(Incyte Polynucleotide ID)を示す。また対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(IncyteポリヌクレオチドID)を示す。列3は、塩基対における各ポリヌクレオチド配列の長さを示す。列4は、例えば、SEQ ID NO:7-12を同定するため、或いはSEQ ID NO:7-12と関連するポリヌクレオチド配列とを区別するためのハイブリダイゼーションまたは増幅技術に有用なポリヌクレオチド配列の断片を示す。列5はcDNA配列、ゲノムDNAから予想されたコード配列(エキソン)及び/またはcDNA及びゲノムDNAを共に有する配列集合に対応する識別番号を示している。これらの配列は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列を構築するのに用いた。表4の列6および列7はそれぞれ全長配列に関連して、列5の配列に対応するcDNA
20
配列およびゲノム配列の開始ヌクレオチド(5')位置および終了ヌクレオチド(3')位置を示す。

【0133】

表4の列5の識別番号は、特に例えばIncyte cDNAとそれに対応するcDNAライブラリを指す場合もある。例えば、6875328H1はIncyte cDNA配列の識別番号であり、EPIMUNN04はそれが由来するcDNAライブラリの識別番号である。cDNAライブラリが示されていないIncyte cDNAは、プールされているcDNAライブラリ(例えば、71075936V1)に由来する。または、列5の
30
識別番号は、完全長ポリヌクレオチド配列の組み立てに用いたGenBankのcDNAすなわちEST(例えば、g5369512)の識別番号の場合もある。さらに、列5の識別番号は、ENSEMBL(The Sanger Centre、ケンブリッジ(英国))データベースから由来した配列を同定し得る(即ち「ENST」命名を含む配列)。或いは、列5の識別番号は、NCBI RefSeq Nucleotide Sequence Records データベースから由来する場合もあり(即ち「NM」または「NT」の命名を含む配列)、またNCBI RefSeq Protein Sequence Records から由来する場合もある(即ち「NP」の命名を含む配列)。または
40
列5の識別番号は、「エキソンステッチング(exon-stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNA及びGenscan予想エキソンの両方からなる群を意味する場合がある。例えば、FL_XXXXXX_N₁_N₂_YYYYY_N₃_N₄ は「ステッチされた」配列であり、その内、XXXXXXは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はアルゴリズムにより生み出される
予測の数であり、N₁, N₂, N₃, ... がある場合には、解析中に手動で編集された特別のエキソンを表す(実施例5参照)。または列5の識別番号は、「エキソンストレッチ(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、FLXXXXXX_gAAAAA_gBBBBB_1_N
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「エキソンストレッチ」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
50
相同体のGenBank識別番号、またはNCBI RefSeq識別番号、Nは特定のエキソンである(実施例5を参照)。あるRefSeq配列が「エキソンストレッチ

」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には、R e f S e q 識別番号（「N M」、「N P」、または「N T」によって表される）が、G e n B a n k 識別（即ち、g B B B B B）の代わりに使用される場合もある。

【 0 1 3 4 】

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、または組み合わさ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）。

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(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 予想ゲノム位置と EST 組成物データを結合して、エキソンと生 じる転写を予想する。

10

20

30

【 0 1 3 5 】

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列5に示すような配列の適用範囲と重複する I n c y t e c D N A の適用範囲が得られたが、それに関連する I n c y t e c D N A 識別番号は示さなかった。

40

【 0 1 3 6 】

表5は、I n c y t e c D N A 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 c D N A ライブラリを示している。代表的な c D N A 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 I n c y t e c D N A 配列によって最も頻繁に代表される I n c y t e c D N A ライブラリである。c D N A 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。

【 0 1 3 7 】

本発明には、L M M の変異体も含まれる。好適な L M M の変異体は、L M M の機能的或い

50

は構造的特徴の少なくともどちらか一方を有し、かつLMM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。

【0138】

本発明には、LMMをコードするポリヌクレオチドも含まれる。特定の実施例において、本発明は、LMMをコードするSEQ ID NO: 7-12からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を提供する。SEQ ID NO: 7-12のポリヌクレオチド配列は、配列表に示されているように等価RNA配列と同等の価値を有しているが、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シリボースから構成されている。

10

【0139】

本発明はまた、LMMをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。詳細には、このようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、LMMをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有する。本発明の特定の実施形態は、SEQ ID NO: 7-12からなる一群から選択された核酸配列と少なくとも70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有するSEQ ID NO: 7-12からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列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、LMM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する。

20

【0140】

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

【0141】

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

30

【0142】

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

40

【0143】

更に本発明には、種々のストリンジент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: 7-12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; Kim

50

mel. A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152: 507 - 511. 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。

【0144】

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。 (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, 856 - 853 ページ等を参照)。

10

20

【0145】

当分野で周知のPCR法をベースにした種々の方法で、部分的なヌクレオチド配列を利用して、LMMをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節エレメントなどの上流にある配列を検出する。例えば、使用し得る方法の一つである制限部位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. ら (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. ら (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Promoter Finder (商標) ライブラリ (Clontech, Palo Alto CA) を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、ライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部を見付けるのに有用である。全てのPCRベースの方法に対して、市販されているソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別

30

40

50

の好適なプログラムを用いて、長さが約22～30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、温度約68～72で鋳型に対してアニーリングするようにプライマーを設計し得る。

【0146】

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。

【0147】

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。

【0148】

本発明の別の実施例では、LMMをコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を、適切な宿主細胞内でLMM、LMMの断片またはその機能的等価物を発現させるような組換えDNA分子内でクローニングし得る。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アミノ酸配列をコードする別のDNA配列が作られ得り、これらの配列をLMMの産生及び発現に利用可能である。

【0149】

種々の目的でLMMがコードする配列を変えるために、本発明のヌクレオチド配列を当分野で通常知られている方法を用いて組み換えることができる。ここで目的には、限定するものではないが遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、発現の調節がある。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。

【0150】

本発明のヌクレオチドを、MOLECULAR BREEDING (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)などのDNAシャッフリング技術を用いてシャッフリングして、LMMの生物学的または酵素的な活性、或いは他の分子や化合物と結合する能力などのLMMの生物学的特性を変更或いは改良することができる。DNAシャッフリングは、遺伝子断片のPCRを介する組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを生成するプロセスである。ライブラリはその後、その遺伝子変異体を所望の特性に同定するような選択またはスクリーニングにかける。次にこれらの好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリング及び選択/スクリーニングを行ってもよい。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

10

20

30

40

50

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。

【0151】

別の実施例によれば、LMMをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である（例えば、Caruthers, M. H. ら (1980) *Nucleic Acids Symp. Ser.* 7: 215223、Horn, T. 他 (1980) *Nucleic Acids Symp. Ser.* 7: 225232 等を参照）。或いは、化学的方法を用いてLMMそれ自体またはその断片を合成し得る。例えば、種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる（Creighton, T. (1984) *Proteins, Structures and Molecular Properties*, WH Freeman, New York NY, 55-60ページ、Roberge, J. Y. ら (1995) *Science* 269: 202-204 等を参照）。自動合成はABI 431A ペプチドシンセサイザ (Applied Biosystems) を用いて達成し得る。更にLMMのアミノ酸配列または任意のその一部は、直接的な合成の際の変更、及び/または化学的方法を用いた他のタンパク質または任意のその一部からの配列との組み合わせにより、天然のポリペプチド配列を有するポリペプチドまたは変異体ポリペプチドを作製することが可能である。

10

20

【0152】

ペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィーを用いて実質上精製可能である（Chiez, R. M. および F. Z. Regnier (1990) *Methods Enzymol.* 182: 392-421 等を参照）。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシー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）。

【0153】

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

30

40

【0154】

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

50

usubel, F.M. 他. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, ch. 9章、13章及び16章を参照)。

【0155】

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

【0156】

細菌系では、多数のクローニングベクター及び発現ベクターが、LMM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選択可能である。例えば、LMMをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUES CRIP T (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。ベクターの多数のクローニング部位にLMMをコードする配列をライゲーションするとlacZ遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更にこれらのベクターは、クローニングされた配列における*in vitro*転写、ジデオキシのシークエンシング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう(例えば、Van Heeke, G. およびS.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509を参照)。例えば、抗体の産生のためなどに多量のLMMが必要な場合は、LMM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。

【0157】

10

20

30

40

50

酵母の発現系を使用してLMMを生成し得る。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が細胞内への保持のどちらかを誘導し、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列を組み込む。(例えば、Ausubel, 1995, 前出、Bitter, G. A. ら (1987) *Methods Enzymol.* 153: 516 - 544、及び Scorer, C. A. ら (1994) *Bio/Technology* 12: 181 - 184. を参照)。

【0158】

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

【0159】

哺乳動物細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、後発プロモーター及び3連リーダー配列からなるアデノウイルス転写物/翻訳複合体にLMMをコードする配列を結合し得る。非必須のE1またはE3領域へウイルスのゲノムを挿入し、宿主細胞でLMMを発現する感染ウイルスを得ることが可能である。(例えば、Logan, J. および T. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 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。

【0160】

ヒト人工染色体(HAC)を用いて、プラスミドに含まれ且つプラスミドから発現するものより大きなDNAの断片を輸送することもできる。治療のために約6kb~10MbのHACsを作製し、従来の送達方法(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)。

【0161】

哺乳動物系の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、株化細胞におけるLMMの安定した発現が望ましい。例えば、発現ベクターを用いて、LMMをコードする配列を株化細胞に形質転換することが可能である。このような発現ベクターは、ウイルス起源の複製及び/または内在性の発現要素や、同じ或いは別のベクターの上の選択マーカー遺伝子を含む。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。

【0162】

10

20

30

40

50

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*⁻細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子と、*apr*⁻細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスの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. ら（1980）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567-3570；Colbere-Garapin, F. ら（1981）*J. Mol. Biol.* 150:1-14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* 85:80478051を参照）。可視マーカー、例えばアントシアニン、緑色蛍光タンパク質（GFP；Clontech）、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.* 55:121131等を参照）。

10

20

30

40

50

【0163】

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、LMM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、LMM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、1つのプロモーターの制御下でマーカー遺伝子がLMMをコードする配列と一列に配置することも可能である。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子の発現も示す。

【0164】

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

【0165】

特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のどちらかを用いるLMMの発現の検出及び計測のための免疫学的な方法は、当分野で周知である。このような技法には、酵素に結合した免疫吸着剤検定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、フローサイトメーター（FACS）などがある。LMM上の2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、2部位のモノクローナルベースイムノアッセイ（two-site, monoclonal-based immunoassay）が好ましいが、競合の結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ及びこれ以外のアッセイは、当分野で公知である（Hampton, R. ら（1990）*Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, MN, Sect. IV、Coligan, J. E. ら（1997）*Current Protocols in Immunology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY、Pound, J. D.（1998）*Immunochemi*

cal Protocols, Humans Press, Totowa NJ等を参照)。

【0166】

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。LMMをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブ或いはPCRプローブを生成する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化、または標識されたヌクレオチドを用いるPCR増幅が含まれる。別法として、LMM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。

10

【0167】

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

20

【0168】

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、標的タンパク質、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

30

【0169】

本発明の別の実施例では、LMMをコードする天然の核酸配列、修飾核酸配列または組換え核酸配列を、上記任意の宿主系において融合タンパク質の翻訳をもたらす異種配列に連結反応させることができる。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラLMMタンパク質が、LMM活性のインヒビター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、LMMをコ

40

50

ードする配列と異種タンパク質配列との間にあるタンパク質分解切断部位を融合タンパク質が含むように遺伝子操作すると、LMM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。

【0170】

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LMM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。

10

【0171】

本発明のLMMまたはその断片を用いて、LMM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、LMM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。

【0172】

一実施例では、このように同定された化合物は、例えばリガンドやその断片などのLMMの天然のリガンド、または天然の基質、構造的または機能的な擬態性または自然結合パートナーに密接に関連している(Coligan, J. E. 他(1991) Current Protocols in Immunology 1(2)の5章等を参照)。同様に、化合物は、LMMが結合する天然受容体、或いは例えばリガンド結合部位などの少なくとも受容体のある断片に密接に関連し得る。何れの場合も、既知の技術を用いてこの化合物を合理的に設計することができる。一実施例では、これらの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LMM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。LMMを発現する細胞またはLMMを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、LMMまたは化合物の何れかの結合、刺激または阻害を分析する。

20

【0173】

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体に固定されたLMMと結合させるステップと、LMM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。

30

【0174】

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

40

50

【0175】

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、LMM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。

【0176】

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

【0177】

LMM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）を作製することが可能である。ロックイン技術を用いて、LMM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LMMを乳汁内に分泌するなどLMM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）。

【0178】

（治療）

LMMのある領域と脂質代謝酵素のある領域との間に、例えば配列及びモチーフの内容における化学的及び構造的類似性が存在する。更に、LMMの発現は、白血球、下垂体および生殖と気管組織に密接に関連する。LMMの発現若しくは活性の増大に関連する疾患の治療においては、LMMの発現または活性を低下させることが望ましい。また、LMM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、LMMの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0179】

従って、一実施例において、LMMの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、患者にLMMまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例として、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌を含む癌、具体的には副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌等が含まれ、神経障害として、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン

病、痴呆、パーキ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、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、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー、クロイツフェルト ヤコブ病及びガストマン ストラウスラー 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、神経系の栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管芽腫症 (cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、精神薄弱、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、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、10
 遺伝性、代謝性、内分泌性及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害及び精神分裂病を含む精神障害と、季節型感情障害 (SAD) と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症 (corticobasal degeneration)、家族性前頭側頭骨痴呆が含まれ、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、自己免疫多発性内分泌腺障害症 (APCED)、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、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、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、過敏性大腸症候群、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、全身性硬化症、血小板減少症、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、蠕虫の感染症及び外傷が含まれ、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、肝臓の受動性うっ血、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、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、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、肝炎、血色素症、ウィルソン病、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、門脈循環閉塞及び血栓、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、妊娠性急性肝脂肪、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性再生及び腺腫、癌腫を含む肝癌が含まれる、また皮膚障害には、皮膚炎、湿疹、魚鱗癬、角化症、乾癬、強皮症、皮膚萎縮症、脂質異常の中には、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、ミオアデニレートデミナーゼ欠乏症、高トリグリセリド血症、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、変染色性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、GM₂ にガングリオシドーシス、セロイドリポフスチン症、無リポ蛋白血症、タンジアー病、リポ蛋白過剰血症、糖尿病、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪組織壊死症、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、リポイドネフロゼ、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、甲状腺症機能低下症、腎臓病、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乏症、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、脂肪過剰血症、脂質筋障害、肥満症が含まれる。心血管障害も含まれ、そ 30
 40
 50

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、静脈奇形、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管の腫瘍、血栓崩壊の合併症、バルーン血管形成術 (balloon angioplasty)、血管置換術、大動脈冠動脈バイパス術移植手術 (coronary artery bypass graft surgery) などの血管疾患と、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、僧帽弁輪状石灰化 (mitral annular calcification)、僧帽弁脱出、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、心臓移植の合併症などの心疾患、先天性肺異常、肺拡張不全、肺うっ血及び肺水腫、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、拘束型肺疾患、慢性閉塞性肺疾患、肺気腫、慢性気管支炎、気管支喘息、細気管支拡張症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎及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、過敏症肺炎、肺好酸球増加閉塞性細気管支炎 器質性肺炎 (pulmonary eosinophilia 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、肺併発膠原血管病併発性肺疾患、肺胞たんぱく症、肺腫瘍、炎症性及び非炎症性胸水、気胸症、胸膜腫瘍、薬物性肺疾患、放射線による肺疾患、及び肺移植の合併症などが含まれる。

10

【0180】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むLMM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、LMMまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与することも可能である。

20

【0181】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むLMM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LMMを含む組成物を好適な医薬用担体と共に患者に投与することも可能である。

【0182】

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

30

【0183】

更なる実施例では、LMMの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、患者にLMMのアンタゴニストを投与することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例には、上記した癌、神経系障害、自己免疫/炎症疾患、胃腸疾患、及び心臓血管系疾患がある。一実施態様では、LMM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LMMを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲッティング或いは運搬機構として間接的に用いられ得る。

【0184】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むLMM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、LMMをコードするポリヌクレオチドの相補配列を発現するベクターを患者に投与することも可能である。

40

【0185】

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 of 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し得る。この方法を用いることにより少量の各薬剤で医薬効果をあげることが可能となり、それによって副作用の可能性を低減し得る。

【0186】

50

LMM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LMM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、LMMと特異結合するものを同定することが可能である。LMMの抗体も、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖、Fabフラグメント、及びFab発現ライブラリによって作られたフラグメントが含まれる。但し、これらに限定されるものではない。中和抗体（即ち二量体の形成を阻害する抗体）は通常、治療用に好適である。

【0187】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト及びその他のものを含む種々の宿主が、LMM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、ブルニックポリオール、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 ゲラン桿菌）及びコリネバクテリウム パルヴム（Corynebacterium parvum）が特に好ましい。

【0188】

LMMに対する抗体を誘発するために用いられるオリゴペプチド、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り、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものが好ましい。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であり且つ小さな天然の分子の全アミノ酸配列を含むことが望ましい。LMMアミノ酸の短いストレッチは、K L Hなどの別のタンパク質の配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

【0189】

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

【0190】

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、Morrisson, S. L. 他（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-6855、Neuberger, M. S. 他（1984）Nature 312: 604-608；Takeda, S. ら（1985）Nature 314: 452-454等を参照）。別法では、当分野で周知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、LMM特異性一本鎖抗体を生成する。関連特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる（Burton D. R.（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10134-10137等を参照）。

【0191】

抗体の産生は、リンパ球集団における*in vivo*産生の誘導によって、或いは免疫グロブリンライブラリのスクリーニングまたは文献に開示されているような高特異結合試薬のパネルのスクリーニングによっても行い得る（Orlandi, R. ら（1989）

) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837, Winter, G. ら (1991) Nature 349: 293-299等を参照)。

【0192】

LMMに対する特異的な結合部位を含む抗体断片も得ることができる。例えば、限定するものではないが、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって作製されるF(ab')₂断片と、F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製されるFab断片とがある。或いは、Fab発現ライブラリを作製することによって、モノクローナルFab断片を所望の特異性と迅速且つ容易に同定することが可能となる(Huse, W.D. 他 (1989) Science 256: 1275-1281等を参照)。

10

【0193】

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競合的な結合、または免疫放射線活性のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このようなイムノアッセイには、LMMとその特異性抗体との間の複合体形成の計測が含まれる。2つの非干渉性LMMエピトープに反応するモノクローナル抗体を用いるような、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合結合アッセイを利用してよい(前出のPoundの文献)。

【0194】

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

20

30

【0195】

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1~2 mg/ml、好ましくは5~10 mg/mlの特異抗体を含むポリクローナル抗体試薬は、LMM抗体複合体を沈殿させる必要がある処理において通常用いられる。抗体の特異性、抗体価、結合活性、様々な適用例における抗体の品質や使用に対する指針については、一般に入手可能である。(前出のCattyの文献、同Coliganらの文献等を参照)。

40

【0196】

本発明の別の実施例では、LMMをコードするポリヌクレオチド、LMMの任意の断片または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、LMMをコードする遺伝子のコーディング領域や調節領域に相補的な配列やアンチセンス分子(DNA及びRNA、PNA、修飾ヌクレオチド)を設計して遺伝子発現を変更することができる。このような技術は当分野では周知であり、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドま

50

たは大きな断片が、LMMをコードする配列の制御領域から、またはコード領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である。(Agrawal, S., 編集(1996) Antisense Therapeutics, Humana Press Inc., Tottawa NJを参照)。

【0197】

治療に用いる場合、アンチセンス配列を好適な標的細胞に導入するのに好適な任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を発現する発現プラスミドの形で細胞内に輸送することが可能である(Slater, J.E.ら(1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475及びScanlon, K.J.ら(1995)9(13):1288-1296.等を参照)。アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる(Miller, A.D.(1990) *Blood* 76:271、前出のAusubel、Uckert, W.および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系が含まれる(Rossi, J.J.(1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225; Boado, R.J.ら(1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315、Morris, M.C.ら(1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14) 20:2730-2736等を参照)。

【0198】

本発明の別の実施例では、LMM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.ら(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.ら(1995) *Science* 270:475-480、Bordignon, C.ら(1995) *Science* 270:470-475)、嚢胞性繊維症(Zabner, J.ら(1993) 30 *Cell* 75:207-216; Crystal, R.G.ら(1995) *Hum. Gene Therapy* 6:643-666、Crystal, R.G.ら(1995) *Hum. Gene Therapy* 6:667-703)、サラセミア(thalassaemia)、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.及びSomia, N.(1997) *Nature* 389:239-242)を治療し、(ii)条件的致死性遺伝子産物を発現させ(例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合)、(iii)細胞内の寄生虫(例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV)(Baltimore, D.(1988) 40 *Nature* 335:395-396、Poeschl, E.ら(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。LMMの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を発生させる場合、形質導入した細胞の好適な集団からLMMを発現することにより、遺伝子欠損に起因する症状の発現を緩和し得る。

【0199】

本発明の更なる実施例では、LMMの欠損による疾患や異常症は、LMMをコードする哺 50

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LMM欠損細胞に導入することによって治療する。in vivo 或いは ex vitro の細胞に用いる機械的導入技術には、(i) 個々の細胞内への直接的なDNA微量注射法、(ii) 遺伝子銃、(iii) リポソームを介した形質移入、(iv) 受容体を介した遺伝子導入、及び(v) DNAトランスポソンの使用(Morgan, R. A. およびW. F. Anderson (1993) *Annu. Rev. Biochem.* 62:191-217、Ivics, Z. (1997) *Cell* 91:501-510、Boulay, J.-L. およびH. Recipon (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:445-450)がある。

【0200】

限定するものではないがLMMの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、PCDNA3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAX、PCR2-TOPO TAベクター(Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV(Stratagene, La Jolla CA)及びPTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG(Clontech, Palo Alto CA)がある。LMMを発現させるために、(i) 恒常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 - アクチン遺伝子等)、(ii) 誘導性プロモーター(例えば、市販されているT-REXプラスミド(Invitrogen)に含まれている、テトラサイクリン調節性プロモーター(Gossen, M. 及びH. Bujard (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:5547-5551; Gossen, M. 他(1995) *Science* 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. 及びH.M. Blau (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:451-456))、エクジソン誘導性プロモーター(市販されているプラスミドPVGRXR及びPINDに含まれている: Invitrogen)、FK506/ラパマイシン誘導性プロモーター、またはRU486/ミフェプリストーン誘導性プロモーター(Rossi, F.M.V. 及びH.M. Blau, 前出)、または(iii) 正常な個体に由来するLMMをコードする内在性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いることが可能である。

【0201】

市販のリポソーム形質転換キット(例えばInvitrogen社のPerfect Lipid Transfection Kit)を用いれば、当業者は経験にそれほど頼らないでもポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に導入することが可能になる。別法では、リン酸カルシウム法(Graham, F.L. 及びA.J. Eb (1973) *Virology* 52:456-467)若しくは電気穿孔法(Neumann, B. ら(1982) *EMBO J.* 1:841-845)を用いて形質転換を行う。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。

【0202】

本発明の別の実施例では、LMMの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、(i) レトロウイルス末端反復配列(LTR)プロモーターまたは独立プロモーターの制御下でLMMをコードするポリヌクレオチドと、(ii) 好適なRNAパッケージングシグナルと、(iii) 追加レトロウイルス・シス作用性RNA配列及び効率的なベクターの増殖に必要なコード配列を伴うRev応答性エレメント(RRE)とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター(例えばPFB及びPFBNEO)はStratagene社から市販されており、刊行データ(Riviere, I. ら(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:6733-6737)に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。ベクターは、好適なベクター産生細胞系(VPC

10

20

30

40

50

L)において増殖され、VPC L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. ら (1987) J. Virol. 61:1647-1650、Bender, M.A. ら (1987) J. Virol. 61:1639-1646、Adam, M.A. 及びA.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806、Dull, T. ら (1998) J. Virol. 72:8463-8471、Zufferey, R. ら (1998) J. Virol. 72:9873-9880)。RIGGに付与された米国特許第5,910,434号(「Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant」)において、レトロウイルスパッケージング細胞系を得るための方法が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖、細胞集団(例えばCD4⁺T細胞)の形質導入、及び形質導入した細胞の患者への戻しは、遺伝子治療の分野では当業者に公知の方法であり、多数の文献に記載されている(Ranga, U. ら (1997) J. Virol. 71:7020-7029、Bauer, G. ら (1997) Blood 89:2259-2267、Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716、Ranga, U. ら (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:1201-1206、Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

【0203】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の送達系を用いて、LMM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細胞にLMMをコードするポリヌクレオチドを送達する。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脾臓の無損傷の脾島内に導入するために可変性であることが証明された(Csete, M.E. ら (1995) Transplantation 27:263-268)。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターは、Armentanoに付与された米国特許第5,707,618号(「Adenovirus vectors for gene therapy」)に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクターについては、Antinozzi, P.A. ら (1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544、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。

【0204】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、LMM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LMMをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純疱疹ウイルス(HSV)系のベクターは、HSV親和性の中枢神経細胞にLMMを導入する際に特に重要である。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは、当業者に公知である。複製適格性単純ヘルペスウイルス(HSV)I型系のベクターは、レポーター遺伝子を霊長類の眼に送達するために用いられてきた(Liu, X. ら (1999) Exp. Eye Res. 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製についても、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号(「Herpes simplex virus swains for gene transfer」)に開示されており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモーターの制御下において細胞に導入される少なくとも1つの外在性遺伝子を有するゲノムを含む組換えHSV d92についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27及びICP22のために除去される組換えHSV系統の作製及び使用について開示している。HSVベクターについては、Goins, W.F. ら (1999) J. Virol. 73: 50

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。

【0205】

別法では、ウイルス(正の一本鎖RNAウイルス)ベクターを用いてLMMをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプの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) Cunn. 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、LMMをコードする配列をウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のLMMをコードするRNAが産生され、高いレベルでLMM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、シンドビスウイルス(SIN)の変異体を有するハムスター正常腎臓細胞(BHK-21)の持続的な感染を確立する能力は、ウイルスの溶解複製を遺伝子治療に適用できるように好適に変更可能であることを示唆している(Dryga, S.A. ら (1997) Virology 228:74-83)。様々な宿主にウイルスを導入できることから、様々なタイプの細胞にLMMを導入することができる。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。

10

20

【0206】

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. ら (1994) in: Huber, B.E. 及び B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, 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。

30

【0207】

リボザイムは酵素性RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用のメカニズムは、ヌクレオチド鎖切断に先立つ相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異性ハイブリダイゼーションに参与している。例えば、遺伝子工学的に作られたハンマーヘッド型リボザイム分子が、LMMをコードする配列の内ヌクレオチド鎖分解性の切断を特異的且つ効果的に触媒できる可能性がある。

40

【0208】

任意の潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUU、GUC配列を含めたりボザイム切断部位に対する標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。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

50

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。

【0209】

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、LMMをコードするDNA配列の*in vitro*及び*in vivo*転写によってRNA分子を産出し得る。このようなDNA配列は、T7やSP6等の好適なRNAポリメラーゼプロモーターを用いて多様なベクター内に取り込むことが可能である。或いは、相補的RNAを構成的或いは誘導的に合成するようなこれらcDNA産物を、細胞系、細胞または組織内に導入することができる。

10

【0210】

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、内在性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンにアセチル-、メチル-、チオ-及び同様の修飾をしたものの他、非従来型塩基、例えばイノシン(queosine)、ワイプトシン(wybutosine)等を加えることでできる。

20

【0211】

本発明の更なる実施例は、LMMをコードするポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。限定するものではないが特異ポリヌクレオチドの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プロモーターのいずれかとして作用することによりポリヌクレオチド発現を変異し得る。従って、LMMの発現または活性の増加に関連する疾患の治療においては、LMM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、LMM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、LMM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。

30

【0212】

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。LMM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、*in vitro*無細胞再構成系または再構成生化学系があり得る。LMMをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で通常知られている任意の方法でアッセイする。通常、LMM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、特異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

40

50

び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較に対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を変異する際に試験化合物が有効であることを示している。特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物に対して、例えば Schizosaccharomyces pombe 遺伝子発現系 (Atkins, D. ら (1999) 米国特許第 5,932,435 号、Arndt, G.M. ら (2000) Nucleic Acids Res. 28 : E15) または HeLa 細胞等のヒト細胞系 (Clarke, M.L. ら (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268 : 8-13) を用いてスクリーニングを実行する。本発明の特定の実施例は、特異的ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性のためのオリゴヌクレオチド (デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、修飾オリゴヌクレオチド) の組み合わせライブラリをスクリーニングすることに関与している (Bruice, T.W. ら (1997) 米国特許第 5,686,242 号、Bruice, T.W. ら (2000) 米国特許第 6,022,691 号)。

【0213】

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

【0214】

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。

【0215】

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

【0216】

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

【0217】

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

【0218】

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

【0219】

特殊形状の成分は、LMM またはその断片を含む高分子を直接細胞内輸送するために調製

される。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。或いは、LMMまたはその断片をHIV Tat-1タンパク質から陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質は、マウスモデル系の脳を含む全ての組織の細胞に形質導入することがわかっている (Schwarze, S. R. ら (1999) Science 285: 1569-1572)。

【0220】

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

10

【0221】

医学的に効果的な薬用量は、症状や容態を回復させる、たとえばLMMまたはその断片、LMMの抗体、LMMのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなどの活性処方成分の量に関連する。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%の医薬的有効量) 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成分が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトに用いるための投与量の範囲を調剤するのに用いられる。このような組成物が含まれる投与量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、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

【0222】

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。作用期間が長い成分は、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって3~4日毎に1度、1週間に1度、或いは2週間に1度の間隔で投与し得る。

30

【0223】

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。

【0224】

(診断)

別の実施例では、LMMに特異的に結合する抗体が、LMMの発現によって特徴付けられる疾患の診断、またはLMMやLMM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られる。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方法と同じ方法で調合される。LMMの診断アッセイには、抗体及び標識を利用してヒトの体液において或いは細胞や組織のエキスにおいてLMM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。

40

50

【0225】

LMMを測定するためのELISA,RIA,及びFACSを含む種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変わった或いは異常なレベルのLMMの発現を診断する元となるものを提供する。正常或いは標準的なLMM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とLMMに対する抗体とを結合させることによって決定する。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。被験者のLMMの発現の量、制御及び疾患、生検組織からのサンプルが基準値と比較される。基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。

【0226】

本発明の別の実施例によれば、LMM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。ポリヌクレオチドは、検体におけるLMMの発現が疾患と相関し得るような該検体における遺伝子発現の検出及び定量に用いることができる。この診断アッセイを用いて、LMMの存在の有無、更に過剰な発現を調べ、治療中のLMM値の調節を監視する。

【0227】

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

【0228】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、LMMをコードする任意の配列と少なくとも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には、DNAあるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO: 7-12の配列、或いはGCRC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。

【0229】

LMM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、LMM及びLMM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、³²Pまたは³⁵S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。

【0230】

LMMをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、LMMの発現に関連する疾患を診断することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例として、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌を含む癌、具体的には副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌等が含まれ、神経障害として、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキ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、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、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄

10

20

30

40

50

膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー、クロイツフェルト ヤコブ病及びガストマン ストラウスラー 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、神経系の栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管芽腫症 (cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、精神薄弱、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、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害及び精神分裂病を含む精神障害と、季節型感情障害 (SAD) と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症 (corticobasal degeneration)、家族性前頭側頭骨痴呆が含まれ、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、自己免疫多発性内分泌腺障害症 (APCED)、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、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、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、過敏性大腸症候群、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、全身性硬化症、血小板減少症、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、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症及び外傷が含まれ、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、腹部アングナ、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、肝臓の受動性うっ血、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、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、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、肝炎、血色素症、ウィルソン病、₁ 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、門脈循環閉塞及び血栓、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、結節性再生及び腺腫、癌腫を含む肝癌が含まれる、また皮膚障害には、皮膚炎、湿疹、魚鱗癬、角化症、乾癬、強皮症、皮膚萎縮症、脂質異常の中には、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、ミオアデニレートデミネラーゼ欠乏症、高トリグリセリド血症、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、変染色性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、G_M₂ にガングリオシドーシス、セロイドリポフスチン症、無リポ蛋白血症、タンジアー病、リポ蛋白過剰血症、糖尿病、脂肪異常栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪組織壊死症、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、リポイドネフローゼ、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、甲状腺症機能低下症、腎臓病、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乏症、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、脂肪過剰血症、脂質筋障害、肥満症が含まれる。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、静脈奇形、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管の腫瘍、血栓崩壊の合併症、バルーン血管形成術 (balloon angioplasty)、

10

20

30

40

50

血管置換術、大動脈冠動脈バイパス術移植手術 (coronary artery bypass graft surgery) などの血管疾患と、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、僧帽弁輪状石灰化 (mitral annular calcification)、僧帽弁脱出、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、心臓移植の合併症などの心疾患、先天性肺異常、肺拡張不全、肺うっ血及び肺水腫、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、拘束型肺疾患、慢性閉塞性肺疾患、肺気腫、慢性気管支炎、気管支喘息、細気管支拡張症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎及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、過敏症肺炎、肺好酸球増加閉塞性細気管支炎 器質性肺炎 (pulmonary eosinophilia 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、肺併発膠原血管病併発性肺疾患、肺胞たんぱく症、肺腫瘍、炎症性及び非炎症性胸水、気胸症、胸膜腫瘍、薬物性肺疾患、放射線による肺疾患、及び肺移植の合併症などが含まれる。LMMをコードするポリヌクレオチド配列は、サザーン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術、PCR法、ディップスティック (dipstick)、ピン (pin)、ELISA式アッセイ、及び変異LMMの発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用するマイクロアレイに使用することが可能である。このような定性方法または定量方法は、当分野で公知である。

【0231】

ある実施態様では、LMMをコードするヌクレオチド配列は、関連する疾患、特に上記した疾患を検出するアッセイにおいて有用であろう。LMMをコードするヌクレオチド配列は標準法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下で、患者から採取した体液または組織のサンプルに添加することができる。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。患者サンプルのシグナル量が対照サンプルと比べて著しく変化している場合は、サンプル内のLMMをコードするヌクレオチド配列の変異レベルは関連する疾患の存在を示している。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。

【0232】

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

【0233】

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ペ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。

【0234】

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

ことが可能となる。

【0235】

LMMをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドを追加的に診断上利用することは、PCRの利用に關与し得る。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LMMをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはLMMをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適な条件下で、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。

【0236】

或る態様において、LMMをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて1塩基多型性(SNP)を検出し得る。SNPは、多くの場合にヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となるような置換、挿入及び欠失である。限定するものではないがSNPの検出方法には、SSCP(single-stranded conformation polymorphism)及び蛍光SSCP(fSSCP)がある。SSCPでは、LMMをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)でDNAを増幅する。DNAは例えば、病変組織または正常組織、生検サンプル、体液その他に由来し得る。DNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR生成物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。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重畳する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。

【0237】

LMMの発現を定量するために用い得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、調節核酸の相互増幅(coamplification)及び標準曲線から得た結果の補間もある(例えば、Melby, P.C.ら(1993) J. Immunol. Methods, 159:235-244; Duplaa, C.ら(1993) Anal. Biochem. 212:229-236を参照)。目的のオリゴマーあるいはポリヌクレオチド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。

【0238】

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

20

30

40

50

【0239】

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

【0240】

或る実施例は、或る組織または細胞タイプの転写イメージを生成するような本発明のポリヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織または細胞タイプにより遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所与の条件下で所与の時間に発現した遺伝子の数及び相対存在量を定量することにより分析し得る (Seilliamerらの米国特許第5,840,484号「Comparative Gene Transcript Analysis」を参照)。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。

【0241】

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

【0242】

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サインと称されるような特徴的な遺伝子発現パターンを惹起する (Nuwaysir, E. F. ら. (1999) Mol. Carcinog. 24:153-159、Steiner, S. 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 Release 00-02を参照されたい。これについては <http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm> で入手可能である)。従って、中毒学的スクリーニングの際に毒性シグネチャを用いて、全ての発現した遺伝子配列を含めることは重要且つ望ましいことである。

【0243】

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

ブ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。

【0244】

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

10

20

【0245】

プロテオームのプロファイルは、LMMに特異的な抗体を用いてLMM発現レベルを定量することによっても作成可能である。或る実施例では、マイクロアレイ上でエレメントとして抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝して各アレイ要素へのタンパク質結合レベルを検出することによりタンパク質発現レベルを定量する(Lueking, A. ら(1999) Anal. Biochem. 270:103-111、Mendozze, L.G. ら(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。

30

【0246】

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タンパク質のプロフィールを変化させるような化合物の分析においてプロテオーム毒性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、タンパク質のプロフィール作成はこのような場合により信頼でき、情報価値がある。

40

【0247】

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。

50

【0248】

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。

【0249】

マイクロアレイは、本技術分野でよく知られている方法を用いて調製し、使用し、そして分析する (Brennan, T. M. ら (1995) の米国特許第 5, 474, 796 号、Schena, M. ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweiler らの (1995) PCT 出願第 WO95/251116 号、Shalon, D. らの (1995) PCT 出願第 WO95/35505 号、Heller, R. A. ら (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155、Heller, M. J. らの (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って本明細書の一部となす。

【0250】

本発明の別の実施例ではまた、LMM をコードする核酸配列を用いて、天然のゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブを作製することが可能である。コード配列または非コード配列のいずれかを用いることができ、或る例では、コード配列全体で非コード配列が好ましい。例えば、多重遺伝子ファミリーのメンバー内でのコード配列の保存により、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、細菌 P1 産物、或いは単一染色体 cDNA ライブラリに対してマッピングされる (Harrington, J. J. 他 (1997) Nat. Genet. 15:345-355; Price, C. M. (1993) Blood Rev. 7:127-134; Trask, B. J. (1991) Trends Genet. 7:149-154 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. 及び D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357 を参照)。

【0251】

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相関し得る (前出の Heinz-Ulrich, ら (1995) in Meyers, 965-968 ページ等を参照)。遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいは Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見ることができる。物理的な染色体地図上の LMM をコードする遺伝子の位置と特定の疾患との相関性、或いは特定の疾患に対する素因が、このような疾患と関連する DNA 領域の決定に役立つため、更なる位置を決定するクローニングが行われる。

【0252】

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の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置することにより、特定のヒト染色体の数或いはアームが分かっていない場合でも関連するマーカーを明らかにし得る。この情報は、位置クロ

10

20

30

40

50

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調査する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、該領域に対するいかなる配列マッピングも、更なる調査のための関連遺伝子或いは調節遺伝子を表すことができる(Gatti, R. A.ら(1988) Nature 336:577-580等を参照)。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。

【0253】

本発明の別の実施例では、任意の種々の薬剤スクリーニング技術を以って化合物のライブラリをスクリーニングするために、LMM、LMMの触媒作用断片、免疫原断片、またはそのオリゴペプチドを用いることができる。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置することになる。LMMと検査する薬剤との結合による複合体の形成を測定してもよい。

10

【0254】

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(Geyssen,らの(1984) PCT出願番号WO84/03564等を参照)。この方法においては、多数の異なる小さな試験用化合物を固体基質上で合成する。試験用化合物は、LMM或いはその断片と反応させ、洗浄する。次ぎに、結合されたLMMが、当分野で周知の方法で検出される。精製されたLMMはまた、前記した薬剤をスクリーニングする技術に用いられるプレート上で直接被覆することもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

20

【0255】

別の実施例では、競合薬スクリーニングアッセイを用いることができる。このアッセイでは、LMMを結合することができる中和抗体が、LMMを結合するための試験化合物と特異的に競合する。この方法では、抗体が、1個若しくは数個の抗原決定因子をLMMと共有するペプチドの存在を検出する。

【0256】

別の実施例では、将来に開発される分子生物学技術で、現在知られているヌクレオチド配列の特性(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)に依存しているならば、LMMをコードするヌクレオチド配列にその新技術を用い得る。

30

【0257】

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。

【0258】

前述した及び以下に記載する全ての特許出願、特許、刊行物、米国特許出願第60/227,429号、同第60/231,370号、同第60/233,212号、および同第60/236,885号も含めて言及することをもって本明細書の一部とする。

40

【0259】

(実施例)

1 cDNAライブラリの作製

Incyte cDNAは、LIFESEQ GOLDデータベース(Incyte Genomics, Palo Alto CA)に記載されたcDNAライブラリに由来するものであり、表4の列5に列記した。ホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解した組織もあり、また、ホモジナイズしてフェノールまたは好適な変性剤の混合液に溶解した組織もある。変性剤の混合液は、例えばフェノールとグアニジニウムイソチオシアネートの単相溶液であるTRIZOL(Life Technologies

50

)等である。結果として得られた溶解物は、塩化セシウムにおいて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。

【0260】

RNAの純度を高めるため、RNAのフェノールによる抽出及び沈殿を必要な回数繰り返した。場合によっては、DNアーゼでRNAを処理した。殆どのライブラリでは、オリゴd(T)連結常磁性粒子(Promega)、OLIGOTEXラテックス粒子(QIAGEN, Valencia CA)またはOLIGOTEX mRNA精製キット(QIAGEN)を用いて、ポリ(A+) RNAを単離した。別法では、別のRNA単離キット、例えばPOLY(A)PURE mRNA精製キット(Ambion, Austin TX)を用いて組織溶解物からRNAを直接単離した。 10

【0261】

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, unit 5.1-6.6等を参照)。逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対して、cDNAのサイズ(300~1000bp)選択は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー(Amersham Pharmacia Biotech)、或いは調製用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。cDNAは好適なプラスミドのポリリンカーの適合する制限酵素部位でライゲーションされた。好適なプラスミドは、例えばPBLUESCRIPTプラスミド(Stratagene)、pSPORT1プラスミド(Life Technologies)またはpINCY(Incycyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA)等である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、或いはLife Technologies社のDH5、DH10BまたはELECTROMAX DH10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に形質転換した。 20 30

【0262】

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。MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム(Promega)、AGTC Miniprep精製キット(Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid及びQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミドキットの中 40

中から少なくとも1つを用いて、プラスミドを精製した。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せずに、4 で保管した。

【0263】

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、単一反応混合液で行った。サンプルを処理し、それを384穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素(Molecular Probes, Eugene OR)及びFLUOROSKANI I蛍光スキャナ(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光分析的に定量した。 50

【0264】

3 シークエンシング及び分析

実施例2に記載したようにプラスミドから回収したIncyte cDNAを、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンス反応は、標準的方法或いは高処理装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) またはPTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research) をHYDRAマイクロディスペンサー (Robbins Scientific) またはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムと併用して処理した。cDNAのシークエンス反応は、Amersham Pharmacia Biotech社が提供する試薬、またはABIシークエンシングキット、例えばABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) の試薬を用いて準備した。cDNAのシークエンス反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム (Molecular Dynamics) 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シークエンシングシステム (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, unit 7.7に概説) を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例8に記載した方法で配列を伸長させた。

【0265】

Incyte cDNA配列に由来するポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリ(A)配列を除去し、あいまいな塩基対をマスクすることによって有効性を確認した。その際、BLAST、動的プログラミング及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。次に、BLAST、FASTA及びBLIMPSに基づくプログラムを用いて、プログラム中の注釈を得るべく、公共のデータベース、例えばGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳動物、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPFAM等の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の選択に対してIncyte cDNA配列またはその翻訳を問い合わせた(HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を分析する確率的アプローチである。例えば、Eddy, S.R. (1996) Curr. Opin. Struct. Biol. 6:361-365を参照のこと)。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、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びProsite等のデータベース、PFAM等の隠れマルコフモデル(HMM)ベースのタンパク質ファミリーデータベースに対する問合せによって完全長ポリペプチド配列を分析した。完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア(日立ソフトウェアエンジニアリング, South San Francisco CA)及びLASERGENEソフトウェア(DNA STAR)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

Nマルチシーケンシングプログラム(DNA STAR)に組み込まれているようなCLUSTALアルゴリズムによって特定されるデフォルトパラメータを用いて生成する。

【0266】

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

10

【0267】

完全長ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列の組み立て及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO: 7-12のポリヌクレオチド配列断片の同定にも利用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用である約20~約4000ヌクレオチドの断片を表4の列4に示した。

【0268】

4 ゲノムDNAからのコード配列の同定及び編集

推定上の脂質代謝酵素は、公共のゲノム配列データベース(例えば、gbpriやgbhtg)においてGenscan遺伝子同定プログラムを実行して初めに同定された。Genscanは、様々な生物からゲノムDNA配列を分析する汎用遺伝子同定プログラムである(Burge, C. 及び S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268: 78-94、Burge, C. 及び S. Karlin (1998) Cuff. Opin. Struct. Biol. 8: 346-354参照)。プログラムは予測エキソンを連結し、メチオニンから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推定cDNA配列の内、どの配列が脂質代謝酵素をコードするかを決定するために、コードされたポリペプチドをPFAMモデルにおいて脂質代謝酵素について問合せて分析した。脂質代謝酵素としてアノテーションが付けられたIncyteのcDNA配列に対する相同性を基に、可能性のある脂質代謝酵素が同定された。こうして選択されたGenscan予測配列は、次にBLAST分析により公共データベースgbpri及びgbhtgと比較した。必要であれば、genpeptからヒットしたトップのBLASTと比較することによりGenscan予測配列を編集し、余分なまたは取り除かれたエキソンなどのGenscanにより予測された配列のエラーを修正する。BLAST分析はまた、任意のIncyte cDNAまたはGenscan予測配列の公共cDNA適用範囲の発見に用いられるので、転写の証拠を提供する。Incyte cDNA適用範囲が利用できる場合には、この情報を用いてGenscan予測配列を修正または確認した。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例3に記載された構築プロセスを用いて、Incyte cDNA配列及び/または公共のcDNA配列でGenscan予測コード配列を構築することにより得た。或いは、完全長ポリヌクレオチド配列は編集または非編集のGenscan予測コード配列に完全に由来する。

20

30

40

【0269】

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

50

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。間隔全体の長さがクラスタ中の2以上の配列に存在するような配列を同定し、そのように同定された間隔は推移により等しいと考えられた。例えば、1つのcDNA及び2つのゲノム配列に間隔が存在する場合、3つの間隔は全て等しいと考えられる。このプロセスは、無関係であるが連続したゲノム配列をcDNA配列により結び合わせて架橋し得る。このようにして同定された区間を、親配列 (parent sequence) に沿って現われるようにステッチアルゴリズムで縫い合わせ、可能な最も長い配列および変異配列を作製する。1種類の親配列に沿って発生した間隔と間隔との連鎖 (cDNA - cDNA または ゲノム配列 - ゲノム配列) は、親の種類を変える連鎖 (cDNA - ゲノム配列) に優先した。結果として得られるステッチ配列は、BLAST分析により公共データベース genpept 及び gbpr1 に翻訳されて比較された。Genscanにより予測された不正確なエキソンは、genpept からヒットしたトップのBLASTと比較することにより修正した。必要な場合には、追加cDNA配列を用いるかゲノムDNAの検査により配列を更に伸長させた。

【0270】

ストレッチ配列 (Stretched Sequence)

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

【0271】

6 LMM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: 7-12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: 7-12と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrap (表7) などの構築アルゴリズムを使用して、連続及び重複した配列のクラスターに組み入れた。スタンフォード・ヒトゲノムセンター (SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所 (WIGR)、Genethon等の公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッド及び遺伝地図データを用いて、クラスタ化された配列が前もってマッピングされたかを測定した。マッピングされた配列がクラスタに含まれている結果、個々の配列番号を含めてそのクラスタの全配列が地図上の位置に割り当てられた。

【0272】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または間隔として表される。センチモルガン間隔の地図上の位置は、染色体のpアームの末端に関連して測定する。(センチモルガン (cM) は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、1cMは、ヒト中のDNAの1メガベース (Mb) にほぼ等しい。尤も、この値は、組換えのホットスポット及びコールドスポットに起因して広範囲に変化する。) cM距離は、配列が各クラスタ内に含まれるような放射線ハイブリッドマーカーに対して境界を提供するようなGenethonによってマッピングされた遺伝マーカーに基づく。NCBI「GeneMap 99」 (<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。

【0273】

7 ポリヌクレオチド発現の分析

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

【0274】

BLASTに適用する類似のコンピュータ技術を用いて、GenBankやLifeSeq (Incyte Pharmaceuticals)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する。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同的なものとして分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を変更することができる。検索の基準は積スコアであり、次式で定義される。

【数1】

(BLASTスコア×配列一致率)

$5 \times (\text{長さ(配列1)}, \text{長さ(配列2)})$ の最小値

10

【0275】

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

30

【0276】

或いは、LMMをコードするポリヌクレオチド配列は、由来する組織に対して分析する。例えば或る完全長配列は、Incyte cDNA配列(実施例3を参照)と少なくとも一部は重畳するように構築される。各cDNA配列は、ヒト組織から作製されたcDNAライブラリに由来する。各ヒト組織は、心血管系、結合組織、消化系、胚構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖器、男性生殖器、生殖細胞、血液および免疫系、肝臓、筋骨格系、神経系、膵臓、呼吸器系、感覚器官、皮膚、顎口腔系、分類不能/混合、または尿管などの生物/組織のカテゴリーの一つに分類される。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、鬱血、その他の一つに分類される。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、LMMをコードするcDNAの疾患特異的な発現を反映する。cDNA配列およびcDNAライブラリ/組織の情報は、LIFESEQ GOLD データベース(Incyte Genomics, Palo Alto CA)から得ることができる。

40

【0277】

50

8 ポリヌクレオチドをコードするLMMの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列もまた、完全長分子の適切な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて該断片を伸長させて生成した。一方のプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマーの設計は、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が50%以上となり、約68~72の温度で標的配列にアニーリングするように、OLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences)或いは別の適切なプログラムを用いて、cDNAから設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの区間は全て回避した。

【0278】

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。

【0279】

高忠実度の増幅が、当業者によく知られている方法を利用したPCR法によって得られた。PCRは、PTC-200サーマルサイクラー(MJ Research, Inc.)を用いて96穴プレート内で行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200nmol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秒間、ステップ3:60で1分間、ステップ4:68で2分間、ステップ5:ステップ2、3及び4を20回繰り返す。ステップ6:68で5分間、ステップ7:4で保存。別法では、プライマー対、T7とSK+に対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ1:94で3分間、ステップ2:94で15秒間、ステップ3:57で1分間、ステップ4:68で2分間、ステップ5:ステップ2、3及び4を20回繰り返す。ステップ6:68で5分間、ステップ7:4で保存。

【0280】

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

【0281】

伸長させたヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して384穴プレートに移し、CviJIコ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、pUC18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pUC18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)で処理して制限部位の張出部(overhang)を満たし、大腸菌細

10

20

30

40

50

胞に形質移入した。形質移入した細胞を抗生物質含有培地上で選択し、個々のコロニーを選択してLB / 2 x carb液体培地の384穴プレート内において37 で一晩培養した。

【0282】

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

10

【0283】

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

20

【0284】

9 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識及び使用
SEQ ID NO : 7 - 12 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を、OLIGO4.06ソフトウェア (National Bioscience) のような最新式のソフトウェアを用いてデザインし、50 pmol の各オリゴマーと、250 μ Ci の [γ -³²P] アデノシン三リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech)) 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) とを組み合わせて用い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、EcoRI、Pst I、Xba I 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10⁷ 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。

30

【0285】

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0.1x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。

40

【0286】

10 マイクロアレイ
マイクロアレイの表面上でアレイエレメントの連鎖または合成は、フォトリソグラフィ、

50

圧電印刷（インクジェット印刷、前出のBaldeschweiler等を参照）、機械的マイクロ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質は、均一且つ非多孔性の固体とするべきである（Sचना（1999）前出）。推奨する基質には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウエハがある。或いは、ドット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質の表面にエレメントを配置及び結合させてもよい。通常のアレイは、手作業で、または利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る（Sचना, M. ら（1995）Science 270: 467-470、Shallon, D. ら（1996）Genome Res. 6: 639-645、Mars hall, A. 及び J. Hodgson（1998）Nat. Biotechnol. 16: 27-31. を参照）。

【0287】

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。

【0288】

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、0.05 pg/μlのオリゴ（dT）プライマー（21mer）、1×第一鎖合成バッファー、0.03 unit/μlのRNアーゼ阻害因子、500 μMのdATP、500 μMのdGTP、500 μMのdTTP、40 μMのdCTP、40 μM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、GEMBR IGH Tキット（Incyte）を用いて200 ngのポリ（A）⁺ RNA含有の25体積ml内で行う。特異的制御ポリ（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。37 で2時間インキュベートした後、各反応サンプル（1つはCy3、もう1つはCy5標識）は、2.5 mlの0.5 M水酸化ナトリウムで処理し、85 で20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを分解させる。サンプルは、2つの連続するCHROMA 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。結合後、2つの反応サンプルは、1 mlのグリコーゲン（1 mg/ml）を用いて析出させたエタノール、60 mlの酢酸ナトリウム及び300 mlの100%エタノールである。サンプルは次に、Speed VAC（Savant Instruments Inc., Holbrook NY）を用いて乾燥して仕上げ、14 μl 5×SSC/0.2% SDS中で再懸濁する。

【0289】

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、cD

NAインサートの側面に位置するベクター配列に相補的なプライマーを用いる。30サイクルのPCRによって、1~2 ngの初期量から5 µg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。

【0290】

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音波をかけ、蒸留水で非常に良く洗って洗浄する。スライドガラスは、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って洗浄し、95%エタノール中で0.05%アミノプロピルシラン(Sigma)を用いてコーティングする。コーティングしたスライドガラスは、110 °Cの天火で硬化させる。

10

【0291】

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。平均濃度が100 ng/µlのアレイエレメントDNA 1 µlを高速機械装置により開放型キャピラリープリンティングエレメント(open capillary printing element)に充填する。装置はここで、スライド毎に約5 nlのアレイエレメントサンプルを加える。

20

【0292】

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 °C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。

【0293】

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×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 µg含む9 µl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 °C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 cm²のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡用スライドより僅かに大きい空洞を有する防水チェンバーに移す。チェンバーのコーナーに140 µlの5×SSCを加えることにより、チェンバー内部を湿度100%に保持する。アレイを含むチェンバーは、60 °Cで約6.5時間インキュベートする。アレイは、第1洗浄緩衝液中(1×SSC, 0.1%SDS)において45 °Cで10分間洗浄し、第2洗浄緩衝液中(0.1×SSC)において45 °Cで10分間各々3度洗浄して乾燥させる。

30

【0294】

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

40

【0295】

2つの異なるスキャンで、混合ガスマルチラインレーザは2つの蛍光色素を連続的に励起

50

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ーを用いて、蛍光色素1つにつき1度スキャンし、各アレイを通常2度スキャンする。

【0296】

スキャンの感度は通常、既知濃度のサンプル混合体に添加されるcDNA対照種により生成されるシグナル強度を用いて較正する。アレイ上の特定の位置には相補的DNA配列が含まれ、その位置におけるシグナルの強度をハイブリダイジング種の重量比1:100,000に相関させる。異なる源泉(例えば試験される細胞及び対照細胞など)からの2つのサンプルを、各々異なる蛍光色素で標識し、他と異なって発現した遺伝子を同定するために単一のアレイにハイブリダイズする場合には、その較正を、2つの蛍光色素で較正するcDNAのサンプルを標識し、ハイブリダイゼーション混合体に各々等量を加えることによって行う。

10

【0297】

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起因する)を補正する。

20

【0298】

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

30

【0299】

11 相補的ポリヌクレオチド

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

40

【0300】

12 LMMの発現

LMMの発現及び精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌でLMMを発現するために、抗生物質耐性及びcDNAの転写レベルを高める誘導性のプロモーターを含む好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターには、lacオペレーター調節エレメントに関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)等の好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピル-Dチ

50

オガラクトピラノシド (IPTG) で誘発されると LMM を発現する。真核細胞での LMM 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ている組換え *Autographica californica* 核多角体病ウイルス (AcMNPV) を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須の多角体遺伝子を、相同組換え或いは転移プラスミドの媒介を伴う細菌の媒介による遺伝子転移のどちらかによって、LMM をコードする cDNA と置換する。ウイルスの感染力は維持され、強い多角体プロモーターによって高いレベルの cDNA の転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合は *Spodoptera frugiperda* (Sf9) 昆虫細胞に感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場合は、バキュロウイルスの更なる遺伝的変更が必要になる (Engelhard, E. K. ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3224-3227, Sandig, V. ら (1996) Hum. Gene Ther. 7: 1937-1945. 等を参照)。

10

【0301】

殆どの発現系では、LMM が、例えばグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST)、または FLAG や 6-His などのペプチドエピトープ標識で合成された融合タンパク質となるため、未精製の細胞溶解物からの組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製が素早く 1 回で行うことができる。GST は日本住血吸虫からの 26 kDa 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 の部分を特定の開発部位において LMM からタンパク質的に切断することが可能である。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 LMM を直接用いて以下の実施例 16、及び 17 のアッセイを行うことができる。

20

【0302】

13 機能的アッセイ

LMM 機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでの LMM をコードする配列の発現によって評価する。cDNA を、cDNA を高いレベルで発現する強いプロモーターを含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする。選択されるベクターには、pCMV SPORT プラスミド (Life Technologies) 及び pCR3.1 プラスミド (Invitrogen) が含まれ、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを有する。リポソーム製剤或いは電気穿孔法を用いて、5 ~ 10 µg の組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来または造血由来の細胞株に一時的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む 1 ~ 2 µg のプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、cDNA の組換えベクターからの発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、CD64 または CD64-GFP 融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザー光学に基づく技術であるフローサイトメトリー (FCM) を用いて、GFP または CD64-GFP を発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。FCM は、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取込を検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、プロピジウムヨウ化物による DNA 染色によって計測される核 DNA 内容物の変化、前方散乱光と 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

30

40

50

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。

【0303】

遺伝子発現におけるLMMの影響は、LMMをコードする配列とCD64またはCD64-GFPのどちらかが形質移入された高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。CD64またはCD64-GFPは、形質転換された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG(IgG)の保存領域と結合する。形質転換された細胞と形質転換されない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体のどちらかで被覆された磁気ビードを用いて分離することができる(DYNAL, Lake Success, NY)。mRNAは、当分野で周知の方法で細胞から精製することができる。LMM及び目的の他の遺伝子をコードする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。

10

【0304】

14 LMMに特異的な抗体の作製

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

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

20

【0305】

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及びLMM活性を検査するには、ペプチドまたはLMMを基質に結合し、1%BSAを用いてブロックし、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素で標識したヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

30

【0306】

15 特異的な抗体を用いる天然LMMの精製

天然LMM或いは組換えLMMを、LMMに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化SEPHAROSE(Amersham Pharmacia Biotech)のような活性化クロマトグラフィー用レジンと抗LMM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。

40

【0307】

LMMを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、LMM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。抗体とLMMの結合を破壊する条件(例えばpH2~3の緩衝液、或いは尿素またはチオシアン酸塩イオン等の高濃度のカオトロップ剤)でカラムを溶出させ、LMMを回収する。

【0308】

16 LMMと相互作用する分子の同定

LMMまたは生物学的に活性であるLMM断片を、¹²⁵I ボルトンハンター試薬で標識

50

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に予め配列しておいた候補の分子を、標識した LMM と共にインキュベートし、洗浄して、標識した LMM 複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々な LMM 濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合した LMM の数量及び親和性、会合についての値を計算する。

【0309】

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

10

【0310】

LMM はまた、ハイスループットな方法で酵母 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 大ライブラリにコードされる遺伝子間の全ての相互作用を決定することができる (Nandabalan, K. ら (2000) 米国特許第 6,057,101 号)。

【0311】

17 LMM 活性の実証

LMM 活性は、1-パルミトイル-2-[1-¹⁴C]オレオイル ホスファチジルコリン (Sigma-Aldrich 社) を含む小胞を使った *in vitro* 加水分解アッセイによって立証できる。LMM のトリグリセリドリパーゼ活性とホスホリパーゼ A₂ 活性は、加水分解反応混合液から単離された切断生成物の分析によって立証できる。

20

【0312】

1-パルミトイル-2-[1-¹⁴C]オレオイル ホスファチジルコリン (Amersham Pharmacia Biotech 社) を含む小胞は、2.0 μCi の放射標識されたリン脂質を 12.5 mg の無標識の 1-パルミトイル-2-オレオイル ホスファチジルコリンに混ぜ、窒素ガスで混合液を乾燥させることによって調製する。2.5 ml の 150 mM Tris-HCl (pH 7.5) が加えられ、混合液は超音波処理にかけられ遠心される。上澄みは 4 で保管され得る。最終的な反応混合液は、0.25 ml の Hanks バッファー (pH 7.4) の入った塩溶液に 2.0 mM タウロケノデオキシコール酸 (taurochenodeoxycholate)、1.0% のウシ血清アルブミン、1.0 mM 塩化カルシウム、150 μg の 1-パルミトイル-2-[1-¹⁴C]オレオイル ホスファチジルコリン小胞、及び PBS に希釈された種々の量の LMM が含まれる。37 で 30 分インキュベーションした後、リゾホスファチジルコリンとオレイン酸をそれぞれ 20 μg、キャリアとして加え、全脂質を得るために各サンプルを抽出する。脂質は、溶媒の前面がプレートの半分に来るまではクロロフォルム：メタノール：酢酸：水 (65:35:8:4) の 2 溶媒システムを使って、薄層クロマトグラフィーで分離する。このプロセスは、その後、溶媒の前面がプレートの一番上に来るまでヘキサン：エーテル：酢酸 (86:16:1) で続ける。脂質を含む領域はヨウ素蒸気で視覚化し、そのスポットをすりしがして、その放射能をシンチレーション計数で決定する。より多量の LMM 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た放射エネルギーが増加し、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 A₂ 活性の特性として、LMM が sn-1 位置ではなく sn-2 位置を切断することを立証する。

30

40

【0313】

或いは、LMM のホスホリパーゼ活性は、ホスファチジルセリンの sn-1 位置で脂肪酸残基の加水分解を測定される。LMM が、好適なバッファー中で三重水素 [³H] 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

50

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を説明するために、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 [³H]アシルグリセロホスホセリンを表している。 [³H]アシルグリセロホスホセリンは、生物サンプルでのLMM活性に直接比例する。

【0314】

LMM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LMMリポキシゲナーゼタンパク質を100 μMの[1-¹⁴C]アラキドン酸、又は他の無標識脂肪酸と30分間37 °C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。流出物を235 nmでモニタして、12-HPETE(12-LOXにより触媒される)などの主要なアラキドン酸の代謝産物の存在のために分析する。画分もまた液体シンチレーショ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LMM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HPLC及び質量分析器で分析される(Sun, D. 他(1998) J. Biol. Chem. 273:33540-33547)。

10

20

【0315】

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。

【0316】

(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。

30

【0317】

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

【0318】

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。

【0319】

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。

40

【0320】

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。

【0321】

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。

【0322】

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。

50

【表 1】

表 1

Incyte プロジェクト ID	ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	ポリスクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリスクレオチド ID
7479063	1	7479063CD1	7	7479063CB1
7479064	2	7479064CD1	8	7479064CB1
7478088	3	7478088CD1	9	7478088CB1
7480935	4	7480935CD1	10	7480935CB1
7481764	5	7481764CD1	11	7481764CB1
72023748	6	72023748CD1	12	72023748CB1

10

20

30

【表 2】

表 2

ポリクワチド SEQ ID NO:	Incyte ポリクワチド ID	GenBank ID NO.	融解スコア	GenBank 相合体
1	7479063CD1	G505053	5.20E-116	[ヒト]リソソーム酸性リパーゼ
2	7479064CD1	G14749	2.30E-97	[ドブネズミ] prelingual リパーゼ
3	7478088CD1	G219393	4.10E-08	アラキドン酸 12 リボキシゲナーゼ[ヒト] (Yoshimoto.T. 5.(1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 172: 1230-1235; Yoshimoto.T. 5. (1992) J. Biol. Chem. 267: 24805-24809).
4	7480935CD1	G579561	1.40E-142	pregastric リパーゼ [ヒト] (Tubb 5.(1986) 特許第 WO 8603778-A 号)
5	7481764CD1	G537514	1.60E-47	アノールアセトアミド脂アセチル化酵素[ヒト] (Probst,M.R. 5.(1994) J. Biol. Chem. 269: 21650-21656)
6	72023748CD1	G6705987	2.10E-151	ホスホリパーゼ C-L2[ハツカネズミ] (Otsuki,M. 5. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266: 97-103)

【表 3】

10

20

30

表 3-1

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
1	7479063CD1	403	S130 S137 S147 S209 S248 S271 S279 F135 T167 T190 T353 T58 Y173	N105 N165 N277 N325 N40	リパーゼ、セリン活性部位:A152-N201 α/β ヒドロラーゼファミリーabhydrolase:Y117-I396 トリアシルグリセロールリパーゼ、舌 DM02342 P38571 3-397:M7-Y402 トリアシルグリセロールリパーゼ、舌 DM02342 P07098 35-395:S42-M399 トリアシルグリセロールリパーゼ、舌 DM02342 JC4017 1-394:M7-M399 トリアシルグリセロールリパーゼ、舌 DM02342 P04634 32-394:M39-M399 リパーゼヒドロラーゼ前駆体シグナル脂質分解タンパク質 糖蛋白質 エステラーゼ トリアシルグリセロール PD003556 F26-M399 リパーゼ、セリン活性部位:L172-T181 SpSCAN signal_cleavage:M1-N22	PROFILESCAN HMMER_PFBAM BLAST_DOMO BLAST_DOMO BLAST_DOMO BLAST_DOMO BLAST_PRODOM
2	7479064CD1	289	S109 S124 S131 S141 S218 S263 T184 T203 T215 T235 T52	N100 N34 N99	リパーゼ、セリン活性部位:A146-F195 トリアシルグリセロールリパーゼ、舌 DM02342 P04634 32-394:M33-M272 JC4017 1-394:M1-N282 P07098 35-395:I35-N271 P38571 3-397:N28-M272 リパーゼヒドロラーゼ前駆体シグナル脂質分解タンパク質 糖蛋白質 エステラーゼ トリアシルグリセロール PD003556 N28-N271 シグナルペプチド:M1-G19 リパーゼ、セリン活性部位:L166-T175 signal_cleavage:M1-G19 シグナルペプチド:M1-A39	MOTIFS SPSCAN PROFILESCAN BLAST_DOMO BLAST_PRODOM
3	7479068CD1	168	S117 S157 S6		リパーゼ、セリン活性部位:L166-T175 signal_cleavage:M1-G19 シグナルペプチド:M1-A39	HMMER MOTIFS SPSCAN SPSCAN

【表 4】

表 3-2

SEQ ID NO:	Incyte 求バ ブチド ID	アミノ酸残基 数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシ ル化部位	シグネチン配列、 ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデー タベース
4	7480935CD1	399	T135 T60 S109 S124 S131 S141 S218 S263 S273 T184 T203 T215 T235 T329 T52	N271 N327 N34 N99	PLAT(ポリシチニン-1、リボキシゲナーゼ、 α - ポキシゲナーゼ相同性)ドメイン:V44-E160 シグナルペプチド:M1-G19 シグナルペプチド:M1-G19 α / β ヒドローゼフォールド:Y111-I390 リパーゼ、セリン活性部位:A146-F195 リパーゼヒドローゼ 前駆体 シグナル 脂質 分解 タンパク質 糖蛋白質 エステラーゼ トライアシルグリセロール PD003556:N28-L387 トリアシルグリセロールリパーゼ、舌 DM02342 P04634 32-394:M33-E395 JC4017 1-394:M1-E395 P07098 35-395:I35-E395 P38571 3-397:I28-Y396	HMMER_PFAM HMMER SPSCAN HMMER_PFAM PROFILESCAN BLAST_PRODOM BLAST_DOMO
5	7481764CD1	410	S111 S248 S265 S32 S396 S46 S81 T28	N171 N272	リパーゼ、セリン活性部位:L166-T175 脂肪分解性酵素 G-D-X BL01173A:I118-S130 BL01173B:L149-H175	MOTIFS BLUMPS_BLOCKS
6	72023748CD1	1619	S1008 S1012 S1068 S1132 S1154 S1162 S1169 S1181 S1188 S1195 S1253 S1285 S1485 S1522 S1536 S1584 S184 S278 S343 S430 S531 S543 S576	N1059 N815 N828 N997	ホスファチジルイノシトール特異的 ホスホリパーゼ PI-PLC-X:D848-K993 PI-PLC-Y:A1295-C1340	HMMER_PFAM

【表 5】

表 3-3

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
6			S606 S65 S678 S760 S801 S875 S89 S970 T1029 T1037 T1081 T1219 T1416 T1525 T171 T242 T263 T305 T358 T586 T665 T761 T8 T912 X1232		C2 ドメイン:L1360-T1452	HMMER, PFAM
					プレカストリン相同性ドメイン (PH)A496-A603 ホスホチシリンドール特異的 ホスホリラーゼ X-box ドメインタンパク質 BL50007, F1273-G1314, D1439-I1475, L853-G898, T912-Q949, I977-K993 ホスホリラーゼ C シグネチ PR00390P852-Q870, D878-G898, L1453-R1463, T976-K993, L1278-W1299, W1299-L1317	HMMER, PFAM BLIMPS, BLOCKS
					C2 ドメイン シグネチ PR00360R1381-I1393, N1411-M1424, V1433-D1441 ホスホリラーゼ C ホスホエストラゼ1 ホスホチシリンドール-4, 5 リン酸置換分解 ホスホイシチド特異的あるいはカルシウム結合 PD001214:D848-K993 PD001202:L1226-P1336 PD004439:Q736-Q847, C488-R703, L821-Q851	BLIMPS, PRINTS BLAST, PRODOM

【表 6】

10

20

30

表 3 - 4

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
					1-ホスファチリノイノシトール-4,5-2リン酸 ホスホジエステラーゼ DM00855 P51178 64-472:D742-D1019, S540-R616, P635-A708, I275-W285 P08487 71-500:I735-G1025, I539-M602, G643-R697 P16885 63-486:H743-E1010, I539-L601, M661-H707 A53970 67-522:Y772-P995, I539-M602	BLAST_DOMO

【表 7】

10

20

30

表 4

ポリアレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリアレオチド ID	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
7	7479083CB1	1228	1-331, 390-1228	71075936V1 FL7479063_g7230085_000 016_g2204113	896 1	1228 1212
8	7479064CB1	1143	1-264, 928-1143, 317-357	7989362H1 (UTRCDIC01) FL7479064_g7230085_000 012_g14749	1 274	696 1143
9	7478088CB1	784	1-784	55146716T1 55146715H1	111 1	784 690
10	7480935CB1	1473	1-264, 928-1077, 317-357, 1140-1473	FL7480935_g9801030_000 005_g758964 7889362H1 (UTRCDIC01)	274 1	1473 696
11	7481764CB1	1619	1-1158	GNN.g9795122_000003.ed 1L	1	1668
12	72023748CB1	6551	4004-4191, 1861-1978, 3239-3517, 1-1794, 5526-6125, 4754-5258, 2111-2207	95369512 6875329H1 (EPIMUNN04) 72334958V1 7314090H1 (LIYRNOE07) 55057395J1 6862806F8 (BRAGNON02) 71870033V1 55076578H1 72335316V1 6145149H1 (BRANDIT03) 7617171H1 (KIDNTUBE01) 6892787J1 (BRAITDR03) 7019655H1 (PANCNON03) 72334872V1 6935553H1 (SINTMR02) GNN.g9803388.edit	1204 5670 3898 1509 2908 2462 3455 2166 4535 5453 4153 6154 5899 2652 5237 1	1619 6146 4641 1861 3239 3049 3947 2545 5323 6027 4695 6551 6547 3238 5597 6551

【表 8】

表 5

ポリスクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロジェクト ID	代表的ライブラリ
7	7479063CB1	MONOFXS05
8	7479064CB1	UTRCDIC01
9	7478088CB1	BRONDIT01
10	7480935CB1	UTRCDIC01
12	72023748CB1	PITUNOR01

【表 9】

10

20

表 6

ライブラリ	ハプター	ライブラリの説明
BRONDIT01	pINCY	ライブラリは、気管支のピンチ生検中に22歳から51歳の3人の喘息をもつ白人男性と白人女性の提供者のプールから切除した右下葉気管組織から単離したRNAを用いて作製した。患者の病歴には、一般的な空気アレルギーに対する慢性皮膚病検査により決定したアトピーがある。
MONOTXS05	pINCY	サブトラクショナルハイブリダイゼーションされた単球ライブラリは、処理された単球ライブラリの750万のクローンをを用いて作製した。また2回処理された単球ライブラリから1.03 x 10 ⁶ の7回のサブトラクショナルハイブリダイゼーションにかけられた。サブトラクショナルハイブリダイゼーション用開始ライブラリは、42才の女性から得た末梢血の治癒した単球を用いて作製した。細胞を抗インターロイキン-10(抗-IL-10)とリポ多糖(LPS)で処理した。抗-IL-10を10ng/mlで加え、LPSを1時間後に5ng/mlで加えた。単球をプラスチックに付着することによりbuffy コートから単離した。インキュベーション時間は24時間であった。サブトラクショナルハイブリダイゼーションプロトコルは、同じ提供者からのインターロイキン-10(IL-10)とリポ多糖(LPS)で処理した単球組織から単離したRNAから同様に作製したライブラリに由来する。サブトラクショナルハイブリダイゼーションの条件は Swaroopら(1991)NAR 19:1954 および Bonaldoらの(1996)Genome Research 6:791の方法に基づいたものである。
PITUNON01	pINCY	このノーマライズされた脳下垂体腫瘍ライブラリは、ある脳下垂体腫瘍ライブラリの692万の独立型クローンから作製した。開始RNAは慢性閉塞性肺疾患から死亡した55才の白人男子から採取された脳下垂体腫瘍組織から作製した。神経病理学では、脳室がやや肥大している以外に著しい異常は見られなかった。大脳新皮質を徹底的に検査したが、特に全頭葉での先端の樹状突起の染色でいくつかの銀陽性の神経を除いては、いずれの領域にも明らかな異常はなかった。この有意性については未確認であった。他の微視的な異常は、前方と後方の海馬状突起のCA3領域のいくつかの肥大した軸索に顕著な銀染色があったのみであった。小脳の微視的な断片は、ブルキニ細胞層に軽度の Bergmann グリオシスを示した。患者の病歴には精神分裂症が含まれる。このライブラリは、極めて長時間(48時間/一回)の再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、Soares 他、PNAS (1994) 91:9228 および Bonaldo 他、Genome Research (1996) 6:791を適応した条件を用いて2回にわたってノーマライズした。
UTRCDC001	PSPORT1	この大型分画のライブラリは、29歳の白人女性の産式子宮摘出術と膀胱癌回復時に切除した子宮頸部組織から分離したRNAを用いて作製された。病理検査は、扁平上皮異常形成に伴う軽度の慢性子宮頸管炎を示した。一致する腫瘍組織の病理学検査では、子宮腔内平滑筋腫が見られた。患者の病歴は、甲状腺機能低下症、骨盤底弛緩、対麻痺、自己カテーテル法を示した。以前に受けた手術には、正常分娩、複写切除術、真形成術がある。患者の使用薬剤には Synthroid がある。家族の病歴としては、父親に良性高血圧症、母親にタイプIIの糖尿病と高脂質血症があった。

【表 10】

表 7-1

プログラム	説明	引用文献	パラメータ関連
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、注釈に有用なアコーストデータインデックス	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バージョン-カルアラインメント検索ツール。BLASTには5つの機能がある: blastp, blastn, blastx, tblastn および blastx。	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 完全長配列: 確率値=1.0E-10以下
FASTA	一群の同じタイプの配列と問合せ配列との間の類似性について検索するPearson およびLipman アルゴリズム。FASTA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; Smith, T.F. 及び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 完全長配列: fastx スコア=100以上
BLIMPS	配列をBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOMおよびPFAM データベースの配列と対応させて遺伝子ファミリー、配列相同性および構造的フィンガープリント領域を検索するBLOCKS IMPROVED Searcher	Henikoff, S. 及びJ.G. Henikoff (1981) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572; Henikoff, J.G. 及びS. Henikoff (1986) Methods Enzymol. 266:88-105; Altrwood, T.K. 他. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値=1.0E-3以下
HIMMER	問合せ配列をPFAMのよう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 (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他. (1998) Our World View, in a Nutshell. Cambridge Univ. Press. 1-350ページ。	PFAM ヒット 確率値=1.0E-3 以下 シングルレベルサブドメイン: スコア=0以上

【表 1 1】

表 7-2

プログラム	説明	引用文献	パラメータ関連値
ProfileScan	Prositeで定義された配列パターンと一致するタンパク質配列の構造的モチーフおよび配列モチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	標準化された質のスコア≧特定のPrositeモチーフに対するGCC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エンサートレースを調べる塩基コールアルゴリズム。	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、配列相同性検索やDNA配列の構築に有用である。	Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致した長さ=56以上
Consed	Phrap 構築の表示、編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他 (1988) 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 (1987) 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。	Sonnhammer, E.L. 他 (1998) Proc.Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol.Biol., Glasgow 他, 編集, The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, 175-182ページ。	
Motifs	Prositeで定義されたものと一致するパターンのアミノ酸配列を検索するプログラム。	Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual,バージョン9, M51-59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
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/16597 A2

(51) International Patent Classification: C12N 15/00

(21) International Application Number: PCT/US01/26365

(22) International Filing Date: 22 August 2001 (22.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/227,429 23 August 2000 (23.08.2000) US
60/231,370 8 September 2000 (08.09.2000) US
60/233,212 15 September 2000 (15.09.2000) US
60/236,885 29 September 2000 (29.09.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): INCYTE
GENOMICS, INC. [US/US]; 3160 Porter Drive, Palo
Alto, CA 94304 (US).(72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): GRIFFIN, Jennifer,
A. [US/US]; 33691 Mello Way, Fremont, CA 94555 (US).
PATTERSON, Chandra [US/US]; 490 Sherwood Way,
#1, Menlo Park, CA 94025 (US). GANDHI, Ameena,
R. [US/US]; 837 Roble Avenue, #1, Menlo Park, CA
94025 (US). LU, Yan [CN/US]; 3885 Corrina Way, Palo
Alto, CA 94303 (US). YAO, Monique, G. [US/US];
111 Frederick Court, Mountain View, CA 94043 (US).
BAUGHN, Mariah, R. [US/US]; 14244 Santiago Road,
San Leandro, CA 94577 (US). WALLA, Narinder, K.
[US/US]; 890 Davis Street, #205, San Leandro, CA 94577
(US). HAFALIA, April, J., A. [US/US]; 2227 Calle
de Primavera, Santa Clara, CA 95054 (US). DING, Li[CN/US]; 3353 Alma Street, #146, Palo Alto, CA 94306
(US). TRIBOULEY, Catherine, M. [FR/US]; 1121 Ten-
nessee Street, #5, San Francisco, CA 94107 (US). DAS,
Debopriya [IN/US]; 1179 Bonita Avenue, #3, Mountain
View, CA 94040 (US). THORNTON, Michael [US/US];
9 Medway Road, Woodside, CA 94062 (US). LAL, Preeti
[IN/US]; P.O. Box 5142, Santa Clara, CA 95056 (US).(74) Agents: HAMLET-COX, Diana et al.; Incyte Genomics,
Inc., 3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, 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 reportFor 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 02/16597 A2

(54) Title: LIPID METABOLISM ENZYMES

(57) Abstract: The invention provides human lipid metabolism enzymes (LMM) and polynucleotides which identify and encode LMM. 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 LMM.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

LIPID METABOLISM ENZYMES**TECHNICAL FIELD**

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

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. Polar lipids, such as phospholipids, sphingolipids, glycolipids, and cholesterol, are key structural components of cell membranes. (Lipid metabolism is reviewed in Stryer, L. (1995) *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York NY; 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>".)

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. Long-chain fatty acids are also substrates for eicosanoid production, and are important in the 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 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 b_5 reductase, cytochrome b_5 , and a desaturase.

Triacylglycerols, also known as triglycerides and neutral fats, are major energy stores in

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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. Fatty acid-CoA's are produced from fatty acids by fatty acyl-CoA synthetases. Glycerol-3-phosphate is acylated with two fatty acyl-CoA's 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 membrane.

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 CDP-diacylglycerol by the enzyme phosphatidate cytidylyltransferase (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).

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

cholesterol derived from both de novo biosynthesis and the diet.

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, 5 cerebrosides, and gangliosides. Sphingomyelins, which contain phosphocholine or phosphoethanolamine as their head group, are abundant in the myelin sheath surrounding nerve cells. Galactocerebrosides, which contain a glucose or galactose head group, are characteristic of the brain. Other cerebrosides 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.

10 Eicosanoids, including prostaglandins, prostacyclin, thromboxanes, and leukotrienes, are 20-carbon molecules derived from fatty acids. Eicosanoids are signaling molecules which have roles in pain, fever, and inflammation. The precursor 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.

15 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). 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 20 may function as an intracellular carrier of acyl-CoA esters (OMIM *125950 Diazepam Binding Inhibitor; DBI; PROSITE PDOC00686 Acyl-CoA-binding protein signature).

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 and cholesterol esters in the blood are transported in lipoprotein particles. The particles consist of a core of 25 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). There is a strong inverse correlation between the levels of plasma HDL and risk of premature 30 coronary heart disease.

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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

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.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

(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, 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 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).

15 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 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 involved in pain, fever, and inflammation (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).

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 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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, 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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 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 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 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, 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 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).

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, lipophosphodiesterase II, and choline phosphatase catalyzes the hydrolysis of phosphatidylcholine and

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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 Liscovitch, M. (2000) *Biochem. J.* 345:401-415).

- 5 PLD is activated in mammalian cells in response to diverse stimuli that include hormones, neurotransmitters, growth factors, cytokines, activators of protein kinase C, and agonists 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
10 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.

- 15 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
20 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,
25 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).

- 30 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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, 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).

10 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). 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 15 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 20 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 25 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).

Disease Correlation

Lipid metabolism is involved in human diseases and disorders. In the arterial disease 30 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*). In Tay-Sachs disease, the GM₂ ganglioside (a sphingolipid) accumulates in lysosomes of the central nervous system due to a lack of the enzyme N-acetylhexosaminidase. Patients suffer nervous system degeneration leading to early

WO 02/16597

PCT/US01/26365

- death (Fauci, A.S. et al. (1998) Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, New York NY, p. 2171). The Niemann-Pick diseases are caused by defects in lipid metabolism. 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
- 5 neurodegeneration and lung disease. Niemann-Pick disease type C results from a defect in cholesterol transport, leading to the accumulation of sphingomyelin and 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
- 10 Niemann-Pick disease type C (Fauci, supra, p. 2175; Loftus, S.K. et al. (1997) Science 277:232-235).
- 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 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
- 15 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 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.
- 20 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 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).
- 25 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.
- The discovery of new lipid metabolism enzymes, and the polynucleotides encoding them, satisfies a need in the art by providing new compositions which are useful in the diagnosis, prevention,
- 30 and treatment of cancer, neurological disorders, autoimmune/inflammatory disorders, gastrointestinal disorders, and cardiovascular disorders, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of lipid metabolism enzymes.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention features purified polypeptides, lipid metabolism enzymes, referred to collectively as "LMM" and individually as "LMM-1," "LMM-2," "LMM-3," "LMM-4," "LMM-5," and "LMM-6." In one aspect, the invention provides an isolated polypeptide selected from the group consisting of

5 a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence

10 selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. In one alternative, the invention provides an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1-6.

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:1-6, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence

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

20 another alternative, the polynucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12.

Additionally, the invention provides a recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a polynucleotide encoding a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least

25 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. In one alternative, the invention provides a cell transformed with the recombinant polynucleotide. In another alternative, the invention

30 provides a transgenic organism comprising the recombinant polynucleotide.

The invention also provides a method for producing a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least

WO 02/16597

PCT/US01/26365

90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. The method comprises a) culturing
5 a cell under conditions suitable for expression of the polypeptide, wherein said cell is transformed with a recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a polynucleotide encoding the polypeptide, and b) recovering the polypeptide so expressed.

Additionally, the invention provides an isolated antibody which specifically binds to a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence
10 selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic
15 fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6.

The invention further provides an isolated polynucleotide selected from the group consisting of a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12, b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least
20 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12, c) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). In one alternative, the polynucleotide comprises at least 60 contiguous nucleotides.

Additionally, the invention provides a method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide selected from the group consisting of
25 a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12, 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:7-12, 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
30 sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides comprising a sequence complementary to said target polynucleotide in the sample, and which probe specifically hybridizes to said target polynucleotide, under conditions whereby a hybridization complex is formed between said probe and said target polynucleotide or fragments thereof, and b) detecting the presence or absence of

WO 02/16597

PCT/US01/26365

said hybridization complex, and optionally, if present, the amount thereof. In one alternative, the probe comprises at least 60 contiguous nucleotides.

The invention further provides a method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide selected from the group consisting of a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12, 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:7-12, 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:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and a pharmaceutically acceptable excipient. In one embodiment, the composition comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. The invention additionally provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional LMM, 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:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

pharmaceutically acceptable excipient. In another alternative, the invention provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional LMM, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

Additionally, the invention provides a method for screening a compound for effectiveness as an antagonist of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. 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 LMM, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

The invention further provides a method of screening for a compound that specifically binds to a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. 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:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group

WO 02/16597

PCT/US01/26365

consisting of SEQ ID NO:1-6. The method comprises a) combining the polypeptide with at least one test compound under conditions permissive for the activity of the polypeptide, b) assessing the activity of the polypeptide in the presence of the test compound, and c) comparing the activity of the polypeptide in the presence of the test compound with the activity of the polypeptide in the absence of the test compound, wherein a change in the activity of the polypeptide in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of the polypeptide.

The invention further provides a method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a target polynucleotide, wherein said target polynucleotide comprises a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12, the method comprising a) exposing a sample comprising the target polynucleotide to a compound, and b) detecting altered expression of the target polynucleotide.

The invention further provides a method for assessing toxicity of a test compound, said method comprising a) treating a biological sample containing nucleic acids with the test compound; b) hybridizing the nucleic acids of the treated biological sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides of a polynucleotide selected from the group consisting of i) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12, 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:7-12, iii) a polynucleotide having a sequence complementary to i), iv) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of ii), and v) an RNA equivalent of i)-iv). Hybridization occurs under conditions whereby a specific hybridization complex is formed between said probe and a target polynucleotide in the biological sample, said target polynucleotide selected from the group consisting of i) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12, 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:7-12, iii) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of i), iv) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of ii), and v) an RNA equivalent of i)-iv). Alternatively, the target polynucleotide comprises a fragment of a polynucleotide sequence selected from the group consisting of i)-v) above; c) quantifying the amount of hybridization complex; and d) comparing the amount of hybridization complex in the treated biological sample with the amount of hybridization complex in an untreated biological sample, wherein a difference in the amount of hybridization complex in the treated biological sample is indicative of toxicity of the test compound.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

BRIEF DESCRIPTION OF THE TABLES

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

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

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

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

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

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

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

DESCRIPTION OF THE INVENTION

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

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

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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**

"LMM" refers to the amino acid sequences of substantially purified LMM 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
10 LMM. Agonists may include proteins, nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of LMM either by directly interacting with LMM or by acting on components of the biological pathway in which LMM participates.

An "allelic variant" is an alternative form of the gene encoding LMM. Allelic variants may result from at least one mutation in the nucleic acid sequence and may result in altered mRNAs or in
15 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 LMM include those sequences with deletions, insertions, or substitutions of different nucleotides, resulting in a polypeptide the same as LMM or a polypeptide with at least one functional characteristic of LMM. Included within this definition are polymorphisms which may or may not be readily detectable using a particular oligonucleotide probe of the polynucleotide encoding LMM, and improper or unexpected hybridization to allelic variants, with a
25 locus other than the normal chromosomal locus for the polynucleotide sequence encoding LMM. 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 LMM. 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 LMM 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 02/16597

PCT/US01/26365

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

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

"Amplification" relates to the production of additional copies of a nucleic acid sequence.

Amplification is generally carried out using polymerase chain reaction (PCR) technologies well known in the art.

The term "antagonist" refers to a molecule which inhibits or attenuates the biological activity of LMM. Antagonists may include proteins such as antibodies, nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of LMM either by directly interacting with LMM or by acting on components of the biological pathway in which LMM 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 LMM polypeptides can be prepared using intact polypeptides or using fragments containing small peptides of interest as the immunizing antigen. The polypeptide or oligopeptide used to immunize an animal (e.g., a mouse, a rat, or a rabbit) can be derived from the translation of RNA, or synthesized chemically, and can be conjugated to a carrier protein if desired. Commonly used carriers that are chemically coupled to peptides include bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin (KLH). The coupled peptide is then used to immunize the animal.

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

The term "antisense" refers to any composition capable of base-pairing with the "sense" (coding) strand of a specific nucleic acid sequence. Antisense compositions may include DNA; RNA; peptide nucleic acid (PNA); oligonucleotides having modified backbone linkages such as phosphorothioates, methylphosphonates, or benzylphosphonates; oligonucleotides having modified

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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
5 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"
10 refers to the capability of the natural, recombinant, or synthetic LMM, or of any oligopeptide thereof, to induce a specific immune response in appropriate animals or cells and to bind with specific antibodies.

"Complementary" describes the relationship between two single-stranded nucleic acid sequences that anneal by base-pairing. For example, 5'-AGT-3' pairs with its complement,
15 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 LMM or fragments of LMM may be
20 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
25 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
30 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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
5	Arg	His, Lys
	Asn	Asp, Gln, His
	Asp	Asn, Glu
	Cys	Ala, Ser
	Gln	Asn, Glu, His
10	Glu	Asp, Gln, His
	Gly	Ala
	His	Asn, Arg, Gln, Glu
	Ile	Leu, Val
	Leu	Ile, Val
15	Lys	Arg, Gln, Glu
	Met	Leu, Ile
	Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
	Ser	Cys, Thr
	Thr	Ser, Val
20	Trp	Phe, Tyr
	Tyr	His, Phe, Trp
	Val	Ile, Leu, Thr

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

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

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

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

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

diseased and a normal sample.

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

A fragment of SEQ ID NO:7-12 comprises a region of unique polynucleotide sequence that specifically identifies SEQ ID NO:7-12, for example, as distinct from any other sequence in the genome from which the fragment was obtained. A fragment of SEQ ID NO:7-12 is useful, for example, in hybridization and amplification technologies and in analogous methods that distinguish SEQ ID NO:7-12 from related polynucleotide sequences. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:7-12 and the region of SEQ ID NO:7-12 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:1-6 is encoded by a fragment of SEQ ID NO:7-12. A fragment of SEQ ID NO:1-6 comprises a region of unique amino acid sequence that specifically identifies SEQ ID NO:1-6. For example, a fragment of SEQ ID NO:1-6 is useful as an immunogenic peptide for the development of antibodies that specifically recognize SEQ ID NO:1-6. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:1-6 and the region of SEQ ID NO:1-6 to which the fragment corresponds are routinely determinable by one of ordinary skill in the art based on the intended purpose for the fragment.

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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

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

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

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

Alternatively, a suite of commonly used and freely available sequence comparison algorithms is provided by the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410), which is available from several sources, including the NCBI, Bethesda, MD, and on the Internet at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. The BLAST software suite includes various sequence analysis programs including "blastn," that is used to align a known polynucleotide sequence with other polynucleotide sequences from a variety of databases. Also available is a tool called "BLAST 2 Sequences" that is used for direct pairwise comparison of two nucleotide sequences. "BLAST 2 Sequences" can be accessed and used interactively at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b2.html>. The "BLAST 2 Sequences" tool can be used for both blastn and blastp (discussed below). BLAST programs are commonly used with gap and other parameters set to default settings. For example, to compare two nucleotide sequences, one may use blastn with the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.12 (April-21-2000) set at default parameters. Such default parameters may be, for example:

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

5 *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
10 nucleotides. Such lengths are exemplary only, and it is understood that any fragment length supported by the sequences shown herein, in the tables, figures, or Sequence Listing, may be used to describe a length over which percentage identity may be measured.

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

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

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

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 and Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

5 *Word Size: 3*

Filter: on

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

15 "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.

20 "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.

30 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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.

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

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

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

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

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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

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

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

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

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

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

"Post-translational modification" of an LMM 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
25 by cell type depending on the enzymatic milieu of LMM.

"Probe" refers to nucleic acid sequences encoding LMM, 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"
30 are short nucleic acids, usually DNA oligonucleotides, which may be annealed to a target polynucleotide by complementary base-pairing. The primer may then be extended along the target DNA strand by a DNA polymerase enzyme. Primer pairs can be used for amplification (and identification) of a nucleic acid sequence, e.g., by the polymerase chain reaction (PCR).

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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

Methods for preparing and using probes and primers are described in the references, for example Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY; Ausubel, F.M. et al. (1987) Current Protocols in Molecular
10 Biology, Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY; Innis, M. et al. (1990) PCR
Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego CA. PCR primer pairs can be derived from a known sequence, for example, by using computer programs intended for that purpose such as Primer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge
MA).

Oligonucleotides for use as primers are selected using software known in the art for such
15 purpose. For example, OLIGO 4.06 software is useful for the selection of PCR primer pairs of up to 100 nucleotides each, and for the analysis of oligonucleotides and larger polynucleotides of up to 5,000 nucleotides from an input polynucleotide sequence of up to 32 kilobases. Similar primer selection programs have incorporated additional features for expanded capabilities. For example, the PrimOU
20 primer selection program (available to the public from the Genome Center at University of Texas South West Medical Center, Dallas TX) is capable of choosing specific primers from megabase sequences and is thus useful for designing primers on a genome-wide scope. The Primer3 primer selection program (available to the public from the Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MA) allows the user to input a "mispriming library," in which sequences to
25 avoid as primer binding sites are user-specified. Primer3 is useful, in particular, for the selection of oligonucleotides for microarrays. (The source code for the latter two primer selection programs may also be obtained from their respective sources and modified to meet the user's specific needs.) The PrimeGen program (available to the public from the UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UK) designs primers based on multiple sequence alignments, thereby allowing
30 selection of primers that hybridize to either the most conserved or least conserved regions of aligned nucleic acid sequences. Hence, this program is useful for identification of both unique and conserved oligonucleotides and polynucleotide fragments. The oligonucleotides and polynucleotide fragments identified by any of the above selection methods are useful in hybridization technologies, for example,

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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.

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

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

15 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,
20 amino acid, or antibody. Reporter molecules include radionuclides; enzymes; fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents; substrates; cofactors; inhibitors; magnetic particles; and other moieties known in the art.

An "RNA equivalent," in reference to a DNA sequence, is composed of the same linear
25 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 LMM,
nucleic acids encoding LMM, or fragments thereof may comprise a bodily fluid; an extract from a cell,
30 chromosome, organelle, or membrane isolated from a cell; a cell; genomic DNA, RNA, or cDNA, in solution or bound to a substrate; a tissue; a tissue print; etc.

The terms "specific binding" and "specifically binding" refer to that interaction between a protein or peptide and an agonist, an antibody, an antagonist, a small molecule, or any natural or synthetic binding composition. The interaction is dependent upon the presence of a particular structure

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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.

5 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
10 by different amino acid residues or nucleotides, respectively.

"Substrate" refers to any suitable rigid or semi-rigid support including membranes, filters, chips, slides, wafers, fibers, magnetic or nonmagnetic beads, gels, tubing, plates, polymers, microparticles and capillaries. The substrate can have a variety of surface forms, such as wells, trenches, pins, channels and pores, to which polynucleotides or polypeptides are bound.

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

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

A "transgenic organism," as used herein, is any organism, including but not limited to animals and plants, in which one or more of the cells of the organism contains heterologous nucleic acid introduced by way of human intervention, such as by transgenic techniques well known in the art. The nucleic acid is introduced into the cell, directly or indirectly by introduction into a precursor of the cell,
30 by way of deliberate genetic manipulation, such as by microinjection or by infection with a recombinant virus. The term genetic manipulation does not include classical cross-breeding, or in vitro fertilization, but rather is directed to the introduction of a recombinant DNA molecule. The transgenic organisms contemplated in accordance with the present invention include bacteria, cyanobacteria,

WO 02/16597

PCT/US01/26365

fungi, plants and animals. The isolated DNA of the present invention can be introduced into the host by methods known in the art, for example infection, transfection, transformation or transconjugation. Techniques for transferring the DNA of the present invention into such organisms are widely known and provided in references such as Sambrook et al. (1989), *supra*.

5 A "variant" of a particular nucleic acid sequence is defined as a nucleic acid sequence having at least 40% sequence identity to the particular nucleic acid sequence over a certain length of one of the nucleic acid sequences using blastn with the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.9 (May-07-1999) set at default parameters. Such a pair of nucleic acids may show, for example, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 91%, at least 92%, at least 10 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% or greater sequence identity over a certain defined length. A variant may be described as, for example, an "allelic" (as defined above), "splice," "species," or "polymorphic" variant. A splice variant may have significant identity to a reference molecule, but will generally have a greater or lesser number of polynucleotides due to alternate splicing of exons during mRNA processing. The corresponding 15 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 20 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 25 identity over a certain defined length of one of the polypeptides.

30

THE INVENTION

The invention is based on the discovery of new human lipid metabolism enzymes (LMM), the polynucleotides encoding LMM, and the use of these compositions for the diagnosis, treatment, or

WO 02/16597

PCT/US01/26365

prevention of cancer, neurological disorders, autoimmune/inflammatory disorders, gastrointestinal disorders, and cardiovascular disorders.

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

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

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

Together, Tables 2 and 3 summarize the properties of polypeptides of the invention, and these properties establish that the claimed polypeptides are lipid metabolism enzymes. For example, SEQ ID NO:1 is 53% identical to human lysosomal acid lipase (GenBank ID g505053) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The BLAST probability score is 5.2e-116, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. SEQ ID NO:1 also contains an alpha/beta hydrolase fold as determined by searching for statistically significant matches in the hidden Markov model (HMM)-based PFAM database of

WO 02/16597

PCT/US01/26365

conserved protein domains. (See Table 3.) Data from MOTIFS and PROFILESCAN analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:1 is a lipase. In an alternative example, SEQ ID NO:4 is 63% identical to human pregastric lipase (GenBank ID g579561) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The BLAST probability score is 1.4e-142, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. SEQ ID NO:4 also contains an alpha/beta hydrolase fold 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 MOTIFS and PROFILESCAN analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:4 is a lipase. In an alternative example, SEQ ID NO:5 is 35% identical to human arylacetamide deacetylase (GenBank ID g537514) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The BLAST probability score is 1.6e-47, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. In a further example, SEQ ID NO:6 is 51% identical to murine phospholipase C-L2 (GenBank ID g6705987) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The BLAST probability score is 2.1e-151, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. SEQ ID NO:6 also contains phosphatidylinositol-specific phospholipase X and Y domains, a C2 domain, and a pleckstrin homology 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 and PROFILESCAN analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:6 is a phospholipase. SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3 were analyzed and annotated in a similar manner. The algorithms and parameters for the analysis of SEQ ID NO:1-6 are described in Table 7.

As shown in Table 4, the full length polynucleotide sequences of the present invention were assembled using cDNA sequences or coding (exon) sequences derived from genomic DNA, or any combination of these two types of sequences. Columns 1 and 2 list the polynucleotide sequence identification number (Polynucleotide SEQ ID NO:) and the corresponding Incyte polynucleotide consensus sequence number (Incyte Polynucleotide ID) for each polynucleotide of the invention. Column 3 shows the length of each polynucleotide sequence in basepairs. Column 4 lists fragments of the polynucleotide sequences which are useful, for example, in hybridization or amplification technologies that identify SEQ ID NO:7-12 or that distinguish between SEQ ID NO:7-12 and related polynucleotide sequences. Column 5 shows identification numbers corresponding to cDNA sequences, coding sequences (exons) predicted from genomic DNA, and/or sequence assemblages comprised of both cDNA and genomic DNA. These sequences were used to assemble the full length

WO 02/16597

PCT/US01/26365

polynucleotide sequences of the invention. Columns 6 and 7 of Table 4 show the nucleotide start (5') and stop (3') positions of the cDNA and/or genomic sequences in column 5 relative to their respective full length sequences.

The identification numbers in Column 5 of Table 4 may refer specifically, for example, to Incyte cDNAs along with their corresponding cDNA libraries. For example, 6875328H1 is the identification number of an Incyte cDNA sequence, and EPIMUNN04 is the cDNA library from which it is derived. Incyte cDNAs for which cDNA libraries are not indicated were derived from pooled cDNA libraries (e.g., 71075936V1). Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to GenBank cDNAs or ESTs (e.g., g5369512) which contributed to the assembly of the full length polynucleotide sequences. In addition, the identification numbers in column 5 may identify sequences derived from the ENSEMBL (The Sanger Centre, Cambridge, UK) database (*i.e.*, those sequences including the designation "ENST"). Alternatively, the identification numbers in column 5 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 identification numbers in column 5 may refer to assemblages of both cDNA and Genscan-predicted exons brought together by an "exon stitching" algorithm. For example, FL_XXXXXX_N₁_N₂_YYYY_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 YYYY 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 identification numbers in column 5 may refer to assemblages of exons brought together by an "exon-stretching" algorithm. For example, FLXXXXXX_gAAAAA_gBBBBB_1_N is the identification number of 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).

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

methods associated with the prefixes (see Example IV and Example V).

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.
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 column 5 was obtained to confirm the final consensus polynucleotide sequence, but the relevant Incyte cDNA identification numbers are not shown.

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

The invention also encompasses LMM variants. A preferred LMM 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 LMM amino acid sequence, and which contains at least one functional or structural characteristic of LMM.

The invention also encompasses polynucleotides which encode LMM. In a particular embodiment, the invention encompasses a polynucleotide sequence comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12, which encodes LMM. The polynucleotide sequences of SEQ ID NO:7-12, as presented in the Sequence Listing, embrace the equivalent RNA sequences, wherein occurrences of the nitrogenous base thymine are replaced with uracil, and the sugar backbone is composed of ribose instead of deoxyribose.

The invention also encompasses a variant of a polynucleotide sequence encoding LMM. In particular, such a variant polynucleotide sequence will have at least about 70%, or alternatively at least about 85%, or even at least about 95% polynucleotide sequence identity to the polynucleotide sequence encoding LMM. A particular aspect of the invention encompasses a variant of a

WO 02/16597

PCT/US01/26365

polynucleotide sequence comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12 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:7-12. Any one of the polynucleotide variants described above can encode an amino acid
5 sequence which contains at least one functional or structural characteristic of LMM.

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 LMM, some bearing minimal similarity to the polynucleotide sequences of any known and naturally occurring gene, may be produced. Thus, the invention contemplates each and every possible variation of polynucleotide sequence that could be
10 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 LMM, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

Although nucleotide sequences which encode LMM and its variants are generally capable of hybridizing to the nucleotide sequence of the naturally occurring LMM under appropriately selected
15 conditions of stringency, it may be advantageous to produce nucleotide sequences encoding LMM or its derivatives possessing a substantially different codon usage, e.g., inclusion of non-naturally occurring codons. Codons may be selected to increase the rate at which expression of the peptide occurs in a particular prokaryotic or eukaryotic host in accordance with the frequency with which particular codons are utilized by the host. Other reasons for substantially altering the nucleotide
20 sequence encoding LMM 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 LMM and LMM derivatives, or fragments thereof, entirely by synthetic chemistry. After production, the
25 synthetic sequence may be inserted into any of the many available expression vectors and cell systems using reagents well known in the art. Moreover, synthetic chemistry may be used to introduce mutations into a sequence encoding LMM 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
30 NO:7-12 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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
5 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
10 (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 LMM may be extended utilizing a partial nucleotide
15 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
20 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
25 ligations may be used to insert an engineered double-stranded sequence into a region of unknown sequence before performing PCR. Other methods which may be used to retrieve unknown sequences are known in the art. (See, e.g., Parker, J.D. et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:3055-3060). Additionally, one may use PCR, nested primers, and PROMOTERFINDER libraries (Clontech, Palo Alto CA) to walk genomic DNA. This procedure avoids the need to screen libraries and is useful in
30 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

68°C to 72°C.

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

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

In another embodiment of the invention, polynucleotide sequences or fragments thereof which encode LMM may be cloned in recombinant DNA molecules that direct expression of LMM, 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 LMM.

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

The nucleotides of the present invention may be subjected to DNA shuffling techniques such as MOLECULAR BREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; described in U.S. Patent Number 5,837,458; Chang, C.-C. et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; and Cramer, A. et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319) to alter or improve the biological properties of LMM, 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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.

10 In another embodiment, sequences encoding LMM 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, LMM 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.,
15 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 LMM, 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
20 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.)

25 In order to express a biologically active LMM, the nucleotide sequences encoding LMM or derivatives thereof may be inserted into an appropriate expression vector, i.e., a vector which contains the necessary elements for transcriptional and translational control of the inserted coding sequence in a suitable host. These elements include regulatory sequences, such as enhancers, constitutive and inducible promoters, and 5' and 3' untranslated regions in the vector and in polynucleotide sequences
30 encoding LMM. Such elements may vary in their strength and specificity. Specific initiation signals may also be used to achieve more efficient translation of sequences encoding LMM. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences, e.g. the Kozak sequence. In cases where sequences encoding LMM and its initiation codon and upstream regulatory sequences are inserted into

WO 02/16597

PCT/US01/26365

the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding sequence, or a fragment thereof, is inserted, exogenous translational control signals including an in-frame ATG initiation codon should be provided by the vector. Exogenous translational elements and initiation codons may be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of enhancers appropriate for the particular host cell system used. (See, e.g., Scharf, D. et al. (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162.)

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

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

In bacterial systems, a number of cloning and expression vectors may be selected depending upon the use intended for polynucleotide sequences encoding LMM. For example, routine cloning,

WO 02/16597

PCT/US01/26365

subcloning, and propagation of polynucleotide sequences encoding LMM 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 LMM 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 LMM are needed, e.g. for the production of antibodies, vectors which direct high level expression of LMM 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 LMM. 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) *Bio/Technology* 12:181-184.)

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

In mammalian cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding LMM 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 LMM 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-

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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

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

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

sequences encoding LMM can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding LMM 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.

- 5 In general, host cells that contain the nucleic acid sequence encoding LMM and that express LMM 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.
- 10 Immunological methods for detecting and measuring the expression of LMM using either specific polyclonal or monoclonal antibodies are known in the art. Examples of such techniques include enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), radioimmunoassays (RIAs), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on LMM is preferred, but a competitive
- 15 binding assay may be employed. These and other assays are well known in the art. (See, e.g., Hampton, R. et al. (1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St. Paul MN, Sect. IV; Coligan, J.E. et al. (1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY; and Pound, J.D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ.)
- 20 A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and may be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding LMM include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequences encoding LMM, or any fragments thereof, may be cloned into a vector
- 25 for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3, or SP6 and labeled nucleotides. These procedures may be conducted using a variety of commercially available kits, such as those provided by Amersham Pharmacia Biotech, Promega (Madison WI), and US Biochemical. Suitable reporter molecules or labels which may be used for
- 30 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 LMM may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The protein

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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 LMM may be designed to contain signal sequences which direct secretion of LMM through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

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

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

In a further embodiment of the invention, synthesis of radiolabeled LMM 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

T7, T3, or SP6 promoters. Translation takes place in the presence of a radiolabeled amino acid precursor, for example, ³⁵S-methionine.

LMM of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds that specifically bind to LMM. At least one and up to a plurality of test compounds may be screened
5 for specific binding to LMM. 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 LMM, 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):
10 Chapter 5.) Similarly, the compound can be closely related to the natural receptor to which LMM 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 LMM, either as a secreted protein or on the cell membrane. Preferred cells include cells from mammals, yeast, Drosophila, or E. coli.
15 Cells expressing LMM or cell membrane fractions which contain LMM are then contacted with a test compound and binding, stimulation, or inhibition of activity of either LMM 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
20 assay may comprise the steps of combining at least one test compound with LMM, either in solution or affixed to a solid support, and detecting the binding of LMM 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.

LMM of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds that modulate the activity of LMM. Such compounds may include agonists, antagonists, or partial or inverse agonists. In one embodiment, an assay is performed under conditions permissive for LMM activity, wherein LMM is combined with at least one test compound, and the activity of LMM in the presence of a test compound is compared with the activity of LMM in the absence of the test
30 compound. A change in the activity of LMM in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of LMM. Alternatively, a test compound is combined with an in vitro or cell-free system comprising LMM under conditions suitable for LMM activity, and the assay is performed. In either of these assays, a test compound which modulates the activity of LMM may do

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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

Polynucleotides encoding LMM 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 LMM can also be used to create "knockin" humanized animals (pigs) or transgenic animals (mice or rats) to model human disease. With knockin technology, a region of a polynucleotide encoding LMM 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 LMM, e.g., by secreting LMM 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

regions of LMM and lipid metabolism enzymes. In addition, the expression of LMM is closely associated with leukocytes, pituitary glands, and reproductive and bronchial tissue. In the treatment of disorders associated with increased LMM expression or activity, it is desirable to decrease the expression or activity of LMM. In the treatment of disorders associated with decreased LMM
5 expression or activity, it is desirable to increase the expression or activity of LMM.

Therefore, in one embodiment, LMM 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 LMM. 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
10 the adrenal gland, bladder, bone, bone marrow, brain, breast, cervix, gall bladder, ganglia, gastrointestinal tract, heart, kidney, liver, lung, muscle, ovary, pancreas, parathyroid, penis, prostate, salivary glands, skin, spleen, testis, thymus, thyroid, and uterus; a neurological disorder such as epilepsy, ischemic cerebrovascular disease, stroke, cerebral neoplasms, Alzheimer's disease, Pick's disease, Huntington's disease, dementia, Parkinson's disease and other extrapyramidal disorders,
15 amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders, progressive neural muscular atrophy, retinitis pigmentosa, hereditary ataxias, multiple sclerosis and other demyelinating diseases, bacterial and viral meningitis, brain abscess, subdural empyema, epidural abscess, suppurative intracranial thrombophlebitis, myelitis and radiculitis, viral central nervous system disease, prion diseases including kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial
20 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 palsy, neuroskeletal disorders, autonomic nervous system disorders, cranial nerve disorders, spinal cord diseases, muscular dystrophy and other neuromuscular disorders, peripheral nervous system disorders,
25 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 dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, Tourette's disorder, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and familial frontotemporal dementia; an
30 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 polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), bronchitis, cholecystitis, contact

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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, hypereosinophilia, irritable bowel syndrome, multiple sclerosis, myasthenia gravis, myocardial or

5 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, fungal, parasitic, protozoal, and helminthic infections, and trauma; a gastrointestinal disorder such as

10 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 intestinal tract, peptic ulcer, cholelithiasis, cholecystitis, cholestasis, pancreatitis, pancreatic carcinoma, biliary tract disease, hepatitis, hyperbilirubinemia, cirrhosis, passive congestion of the liver, hepatoma,

15 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 (AIDS) enteropathy, jaundice, hepatic encephalopathy, hepatorenal syndrome, hepatic steatosis, hemochromatosis, Wilson's disease, alpha₁-antitrypsin deficiency, Reye's syndrome, primary

20 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 hyperplasias, adenomas, and carcinomas; a skin disorder, such as dermatitis, eczema, ichthyosis, keratosis, psoriasis, scleroderma, and skin atrophy; a disorder of lipid metabolism such as fatty liver,

25 cholestasis, primary biliary cirrhosis, carnitine deficiency, carnitine palmitoyltransferase deficiency, myoadenylate deaminase deficiency, hypertriglyceridemia, lipid storage disorders such Fabry's disease, Gaucher's disease, Niemann-Pick's disease, metachromatic leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, GM₂ gangliosidosis, and ceroid lipofuscinosis, abetalipoproteinemia, Tangier disease, hyperlipoproteinemia, diabetes mellitus, lipodystrophy, lipomatosis, acute panniculitis,

30 disseminated fat necrosis, adiposis dolorosa, lipid adrenal hyperplasia, minimal change disease, lipomas, atherosclerosis, hypercholesterolemia, hypercholesterolemia with hypertriglyceridemia, primary hypoalphalipoproteinemia, hypothyroidism, renal disease, liver disease, lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency, cerebrotendinous xanthomatosis, sitosterolemia, hypocholesterolemia, Tay-

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Sachs disease, Sandhoff's disease, hyperlipidemia, hyperlipemia, lipid myopathies, and obesity; and 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 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 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.

In another embodiment, a vector capable of expressing LMM 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 LMM including, but not limited to, those described above.

In a further embodiment, a composition comprising a substantially purified LMM 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 LMM including, but not limited to, those provided above.

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

In a further embodiment, an antagonist of LMM may be administered to a subject to treat or

WO 02/16597

PCT/US01/26365

prevent a disorder associated with increased expression or activity of LMM. Examples of such disorders include, but are not limited to, those cancer, neurological disorders, autoimmune/inflammatory disorders, gastrointestinal disorders, and cardiovascular disorders described above. In one aspect, an antibody which specifically binds LMM 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 LMM.

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

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

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

For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice, humans, and others may be immunized by injection with LMM 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 LMM 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

identical to a portion of the amino acid sequence of the natural protein. Short stretches of LMM amino acids may be fused with those of another protein, such as KLH, and antibodies to the chimeric molecule may be produced.

5 Monoclonal antibodies to LMM 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.)

10 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 LMM-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.)

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

20 Antibody fragments which contain specific binding sites for LMM 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.)

25 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 LMM and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two

WO 02/16597

PCT/US01/26365

non-interfering LMM 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 LMM. Affinity is expressed as an association constant, K_a , which is defined as the molar concentration of LMM-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 LMM epitopes, represents the average affinity, or avidity, of the antibodies for LMM. The K_a determined for a preparation of monoclonal antibodies, which are monospecific for a particular LMM 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 LMM-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 LMM, 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 LMM-antibody complexes. Procedures for evaluating antibody specificity, titer, and avidity, and guidelines for antibody quality and usage in various applications, are generally available. (See, e.g., Catty, *supra*, and Coligan et al. *supra*.)

In another embodiment of the invention, the polynucleotides encoding LMM, or any fragment or complement thereof, may be used for therapeutic purposes. In one aspect, modifications of gene expression can be achieved by designing complementary sequences or antisense molecules (DNA, RNA, PNA, or modified oligonucleotides) to the coding or regulatory regions of the gene encoding LMM. Such technology is well known in the art, and antisense oligonucleotides or larger fragments can be designed from various locations along the coding or control regions of sequences encoding LMM. (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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

- 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* 5 76:271; Ausubel, supra; Uckert, W. and W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347.) Other gene delivery mechanisms include liposome-derived systems, artificial viral envelopes, and other systems known in the art. (See, e.g., Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225; Boado, R.J. et al. (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315; and Morris, M.C. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14):2730-2736.)
- 10 In another embodiment of the invention, polynucleotides encoding LMM may be used for somatic or germline gene therapy. Gene therapy may be performed to (i) correct a genetic deficiency (e.g., in the cases of severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease characterized by X-linked inheritance (Cavazzana-Calvo, M. et al. (2000) *Science* 288:669-672), severe combined immunodeficiency syndrome associated with an inherited adenosine deaminase (ADA) deficiency 15 (Blasse, R.M. et al. (1995) *Science* 270:475-480; Bordignon, C. et al. (1995) *Science* 270:470-475), cystic fibrosis (Zabner, J. et al. (1993) *Cell* 75:207-216; Crystal, R.G. et al. (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:643-666; Crystal, R.G. et al. (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:667-703), thalassamias, familial hypercholesterolemia, and hemophilia resulting from Factor VIII or Factor IX deficiencies (Crystal, R.G. (1995) *Science* 270:404-410; Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 389:239-242)), (ii) 20 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 LMM expression or regulation causes disease, the expression of LMM from an appropriate population of transduced cells may alleviate the clinical manifestations caused by the genetic deficiency.
- In a further embodiment of the invention, diseases or disorders caused by deficiencies in 30 LMM are treated by constructing mammalian expression vectors encoding LMM and introducing these vectors by mechanical means into LMM-deficient cells. Mechanical transfer technologies for use with cells in vivo or ex vitro include (i) direct DNA microinjection into individual cells, (ii) ballistic gold particle delivery, (iii) liposome-mediated transfection, (iv) receptor-mediated gene transfer, and

WO 02/16597

PCT/US01/26365

(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 LMM include, but are not limited to, the pCDNA 3.1, EPITAG, PRCCMV2, PREP, PVAX, PCR2-TOPOTA vectors (Invitrogen, Carlsbad CA), PCMV-SCRIPT, PCMV-TAG, PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA), and PTET-OFF, PTET-ON, PTRE2, PTRE2-LUC, PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA). LMM may be expressed using (i) a constitutively active promoter, (e.g., from cytomegalovirus (CMV), Rous sarcoma virus (RSV), SV40 virus, thymidine kinase (TK), or β -actin genes), (ii) an inducible promoter (e.g., the tetracycline-regulated promoter (Gossen, M. and H. Bujard (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Gossen, M. et al. (1995) *Science* 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:451-456), commercially available in the T-REX plasmid (Invitrogen)); the ecdysone-inducible promoter (available in the plasmids PVGRXR and PIND; Invitrogen); the FK506/rapamycin inducible promoter; or the RU486/mifepristone inducible promoter (Rossi, F.M.V. and Blau, H.M. supra)), or (iii) a tissue-specific promoter or the native promoter of the endogenous gene encoding LMM from a normal individual.

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

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

(1987) *J. Virol.* 61:1647-1650; Bender, M.A. et al. (1987) *J. Virol.* 61:1639-1646; Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) *J. Virol.* 62:3802-3806; Dull, T. et al. (1998) *J. Virol.* 72:8463-8471; Zufferey, R. et al. (1998) *J. Virol.* 72:9873-9880). U.S. Patent Number 5,910,434 to Rigg ("Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant") discloses
5 a method for obtaining retrovirus packaging cell lines and is hereby incorporated by reference. Propagation of retrovirus vectors, transduction of a population of cells (e.g., CD4⁺ T-cells), and the return of transduced cells to a patient are procedures well known to persons skilled in the art of gene therapy and have been well documented (Ranga, U. et al. (1997) *J. Virol.* 71:7020-7029; Bauer, G. et al. (1997) *Blood* 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) *J. Virol.* 71:4707-4716; Ranga, U. et al. (1998)
10 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1201-1206; Su, L. (1997) *Blood* 89:2283-2290).

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

In another alternative, a herpes-based, gene therapy delivery system is used to deliver polynucleotides encoding LMM to target cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of LMM. The use of herpes simplex virus (HSV)-based vectors may be especially valuable for introducing LMM to cells of the central nervous system, for which HSV has a
25 tropism. The construction and packaging of herpes-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. A replication-competent herpes simplex virus (HSV) type 1-based vector has been used to deliver a reporter gene to the eyes of primates (Liu, X. et al. (1999) *Exp. Eye Res.* 169:385-395). The construction of a HSV-1 virus vector has also been disclosed in detail in U.S. Patent Number 5,804,413 to DeLuca ("Herpes simplex virus strains for gene transfer"), which is
30 hereby incorporated by reference. U.S. Patent Number 5,804,413 teaches the use of recombinant HSV δ 92 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.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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 LMM 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 LMM into the alphavirus genome in place of the capsid-coding region results in the production of a large number of LMM-coding RNAs and the synthesis of high levels of LMM in vector transduced cells. While alphavirus infection is typically associated with cell lysis within a few days, the ability to establish a persistent infection in hamster normal kidney cells (BHK-21) with a variant of Sindbis virus (SIN) indicates that the lytic replication of alphaviruses can be altered to suit the needs of the gene therapy application (Dryga, S.A. et al. (1997) *Virology* 228:74-83). The wide host range of alphaviruses will allow the introduction of LMM 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.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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 LMM.

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 LMM. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors with suitable RNA polymerase promoters such as T7 or SP6. Alternatively, these cDNA constructs that synthesize complementary RNA, constitutively or inducibly, can be introduced into cell lines, cells, or tissues.

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

An additional embodiment of the invention encompasses a method for screening for a compound which is effective in altering expression of a polynucleotide encoding LMM. 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

compounds may alter polynucleotide expression by acting as either inhibitors or promoters of polynucleotide expression. Thus, in the treatment of disorders associated with increased LMM expression or activity, a compound which specifically inhibits expression of the polynucleotide encoding LMM may be therapeutically useful, and in the treatment of disorders associated with
5 decreased LMM expression or activity, a compound which specifically promotes expression of the polynucleotide encoding LMM 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
10 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 LMM is exposed to at least one test compound thus obtained. The sample
15 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 LMM are assayed by any method commonly known in the art. Typically, the expression of a specific nucleotide is detected by hybridization with a probe having a nucleotide sequence complementary to the sequence of the polynucleotide encoding LMM. The amount of hybridization may be quantified, thus forming the basis
20 for a comparison of the expression of the polynucleotide both with and without exposure to one or more test compounds. Detection of a change in the expression of a polynucleotide exposed to a test compound indicates that the test compound is effective in altering the expression of the polynucleotide. A screen for a compound effective in altering expression of a specific polynucleotide can be carried out, for example, using a *Schizosaccharomyces pombe* gene expression system (Atkins, D. et al.
25 (1999) U.S. Patent No. 5,932,435; Arndt, G.M. et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:E15) or a human cell line such as HeLa cell (Clarke, M.L. et al. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13). A particular embodiment of the present invention involves screening a combinatorial library of oligonucleotides (such as deoxyribonucleotides, ribonucleotides, peptide nucleic acids, and modified oligonucleotides) for antisense activity against a specific polynucleotide sequence (Bruce, T.W. et al.
30 (1997) U.S. Patent No. 5,686,242; Bruce, T.W. et al. (2000) U.S. Patent No. 6,022,691).

Many methods for introducing vectors into cells or tissues are available and equally suitable for use *in vivo*, *in vitro*, and *ex vivo*. For *ex vivo* therapy, vectors may be introduced into stem cells taken from the patient and clonally propagated for autologous transplant back into that same patient.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Delivery by transfection, by liposome injections, or by polycationic amino polymers may be achieved using methods which are well known in the art. (See, e.g., Goldman, C.K. et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15:462-466.)

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

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

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

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

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

Specialized forms of compositions may be prepared for direct intracellular delivery of macromolecules comprising LMM or fragments thereof. For example, liposome preparations containing a cell-impermeable macromolecule may promote cell fusion and intracellular delivery of the macromolecule. Alternatively, LMM 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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 LMM or fragments thereof, antibodies of LMM, and agonists, antagonists or inhibitors of LMM, 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.

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 μ g to 100,000 μ g, 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 LMM may be used for the

WO 02/16597

PCT/US01/26365

diagnosis of disorders characterized by expression of LMM, or in assays to monitor patients being treated with LMM or agonists, antagonists, or inhibitors of LMM. Antibodies useful for diagnostic purposes may be prepared in the same manner as described above for therapeutics. Diagnostic assays for LMM include methods which utilize the antibody and a label to detect LMM 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 LMM, including ELISAs, RIAs, and FACS, are known in the art and provide a basis for diagnosing altered or abnormal levels of LMM expression. Normal or standard values for LMM expression are established by combining body fluids or cell extracts taken from normal mammalian subjects, for example, human subjects, with antibodies to LMM under conditions suitable for complex formation. The amount of standard complex formation may be quantitated by various methods, such as photometric means. Quantities of LMM 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 LMM may be used for diagnostic purposes. The polynucleotides which may be used include oligonucleotide sequences, complementary RNA and DNA molecules, and PNAs. The polynucleotides may be used to detect and quantify gene expression in biopsied tissues in which expression of LMM may be correlated with disease. The diagnostic assay may be used to determine absence, presence, and excess expression of LMM, and to monitor regulation of LMM levels during therapeutic intervention.

In one aspect, hybridization with PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding LMM or closely related molecules may be used to identify nucleic acid sequences which encode LMM. 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 LMM, 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 LMM 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:7-12 or from genomic sequences including promoters, enhancers, and introns of the LMM gene.

Means for producing specific hybridization probes for DNAs encoding LMM include the

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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

Polynucleotide sequences encoding LMM may be used for the diagnosis of disorders associated with expression of LMM. 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 neurological disorder such as epilepsy, ischemic cerebrovascular disease, stroke, cerebral neoplasms, Alzheimer's disease, Pick's disease, Huntington's disease, dementia, Parkinson's disease and other extrapyramidal disorders, amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders, progressive neural muscular atrophy, retinitis pigmentosa, hereditary ataxias, multiple sclerosis and other demyelinating diseases, bacterial and viral meningitis, brain abscess, subdural empyema, epidural abscess, suppurative intracranial thrombophlebitis, myelitis and radiculitis, viral central nervous system disease, prion diseases including kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, nutritional and metabolic diseases of the nervous system, neurofibromatosis, tuberous sclerosis, cerebelloretinal hemangioblastomatosis, encephalotrigeminal syndrome, mental retardation and other developmental disorders of the central nervous system 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), 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, ankylosing spondylitis, amyloidosis, anemia, asthma, atherosclerosis, autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thyroiditis, autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), bronchitis,

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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, hypereosinophilia, irritable bowel syndrome, multiple sclerosis, myasthenia gravis,

5 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,

10 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, 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,

15 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 (AIDS) enteropathy, jaundice, hepatic encephalopathy, hepatorenal syndrome, hepatic steatosis, hemochromatosis, Wilson's disease, alpha₁-antitrypsin deficiency, Reye's syndrome, primary

20 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 hyperplasias, adenomas, and carcinomas; a skin disorder, such as dermatitis, eczema, ichthyosis, keratosis, psoriasis, scleroderma, and skin atrophy; a disorder of lipid metabolism such as fatty liver,

25 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 disease, hyperlipoproteinemia, diabetes mellitus, lipodystrophy, lipomatosis, acute panniculitis,

30 disseminated fat necrosis, adiposis dolorosa, lipid adrenal hyperplasia, minimal change disease, lipomas, atherosclerosis, hypercholesterolemia, hypercholesterolemia with hypertriglyceridemia, primary hypopthalipoproteinemia, hypothyroidism, renal disease, liver disease, lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency, cerebrotendinous xanthomatosis, sitosterolemia, hypocholesterolemia, Tay-

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Sachs disease, Sandhoff's disease, hyperlipidemia, hyperlipemia, lipid myopathies, and obesity; and 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 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 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. The polynucleotide sequences encoding LMM may be used in Southern or northern analysis, dot blot, or other membrane-based technologies; in PCR technologies; in dipstick, pin, and multiformat ELISA-like assays; and in microarrays utilizing fluids or tissues from patients to detect altered LMM expression. Such qualitative or quantitative methods are well known in the art.

In a particular aspect, the nucleotide sequences encoding LMM may be useful in assays that detect the presence of associated disorders, particularly those mentioned above. The nucleotide sequences encoding LMM 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 LMM in the sample indicates the presence of the associated disorder. Such assays may also be used to evaluate the

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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 LMM, a normal or standard profile for expression is established. This may be accomplished by combining
5 body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with a sequence, or a fragment thereof, encoding LMM, under conditions suitable for hybridization or amplification. Standard hybridization may be quantified by comparing the values obtained from normal subjects with values from an experiment in which a known amount of a substantially purified polynucleotide is used. Standard values obtained in this manner may be compared with values obtained from samples from
10 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
15 successive assays may be used to show the efficacy of treatment over a period ranging from several days to months.

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

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

In a particular aspect, oligonucleotide primers derived from the polynucleotide sequences
30 encoding LMM may be used to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs). SNPs are substitutions, insertions and deletions that are a frequent cause of inherited or acquired genetic disease in humans. Methods of SNP detection include, but are not limited to, single-stranded conformation

WO 02/16597

PCT/US01/26365

polymorphism (SSCP) and fluorescent SSCP (fSSCP) methods. In SSCP, oligonucleotide primers derived from the polynucleotide sequences encoding LMM are used to amplify DNA using the polymerase chain reaction (PCR). The DNA may be derived, for example, from diseased or normal tissue, biopsy samples, bodily fluids, and the like. SNPs in the DNA cause differences in the secondary and tertiary structures of PCR products in single-stranded form, and these differences are detectable using gel electrophoresis in non-denaturing gels. In fSSCP, the oligonucleotide primers are fluorescently labeled, which allows detection of the amplicons in high-throughput equipment such as DNA sequencing machines. Additionally, sequence database analysis methods, termed *in silico* SNP (isSNP), are capable of identifying polymorphisms by comparing the sequence of individual overlapping DNA fragments which assemble into a common consensus sequence. These computer-based methods filter out sequence variations due to laboratory preparation of DNA and sequencing errors using statistical models and automated analyses of DNA sequence chromatograms. In the alternative, SNPs may be detected and characterized by mass spectrometry using, for example, the high throughput MASSARRAY system (Sequenom, Inc., San Diego CA).

Methods which may also be used to quantify the expression of LMM 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.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

In another embodiment, LMM, fragments of LMM, or antibodies specific for LMM 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
5 generate a transcript image of a tissue or cell type. A transcript image represents the global pattern of gene expression by a particular tissue or cell type. Global gene expression patterns are analyzed by quantifying the number of expressed genes and their relative abundance under given conditions and at a given time. (See Seilhamer et al., "Comparative Gene Transcript Analysis," U.S. Patent Number 5,840,484, expressly incorporated by reference herein.) Thus a transcript image may be generated by
10 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.

15 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
20 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
25 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
30 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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.

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

Another particular embodiment relates to the use of the polypeptide sequences of the present invention to analyze the proteome of a tissue or cell type. The term proteome refers to the global pattern of protein expression in a particular tissue or cell type. Each protein component of a proteome
15 can be subjected individually to further analysis. Proteome expression patterns, or profiles, are analyzed by quantifying the number of expressed proteins and their relative abundance under given conditions and at a given time. A profile of a cell's proteome may thus be generated by separating and analyzing the polypeptides of a particular tissue or cell type. In one embodiment, the separation is achieved using two-dimensional gel electrophoresis, in which proteins from a sample are separated by
20 isoelectric focusing in the first dimension, and then according to molecular weight by sodium dodecyl sulfate slab gel electrophoresis in the second dimension (Steiner and Anderson, *supra*). The proteins are visualized in the gel as discrete and uniquely positioned spots, typically by staining the gel with an agent such as Coomassie Blue or silver or fluorescent stains. The optical density of each protein spot is generally proportional to the level of the protein in the sample. The optical densities of equivalently
25 positioned protein spots from different samples, for example, from biological samples either treated or untreated with a test compound or therapeutic agent, are compared to identify any changes in protein spot density related to the treatment. The proteins in the spots are partially sequenced using, for example, standard methods employing chemical or enzymatic cleavage followed by mass spectrometry. The identity of the protein in a spot may be determined by comparing its partial
30 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 LMM to quantify the

WO 02/16597

PCT/US01/26365

levels of LMM 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; Mendozze, L.G. et al. (1999) *Biotechniques* 27:778-788). Detection may be performed by a
5 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
10 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.

15 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
20 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
25 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.,
30 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

In another embodiment of the invention, LMM, 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
5 between LMM and the agent being tested may be measured.

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

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

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

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

The disclosures of all patents, applications, and publications mentioned above and below, including U.S. Ser. No. 60/227,429, U.S. Ser. No. 60/231,370, U.S. Ser. No. 60/233,212, and U.S. Ser. No. 60/236,885, are hereby expressly incorporated by reference.

30 EXAMPLES

I. Construction of cDNA Libraries

Incyte cDNAs were derived from cDNA libraries described in the LIFESEQ GOLD database (Incyte Genomics, Palo Alto CA) and shown in Table 4, column 5. Some tissues were

WO 02/16597

PCT/US01/26365

homogenized and lysed in guanidinium isothiocyanate, while others were homogenized and lysed in phenol or in a suitable mixture of denaturants, such as TRIZOL (Life Technologies), a monophasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate. The resulting lysates were centrifuged over CsCl cushions or extracted with chloroform. RNA was precipitated from the lysates with either isopropanol
5 or sodium acetate and ethanol, or by other routine methods.

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

In some cases, Stratagene was provided with RNA and constructed the corresponding cDNA libraries. Otherwise, cDNA was synthesized and cDNA libraries were constructed with the UNIZAP vector system (Stratagene) or SUPERSCRIP^T plasmid system (Life Technologies), using
15 the recommended procedures or similar methods known in the art. (See, e.g., Ausubel, 1997, *supra*, units 5.1-6.6.) Reverse transcription was initiated using oligo d(T) or random primers. Synthetic oligonucleotide adapters were ligated to double stranded cDNA, and the cDNA was digested with the appropriate restriction enzyme or enzymes. For most libraries, the cDNA was size-selected (300-1000 bp) using SEPHACRYL S1000, SEPHAROSE CL2B, or SEPHAROSE CL4B column
20 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., PBLUESCRIP^T plasmid (Stratagene), PSPORT1 plasmid (Life Technologies), PCDNA2.1 plasmid (Invitrogen, Carlsbad CA), PBK-CMV plasmid (Stratagene), PCR2-TOFOTA (Invitrogen), or pINCY (Incyte Genomics, Palo Alto CA), or derivatives thereof. Recombinant plasmids were
25 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.

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
30 at least one of the following: a Magic or WIZARD Minipreps DNA purification system (Promega); an AGTC Miniprep purification kit (Edge Biosystems, Gaithersburg MD); and QIAWELL 8 Plasmid, QIAWELL 8 Plus Plasmid, QIAWELL 8 Ultra Plasmid purification systems or the R.E.A.L. PREP 96 plasmid purification kit from QIAGEN. Following precipitation, plasmids were resuspended in 0.1

WO 02/16597

PCT/US01/26365

ml of distilled water and stored, with or without lyophilization, at 4 °C.

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

III. Sequencing and Analysis

Incyte cDNA recovered in plasmids as described in Example II were sequenced as follows.

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

The polynucleotide sequences derived from Incyte cDNAs were validated by removing vector, linker, and poly(A) sequences and by masking ambiguous bases, using algorithms and programs based on BLAST, dynamic programming, and dinucleotide nearest neighbor analysis. The Incyte cDNA sequences or translations thereof were then queried against a selection of public databases such as the GenBank primate, rodent, mammalian, vertebrate, and eukaryote databases, and BLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOM, and hidden Markov model (HMM)-based protein family databases such as PFAM. (HMM is a probabilistic approach which analyzes consensus primary structures of gene families. See, for example, Eddy, S.R. (1996) Curr. Opin. Struct. Biol. 6:361-365.) The queries were performed using programs based on BLAST, FASTA, BLIMPS, and HMMER. The Incyte cDNA sequences were assembled to produce full length polynucleotide sequences. Alternatively, GenBank cDNAs, GenBank ESTs, stitched sequences, stretched sequences, or

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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

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

The programs described above for the assembly and analysis of full length polynucleotide and polypeptide sequences were also used to identify polynucleotide sequence fragments from SEQ ID NO:7-12. Fragments from about 20 to about 4000 nucleotides which are useful in hybridization and amplification technologies are described in Table 4, column 4.

IV. Identification and Editing of Coding Sequences from Genomic DNA

Putative lipid metabolism enzymes were initially identified by running the Genscan gene identification program against public genomic sequence databases (e.g., gbpri and gbhtg). Genscan is a general-purpose gene identification program which analyzes genomic DNA sequences from a variety of organisms (See Burge, C. and S. Karlin (1997) *J. Mol. Biol.* 268:78-94, and Burge, C. and S. Karlin (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:346-354). The program concatenates predicted exons to form an assembled cDNA sequence extending from a methionine to a stop codon. The output of

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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 metabolism enzymes, the encoded polypeptides were analyzed by querying against PFAM models for lipid metabolism enzymes. Potential lipid metabolism enzymes were also identified by homology to Incyte cDNA sequences that had been annotated as lipid metabolism enzymes. These selected Genscan-predicted sequences were then compared by BLAST analysis to the genpept and gbprl public databases. Where necessary, the Genscan-predicted sequences were then edited by comparison to the top BLAST hit from genpept to correct errors in the sequence predicted by Genscan, such as extra or omitted exons. BLAST analysis was also used to find any Incyte cDNA or public cDNA coverage of the Genscan-predicted sequences, thus providing evidence for transcription. When Incyte cDNA coverage was available, this information was used to correct or confirm the Genscan predicted sequence. Full length polynucleotide sequences were obtained by assembling Genscan-predicted coding sequences with Incyte cDNA sequences and/or public cDNA sequences using the assembly process described in Example III. Alternatively, full length polynucleotide sequences were derived entirely from edited or unedited Genscan-predicted coding sequences.

V. Assembly of Genomic Sequence Data with cDNA Sequence Data

"Stitched" Sequences

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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

5 **“Stretched” Sequences**

Partial DNA sequences were extended to full length with an algorithm based on BLAST analysis. First, partial cDNAs assembled as described in Example III were queried against public databases such as the GenBank primate, rodent, mammalian, vertebrate, and eukaryote databases using the BLAST program. The nearest GenBank protein homolog was then compared by BLAST
10 analysis to either Incyte cDNA sequences or GenScan exon predicted sequences described in Example IV. A chimeric protein was generated by using the resultant high-scoring segment pairs (HSPs) to map the translated sequences onto the GenBank protein homolog. Insertions or deletions may occur in the chimeric protein with respect to the original GenBank protein homolog. The GenBank protein homolog, the chimeric protein, or both were used as probes to search for homologous
15 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 LMM Encoding Polynucleotides

The sequences which were used to assemble SEQ ID NO:7-12 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:7-12 were assembled into clusters of contiguous and overlapping sequences using assembly algorithms such as Phrap (Table 7). Radiation hybrid and genetic mapping data available from public resources such as the Stanford Human Genome Center (SHGC), Whitehead Institute for
25 Genome Research (WIGR), and Généthon were used to determine if any of the clustered sequences had been previously mapped. Inclusion of a mapped sequence in a cluster resulted in the assignment of all sequences of that cluster, including its particular SEQ ID NO., to that map location.

Map locations are represented by ranges, or intervals, of human chromosomes. The map position of an interval, in centiMorgans, is measured relative to the terminus of the chromosome’s p-
30 arm. (The centiMorgan (cM) is a unit of measurement based on recombination frequencies between chromosomal markers. On average, 1 cM is roughly equivalent to 1 megabase (Mb) of DNA in humans, although this can vary widely due to hot and cold spots of recombination.) The cM distances are based on genetic markers mapped by Généthon which provide boundaries for radiation hybrid

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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.

5 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.)

10 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:

15

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

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 LMM are analyzed with respect to the tissue sources from which they were derived. For example, some full length sequences are

WO 02/16597

PCT/US01/26365

assembled, at least in part, with overlapping Incyte cDNA sequences (see Example III). Each cDNA sequence is derived from a cDNA library constructed from a human tissue. Each human tissue is classified into one of the following organ/tissue categories: cardiovascular system; connective tissue; digestive system; embryonic structures; endocrine system; exocrine glands; genitalia, female; genitalia, male; germ cells; hemic and immune system; liver; musculoskeletal system; nervous system; pancreas; respiratory system; sense organs; skin; stomatognathic system; unclassified/mixed; or urinary tract. The number of libraries in each category is counted and divided by the total number of libraries across all categories. Similarly, each human tissue is classified into one of the following disease/condition categories: cancer, cell line, developmental, inflammation, neurological, trauma, cardiovascular, pooled, and other, and the number of libraries in each category is counted and divided by the total number of libraries across all categories. The resulting percentages reflect the tissue- and disease-specific expression of cDNA encoding LMM. cDNA sequences and cDNA library/tissue information are found in the LIFESEQ GOLD database (Incyte Genomics, Palo Alto CA).

VIII. Extension of LMM Encoding Polynucleotides

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

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

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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 μ l PICOGREEN quantitation reagent (0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR) dissolved in 1X TE and 0.5 μ l 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 μ l to 10 μ l 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 CviII 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. Labeling and Use of Individual Hybridization Probes

Hybridization probes derived from SEQ ID NO:7-12 are employed to screen cDNAs,

WO 02/16597

PCT/US01/26365

genomic DNAs, or mRNAs. Although the labeling of oligonucleotides, consisting of about 20 base pairs, is specifically described, essentially the same procedure is used with larger nucleotide fragments. Oligonucleotides are designed using state-of-the-art software such as OLIGO 4.06 software (National Biosciences) and labeled by combining 50 pmol of each oligomer, 250 μ Ci of ³²P adenosine triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech), and T4 polynucleotide kinase (DuPont NEN, Boston MA). The labeled oligonucleotides are substantially purified using a SEPHADEX G-25 superfine size exclusion dextran bead column (Amersham Pharmacia Biotech). An aliquot containing 10⁷ counts per minute of the labeled probe is used in a typical membrane-based hybridization analysis of human genomic DNA digested with one of the following endonucleases: Ase I, Bgl II, Eco RI, Pst I, Xba I, or Pvu II (DuPont NEN).

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

X. Microarrays

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

Full length cDNAs, Expressed Sequence Tags (ESTs), or fragments or oligomers thereof may comprise the elements of the microarray. Fragments or oligomers suitable for hybridization can be selected using software well known in the art such as LASERGENE software (DNASTAR). The array elements are hybridized with polynucleotides in a biological sample. The polynucleotides in the biological sample are conjugated to a fluorescent label or other molecular tag for ease of detection.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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 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.

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 μ g 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

oven.

Array elements are applied to the coated glass substrate using a procedure described in US Patent No. 5,807,522, incorporated herein by reference. 1 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). Microarrays are washed at room temperature once in 0.2% SDS and three times in distilled water. Non-specific binding sites are blocked by incubation of microarrays in 0.2% casein in phosphate buffered saline (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) for 30 minutes at 60°C followed by washes in 0.2% SDS and distilled water as before.

Hybridization

Hybridization reactions contain 9 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

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,

WO 02/16597

PCT/US01/26365

although the apparatus is capable of recording the spectra from both fluorophores simultaneously.

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

The output of the photomultiplier tube is digitized using a 12-bit RTI-835H analog-to-digital (A/D) conversion board (Analog Devices, Inc., Norwood MA) installed in an IBM-compatible PC computer. The digitized data are displayed as an image where the signal intensity is mapped using a linear 20-color transformation to a pseudocolor scale ranging from blue (low signal) to red (high signal). The data is also analyzed quantitatively. Where two different fluorophores are excited and measured simultaneously, the data are first corrected for optical crosstalk (due to overlapping emission spectra) between the fluorophores using each fluorophore's emission spectrum.

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

XI. Complementary Polynucleotides

Sequences complementary to the LMM-encoding sequences, or any parts thereof, are used to detect, decrease, or inhibit expression of naturally occurring LMM. 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 LMM. 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 LMM-encoding transcript.

XII. Expression of LMM

Expression and purification of LMM is achieved using bacterial or virus-based expression systems. For expression of LMM in bacteria, cDNA is subcloned into an appropriate vector containing an antibiotic resistance gene and an inducible promoter that directs high levels of cDNA

WO 02/16597

PCT/US01/26365

transcription. Examples of such promoters include, but are not limited to, the *trp-lac* (*lac*) 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 LMM upon induction with isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Expression of LMM in eukaryotic cells is achieved by infecting insect or mammalian cell lines with recombinant *Antographica californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV), commonly known as baculovirus. The nonessential polyhedrin gene of baculovirus is replaced with cDNA encoding LMM 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, LMM 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 LMM 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 LMM obtained by these methods can be used directly in the assays shown in Examples XVI and XVII where applicable.

XIII. Functional Assays

LMM function is assessed by expressing the sequences encoding LMM at physiologically elevated levels in mammalian cell culture systems. cDNA is subcloned into a mammalian expression vector containing a strong promoter that drives high levels of cDNA expression. Vectors of choice include PCMV SPORT (Life Technologies) and PCR3.1 (Invitrogen, Carlsbad CA), both of which contain the cytomegalovirus promoter. 5-10 μ g 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 μ g of an additional plasmid containing sequences encoding a

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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 LMM on gene expression can be assessed using highly purified populations of cells transfected with sequences encoding LMM 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 LMM and other genes of interest can be analyzed by northern analysis or microarray techniques.

XIV. Production of LMM Specific Antibodies

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

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

Typically, oligopeptides of about 15 residues in length are synthesized using an ABI 431A peptide synthesizer (Applied Biosystems) using FMOC chemistry and coupled to KLH (Sigma-

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Aldrich, St. Louis MO) by reaction with N-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS) to increase immunogenicity. (See, e.g., Austubel, 1995, *supra*.) Rabbits are immunized with the oligopeptide-KLH complex in complete Freund's adjuvant. Resulting antisera are tested for antipeptide and anti-LMM activity by, for example, binding the peptide or LMM to a substrate,
5 blocking with 1% BSA, reacting with rabbit antisera, washing, and reacting with radio-iodinated goat anti-rabbit IgG.

XV. Purification of Naturally Occurring LMM Using Specific Antibodies

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

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

XVI. Identification of Molecules Which Interact with LMM

LMM, or biologically active fragments thereof, are labeled with ¹²⁵I Bolton-Hunter reagent.
20 (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 LMM, washed, and any wells with labeled LMM complex are assayed. Data obtained using different concentrations of LMM are used to calculate values for the number, affinity, and association of LMM with the candidate molecules.

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

LMM 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
30 between the proteins encoded by two large libraries of genes (Nandabalan, K. et al. (2000) U.S. Patent No. 6,057,101).

XVII. Demonstration of LME Activity

LME activity can be demonstrated by an *in vitro* hydrolysis assay with vesicles containing

WO 02/16597

PCT/US01/26365

1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]oleoyl phosphatidylcholine (Sigma-Aldrich). LME 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 μCi 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 μg of 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]oleoyl phosphatidylcholine vesicles, and various amounts of LME diluted in PBS. After incubation for 30 min at 37 °C, 20 μg 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 LME is added to the assay mixture while the amount of radioactivity released as lyso-phosphatidylcholine will remain low. This demonstrates that LME cleaves at the sn-2 and not the sn-1 position, as is characteristic of phospholipase A₂ activity.

Alternatively, LME phospholipase activity is measured by the hydrolysis of a fatty acyl residue at the sn-1 position of phosphatidylserine. LME 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 LME in biological samples.

LME lipoxygenase activity can be measured by chromatographic methods. Extracted LME lipoxygenase protein is incubated with 100 μM [1-¹⁴C] 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 by 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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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 LME in biological samples. For stereochemical analysis, the metabolites of arachidonic acid are analyzed further by
5 chiral phase-HPLC and by mass spectrometry (Sun, D. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:33540-33547).

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.

10 Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in molecular biology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Table 1

Incyte Project ID	Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Polynucleotide ID
7479063	1	7479063CBI	7	7479063CBI
7479064	2	7479064CBI	8	7479064CBI
7478088	3	7478088CBI	9	7478088CBI
7480935	4	7480935CBI	10	7480935CBI
72023748	5	72023748CBI	11	72023748CBI
72023748	6	72023748CBI	12	72023748CBI

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Table 2

Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	GenBank ID NO:	Probability score	GenBank Homolog
1	7479063CD1	6505053	5.20E-116	[Homo sapiens] lysosomal acid lipase
2	7479064CD1	614749	2.30E-97	[Rattus norvegicus] prelingual lipase
3	7478088CD1	5219393	4.10E-08	arachidonate 12-lipoxygenase [Homo sapiens] (Yoshimoto, T. et al. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 172: 1230-1235; Yoshimoto, T. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 24805-24809)
4	7480935CD1	6579561	1.40E-142	pregastric lipase [Homo sapiens] (Hubb. et al. (1986) Patent Number: WO 8603778-A)
5	7481764CD1	6537514	1.60E-47	arylacetylcholinesterase [Homo sapiens] (Probst M.R. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269: 21650- 21656)
6	72023748CD1	66705987	2.10E-151	phospholipase C-E2 [Mus musculus] (Otsuki M. et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266: 97-103)

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	747906CDL	403	S130 S137 S147 S209 S248 S271 S279 T135 T167 T190 T353 T58 Y173	M105 M165 M277 M325 M40	Lipases, serine active site: A152-N201 alpha/beta hydrolase fold abhydrolase: Y117-I396 TRIACYLGLYCEROL LIPASE, LINGUAL DM02342 F38571 3-397: M7-Y402 TRIACYLGLYCEROL LIPASE, LINGUAL DM02342 F07098 35-395: S42-N399 TRIACYLGLYCEROL LIPASE, LINGUAL DM02342 JC4017 1-394: M1-N282 TRIACYLGLYCEROL LIPASE, LINGUAL DM02342 P04634 32-394: M39-M399 LIPASE HYDROLASE PRECURSOR SIGNAL LIPID DEGRADATION PROTEIN GLYCOPROTEIN ESTERASE TRIACYLGLYCEROL PD003556: F26-M399 Lipases, serine active site: L172-F181 SPSCAN Lipases, serine active site: A146-F195 PROFLASCAN TRIACYLGLYCEROL LIPASE, LINGUAL DM02342 P04634 32-394: M33-M272 JC4017 1-394: M1-N282 F07098 35-395: I35-M271 F38571 3-397: N28-M272 LIPASE HYDROLASE PRECURSOR SIGNAL LIPID DEGRADATION PROTEIN GLYCOPROTEIN ESTERASE TRIACYLGLYCEROL PD003556: N28-M271 Signal peptide: M1-G19 Lipases, serine active site: L166-T175 Signal cleavage: M1-G19 Signal peptide: M1-A39 FLAV (Polycystin-1, Lipoxigenase, Alpha Toxin)/LH2 (Lipoxygenase homology) domain: V44-E160	PROFLASCAN HMHER_FFAM ELAST_DOMO ELAST_DOMO ELAST_DOMO ELAST_DOMO ELAST_PRODUM ELAST_PRODUM
2	747906CDL	289	S109 S124 S131 S141 S218 S263 T184 T203 T215 T235 T52	M100 N34 N99	Lipases, serine active site: A146-F195 PROFLASCAN TRIACYLGLYCEROL LIPASE, LINGUAL DM02342 P04634 32-394: M33-M272 JC4017 1-394: M1-N282 F07098 35-395: I35-M271 F38571 3-397: N28-M272 LIPASE HYDROLASE PRECURSOR SIGNAL LIPID DEGRADATION PROTEIN GLYCOPROTEIN ESTERASE TRIACYLGLYCEROL PD003556: N28-M271 Signal peptide: M1-G19 Lipases, serine active site: L166-T175 Signal cleavage: M1-G19 Signal peptide: M1-A39 FLAV (Polycystin-1, Lipoxigenase, Alpha Toxin)/LH2 (Lipoxygenase homology) domain: V44-E160	PROFLASCAN ELAST_DOMO ELAST_PRODUM
3	7478088CDL	168	S117 S157 S6 T135 T60		Lipases, serine active site: L166-T175 Signal cleavage: M1-G19 Signal peptide: M1-A39 FLAV (Polycystin-1, Lipoxigenase, Alpha Toxin)/LH2 (Lipoxygenase homology) domain: V44-E160	HMHER MOTIFS SPSCAN SPSCAN HMHER_FFAM

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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	748093CD1	399	S109 S124 S131 S141 S218 S263 S273 T184 T203 T215 T235 T329 T52	N271 N327 N34 N99	Signal peptide: M1-G19 Signal peptide: M1-G19 alpha/beta hydrolase fold: Y111-I390 Lipases, serine active site: A146-F195 LIPASE HYDROLASE PRECURSOR SIGNAL LIPID DEGRADATION PROTEIN GLYCOPROTEIN ESTERASE TRIACYLGLYCEROL PD003556:N28- L397 TRIACYLGLYCEROL LIPASE, LINGUAL DM02342 IP04634:32-394:M33-E395 JC4017:1-394:M1-E395 P07098:35-395:I35-E395 P38571:3-397:N28-T396	HMMER SPSCAN HMMER_PPFAM PROFLESCAN BLAST_PRODOK
5	748176CD1	410	S111 S248 S265 S32 S396 S46 S81 T28	N171 N272	Lipases, serine active site: L166-T175 Lipolytic enzymes *G-D-X BL01173A:I118-S130 BL01173B:I149-H175	MOTIFS BLIMPS_BLOCKS
6	72023748CD1	1619	S1008 S1012 S1068 S1132 S1154 S1162 S1169 S1181 S1188 S1195 S1253 S1285 S1485 S1522 S1536 S1584 S184 S278 S343 S430 S531 S543 S576 S606 S65 S678 S760 S801 S875 S89 S970 T1029 T1037 T1081 T1219 T1416	N1059 N815 N828 N997	Phosphatidylinositol-specific phospholipase PI-PIC-X:D848-K993 PI-PIC-Y:A1225-C1340 C2 domain: L1360-T1452	HMMER_PPFAM

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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
6			T1525 T171 T242 T263 T305 T358 T586 T665 T761 T8 T912 Y1232		Pleckstrin homology domain (PH):A496-A603 Phosphatidylinositol-specific phospholipase X-box domain proteins BL50007:FL273-G1314, D1439-I1475, I853-G898, T912-Q949, E977-K993 Phospholipase C signature PR00390:P852-Q870, D878-G898, L1453-RL463, T976-K993, L1278-W1299, W1299-L1317 C2 domain signature PR00360:RL381-I1393, RL411-M1424, V1433-D1441 PHOSPHOLIPASE C PHOSPHODIESTERASE 1 PHOSPHATIDYL INOSITOL-4, 5-BISPHOSPHATE LIPID DEGRADATION PHOSPHOLIPASE SPECIFIC OR CALCIUM BINDING PD001214:D848-K993 PD001202:L1226-P1336 PD004439:Q736-Q847, C488-R703, L621-Q851 1-PHOSPHATIDYLINOSITOL-4, 5-BISPHOSPHATE PHOSPHODIESTERASE D DK00855 P51178 64-472:D742-D1019, S540-R616, P635-A708, L275-W285 P08487 71-500:I735-G1025, I539-M602, G643-R697 P16885 63-486:H743-E1010, I539-L601, W661-H707 A53970 67-522:Y772-P895, I539-M602	HMER_FFAM ELMPS_BLOCKS ELMPS_PRINTS ELMPS_PRINTS BLAST_PRODUM BLAST_PRODUM

Table 4

Polynucleotide SEQ ID NO.	Incyte Polynucleotide ID	Sequence Length	Selected Fragment(s)	Sequence Fragments	5' Position	3' Position
7	7479063CBI	1228	1-331, 390-1228	710759536Y1 F07479063.G7230085_000	896	1228
8	7479064CBI	1143	1-264, 928-1143, 317-357	7368528H113 F07479063.G7230085_000 012.G14749	1	996 1143
9	7478088CBI	784	1-784	55146716Y1	111	784
10	7480935CBI	1473	1-264, 928-1077, 317-357, 1140-1473	F77480935.G9801030_000 005.G758064 7989562H1 (UPRCDC01)	1 274 1	690 1473 696
11	7481764CBI	1619	1-1158	GNN.G9795122_000003.ed 55369512	1	1268
12	72023748CBI	6551	4004-4191, 1861-1978, 3239-3517, 1-1794, 5526-6125, 4754-5258, 2111-2207	6875328H1 (EPLMNH04) 72334958Y1 7314090H1 (L1VRN0207) 55057395J1 686280678 (BRAGN02) 71870033Y1 55076578H1 72335316Y1 6745149H1 (BRANDIT03) 681779H1 (KDMPT0501) 677679H1 (KDMPT0501) 70164858H1 (BRACN02) 72334872Y1 6935553H1 (SINFM02) GNN.G8039388.ed1	1204 5270 3898 1509 2908 2462 3455 2166 4535 5453 5453 4153 5849 5849 2852 5237 1	1619 6146 4641 1861 3239 3049 3947 2545 5123 6027 4625 5247 5247 3238 5597 6551

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Table 5

Polynucleotide SEQ. ID. NO.	Incyte Project ID	Representative Library
7	7479063CBL	MONOTKS05
8	7479064CBL	UTRCDIC01
9	7478088CBL	BRONDI01
10	7480935CBL	UTRCDIC01
12	72023748CBL	PITUNOM01

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Table 6

Library	Vector	Library Description
BRONDI101	pINCY	Library was constructed using RNA isolated from right lower lobe bronchial tissue removed from a pool of 3 asthmatic Caucasian male and female donors, 22- to 51-years-old during bronchial biopsy procedure. Tissue was homogenized and total RNA was extracted using RNeasy spin columns. Poly(A) RNA was purified and poly(A) tail was removed. Subtracted treated monocyte tissue library was constructed using 7.5 million clones from a treated monocyte library and were subjected to two rounds of subtraction hybridization with 1.03 x 10 ⁶ clones from a second treated monocyte library. The starting library for subtraction was constructed using treated monocytes from peripheral blood obtained from a 42-year-old female. The cells were treated with anti-interleukin-10 (anti-IL-10) and lipopolysaccharide (LPS). The anti-IL-10 was added at time 0 at 10 ng/ml and LPS was added at time 24 hours. The monocyte library was constructed using total RNA isolated from the monocytes at time 24 hours. The hybridization probe for subtraction was derived from a similarly constructed library from RNA isolated from monocyte tissue, treated with interleukin-10 (IL10) and lipopolysaccharide (LPS) from the same donor.
MONO7K505	pINCY	Subtractive hybridization conditions were based on the methodologies of Swarcop et al., NAR (1991), 19:1954 and Ronaldo, et al., Genome Research (1996) 6:791.
PITUNO101	pINCY	This normalized pituitary gland tissue library was constructed from 6.92 million independent clones from a pituitary gland tissue library. Starting RNA was made from a pituitary gland tissue sample from a patient with a history of pituitary abnormalities other than mild ventricular enlargement. There were no gross microscopic abnormality in any of the neocortical areas examined, except for a number of silver positive neurons with apical dendrite staining, particularly in the frontal lobe. The significance of this was undetermined. The only other microscopic abnormality was that there was prominent silver staining with some swollen axons in the CA3 region of the anterior and posterior hippocampus. The hippocampal sections were counterstained with hematoxylin and eosin. The Parkinson's disease patient history included schizophrenia. The library was normalized in two rounds using conditions adapted from Soares et al., PNAS (1994) 91:9228-9232 and Ronaldo et al., Genome Research (1996) 6:791, except that a significantly longer (48 hours/round) reannealing hybridization was used.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Table 6 (cont.)

Library	Vector	Library Description
UTACD1C01	PSPORT1	This large size fractionated library was constructed using RNA isolated from uterine cervix tissue removed from a 29-year-old Caucasian female during a vaginal hysterectomy and cystocele repair. Pathology indicated the cervix showed mild chronic cervicitis with focal squamous metaplasia. Pathology for the matched tumor tissue indicated intramural uterine leiomyoma. Patient history included hypothyroidism, perimenopausal symptoms, hypertension, and a cholecystectomy. Patient medications included Synthroid, family history included benign hypertension in the father, and type II diabetes and hyperlipidemia in the mother.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Table 7

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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. (1983) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. et al. (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Baroch, A. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	Normalized quality scores; GCG-specified "HIGH" value for that particular Prosite motif. Generally, scores=1,4-2.1.
Flare	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 lengths= 56 or greater
Coused	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; Clavette, J.M. and S. Audic; (1997) CABIOS 12:431-439.	Score=3.5 or greater
TMAP	A program that uses weight matrices to delineate transmembrane segments on protein sequences and determine orientation.	Persson, B. and P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. and P. Argos (1996) Protein Sci. 5:369-371.	
TMEDAMMER	A program that uses a hidden Markov model (HMM) to delineate transmembrane segments on protein sequences and determine orientation.	Somhammer, E.L. et al. (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow et al., eds., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, pp. 175-182.	
Motifs	A program that searches amino acid sequences for patterns that matched those defined in Prosite.	Baroch, 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 02/16597

PCT/US01/26365

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
5 SEQ ID NO:1-6,
 - 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:1-6,
 - c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected
from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and
 - 10 d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from
the group consisting of SEQ ID NO:1-6.
2. An isolated polypeptide of claim 1 selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6.
- 15 3. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 1.
4. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 2.
5. An isolated polynucleotide of claim 4 selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-
20 12.
6. A recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a
polynucleotide of claim 3.
- 25 7. A cell transformed with a recombinant polynucleotide of claim 6.
8. A transgenic organism comprising a recombinant polynucleotide of claim 6.
9. A method of producing a polypeptide of claim 1, the method comprising:
 - 30 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.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

10. An isolated antibody which specifically binds to a polypeptide of claim 1.
11. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of:
- a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting
 - 5 of SEQ ID NO:7-12,
 - 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:7-12,
 - c) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of a),
 - d) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of b), and
 - 10 e) an RNA equivalent of a)-d).
12. An isolated polynucleotide comprising at least 60 contiguous nucleotides of a polynucleotide of claim¹¹.
13. A method of detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide
- 15 having a sequence of a polynucleotide of claim 11, the method comprising:
- a) hybridizing the sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides
 - comprising a sequence complementary to said target polynucleotide in the sample, and which probe
 - specifically hybridizes to said target polynucleotide, under conditions whereby a hybridization complex
 - 20 is formed between said probe and said target polynucleotide or fragments thereof, and
 - b) detecting the presence or absence of said hybridization complex, and, optionally, if present, the amount thereof.
14. A method of claim 13, wherein the probe comprises at least 60 contiguous nucleotides.
- 25
15. A method of detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide
- having a sequence of a polynucleotide of claim 11, the method comprising:
- a) amplifying said target polynucleotide or fragment thereof using polymerase chain reaction
 - amplification, and
 - 30 b) detecting the presence or absence of said amplified target polynucleotide or fragment thereof, and, optionally, if present, the amount thereof.
16. A composition comprising a polypeptide of claim 1 and a pharmaceutically acceptable

WO 02/16597

PCT/US01/26365

excipient.

17. A composition of claim 16, wherein the polypeptide has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6.
18. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional LMM, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition of claim 16.
19. A method of screening a compound for effectiveness as an agonist of a polypeptide of claim 1, the method comprising:
- exposing a sample comprising a polypeptide of claim 1 to a compound, and
 - detecting agonist activity in the sample.
20. A composition comprising an agonist compound identified by a method of claim 19 and a pharmaceutically acceptable excipient.
21. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional LMM, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition of claim 20.
22. A method of screening a compound for effectiveness as an antagonist of a polypeptide of claim 1, the method comprising:
- exposing a sample comprising a polypeptide of claim 1 to a compound, and
 - detecting antagonist activity in the sample.
23. A composition comprising an antagonist compound identified by a method of claim 22 and a pharmaceutically acceptable excipient.
24. A method for treating a disease or condition associated with overexpression of functional LMM, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition of claim 23.
25. A method of screening for a compound that specifically binds to the polypeptide of claim

WO 02/16597

PCT/US01/26365

1, the method comprising:

- a) combining the polypeptide of claim 1 with at least one test compound under suitable conditions, and
- b) detecting binding of the polypeptide of claim 1 to the test compound, thereby identifying a
5 compound that specifically binds to the polypeptide of claim 1.

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

- a) combining the polypeptide of claim 1 with at least one test compound under conditions
10 permissive for the activity of the polypeptide of claim 1,
- b) assessing the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound, and
- c) comparing the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound with the activity of the polypeptide of claim 1 in the absence of the test compound, wherein a change
15 in the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of the polypeptide of claim 1.

27. A method 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
20 comprising:

- a) exposing a sample comprising the target polynucleotide to a compound, under conditions suitable for the expression of the target polynucleotide,
- b) detecting altered expression of the target polynucleotide, and
- c) comparing the expression of the target polynucleotide in the presence of varying amounts
25 of the compound and in the absence of the compound.

28. 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
30 least 20 contiguous nucleotides of a polynucleotide of claim 11 under conditions whereby a specific hybridization complex is formed between said probe and a target polynucleotide in the biological sample, said target polynucleotide comprising a polynucleotide sequence of a polynucleotide of claim 11 or fragment thereof,

WO 02/16597

PCT/US01/26365

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

5

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

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

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

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

a) a chimeric antibody,

15 b) a single chain antibody,

c) a Fab fragment,

d) a F(ab')₂ fragment, or

e) a humanized antibody.

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

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

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

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

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

a) immunizing an animal with a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an

WO 02/16597

PCT/US01/26365

antibody response,

- b) isolating antibodies from said animal, and
- c) screening the isolated antibodies with the polypeptide, thereby identifying a polyclonal antibody which binds specifically to a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6.

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

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

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

- a) immunizing an animal with a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an antibody response,
- b) isolating antibody producing cells from the animal,
- c) fusing the antibody producing cells with immortalized cells to form monoclonal antibody-producing hybridoma cells,
- d) culturing the hybridoma cells, and
- e) isolating from the culture monoclonal antibody which binds specifically to a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6.

39. A monoclonal antibody produced by a method of claim 38.

40. A composition comprising the antibody of claim 39 and a suitable carrier.

41. The antibody of claim 10, wherein the antibody is produced by screening a Fab expression library.

42. The antibody of claim 10, wherein the antibody is produced by screening a recombinant immunoglobulin library.

43. A method of detecting a polypeptide having an amino acid sequence selected from the

WO 02/16597

PCT/US01/26365

group consisting of SEQ ID NO:1-6 in a sample, the method comprising:

- a) incubating the antibody of claim 10 with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the polypeptide, and
 - b) detecting specific binding, wherein specific binding indicates the presence of a polypeptide
- 5 having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6 in the sample.

44. A method of purifying a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6 from a sample, the method comprising:

- a) incubating the antibody of claim 10 with a sample under conditions to allow specific binding
- 10 of the antibody and the polypeptide, and
- b) separating the antibody from the sample and obtaining the purified polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6.

15 45. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

46. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

47. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.

20 48. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.

49. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:5.

25 50. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6.

51. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:7.

52. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:8.

30 53. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:9.

54. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:10.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

55. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:11.

56. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:12.

WO 02/16597

PCT/US01/26365

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
 GRIFFIN, Jennifer A.
 PATTERSON, Chandra
 GANDHI, Ameena R.
 LU, Yan
 YAO, Monique G.
 BAUGHN, Mariah R.
 WALIA, Narinder K.
 HAFALIA, April J.A.
 DING, Li
 TRIBOULEY, Catherine M.
 DAS, Debopriya
 THORNTON, Michael
 LAL, Preeti

<120> LIPID METABOLIZING ENZYMES

<130> PI-0203 PCT

<140> To Be Assigned
 <141> Herewith

<150> 60/227,429; 60/231,370; 60/233,212; 60/236,885
 <151> 2000-08-23; 2000-09-08; 2000-09-15; 2000-09-29

<160> 12
 <170> PERL Program

<210> 1
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7479063CD1

<400> i
 Met Pro Gly Ile Ser Met Met Trp Leu Leu Leu Thr Thr Thr Cys
 1 5 10 15
 Leu Ile Cys Gly Thr Leu Asn Ala Gly Gly Phe Leu Asp Leu Glu
 20 25 30
 Asn Glu Val Asn Pro Glu Val Trp Met Asn Thr Ser Glu Ile Ile
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Gly Tyr Pro Ser Glu Glu Tyr Glu Val Thr Thr Glu
 50 55 60
 Asp Gly Tyr Ile Leu Leu Val Asn Arg Ile Pro Tyr Gly Arg Thr
 65 70 75
 His Ala Arg Ser Thr Gly Pro Arg Pro Val Val Tyr Met Gln His
 80 85 90
 Ala Leu Phe Ala Gly Gln Ala Tyr Trp Leu Glu Asn Tyr Ala Asn
 95 100 105
 Gly Ser Leu Gly Phe Leu Leu Ala Asp Ala Gly Tyr Asp Val Trp
 110 115 120
 Met Gly Asn Ser Arg Gly Asn Thr Trp Ser Arg Arg His Lys Thr

WO 02/16597

PCT/US01/26365

125 130 135
 Leu Ser Glu Thr Asp Glu Lys Phe Trp Ala Phe Ser Phe Asp Glu
 140 145 150
 Met Ala Lys Tyr Asp Leu Pro Gly Val Ile Asp Phe Ile Val Asn
 155 160 165
 Lys Thr Gly Gln Glu Lys Leu Tyr Phe Ile Gly His Ser Leu Gly
 170 175 180
 Thr Thr Ile Gly Phe Val Ala Phe Ser Thr Met Pro Glu Leu Ala
 185 190 195
 Gln Arg Ile Lys Met Asn Phe Ala Leu Gly Pro Thr Ile Ser Phe
 200 205 210
 Lys Tyr Pro Thr Gly Ile Phe Thr Arg Phe Phe Leu Leu Pro Asn
 215 220 225
 Ser Ile Ile Lys Ala Val Phe Gly Thr Lys Gly Phe Phe Leu Glu
 230 235 240
 Asp Lys Lys Thr Lys Ile Ala Ser Thr Lys Ile Cys Asn Asn Lys
 245 250 255
 Ile Leu Trp Leu Ile Cys Ser Glu Phe Met Ser Leu Trp Ala Gly
 260 265 270
 Ser Asn Lys Lys Asn Met Asn Gln Ser Arg Met Asp Val Tyr Met
 275 280 285
 Ser His Ala Pro Thr Gly Ser Ser Val His Asn Ile Leu His Met
 290 295 300
 Asn Gln Leu Tyr His Ser Asp Glu Phe Arg Ala Tyr Asp Trp Gly
 305 310 315
 Asn Asp Ala Asp Asn Met Lys His Tyr Asn Gln Ser His Pro Pro
 320 325 330
 Ile Tyr Asp Leu Thr Ala Met Lys Val Pro Thr Ala Ile Trp Ala
 335 340 345
 Gly Gly His Asp Val Leu Val Thr Pro Gln Asp Val Ala Arg Ile
 350 355 360
 Leu Pro Gln Ile Lys Ser Leu His Tyr Phe Lys Leu Leu Pro Asp
 365 370 375
 Trp Asn His Phe Asp Phe Val Trp Gly Leu Asp Ala Pro Gln Arg
 380 385 390
 Met Tyr Ser Glu Ile Ile Ala Leu Met Lys Ala Tyr Ser
 395 400

<210> 2

<211> 289

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 7479064CD1

<400> 2

Met Trp Gln Leu Leu Ala Ala Ala Cys Trp Met Leu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Tyr Gly Tyr Asp Lys Lys Gly Asn Asn Ala Asn Pro Glu
 20 25 30
 Ala Asn Met Asn Ile Ser Gln Ile Ile Ser Tyr Trp Gly Tyr Pro
 35 40 45
 Tyr Glu Glu Tyr Asp Val Thr Thr Lys Asp Gly Tyr Ile Leu Gly
 50 55 60

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Ile Tyr Arg Ile Pro His Gly Arg Gly Cys Pro Gly Arg Thr Ala
65 70 75
Pro Lys Pro Ala Val Tyr Leu Gln His Gly Leu Ile Ala Ser Ala
80 85 90
Ser Asn Trp Ile Cys Asn Leu Pro Asn Asn Ser Leu Ala Phe Leu
95 100 105
Leu Ala Asp Ser Gly Tyr Asp Val Trp Leu Gly Asn Ser Arg Gly
110 115 120
Asn Thr Trp Ser Arg Lys His Leu Lys Leu Ser Pro Lys Ser Pro
125 130 135
Glu Tyr Trp Ala Phe Ser Leu Asp Glu Met Ala Lys Tyr Asp Leu
140 145 150
Pro Ala Thr Ile Asn Phe Ile Ile Glu Lys Thr Gly Gln Lys Arg
155 160 165
Leu Tyr Tyr Val Gly His Ser Gln Gly Thr Thr Ile Ala Phe Ile
170 175 180
Ala Phe Ser Thr Asn Pro Glu Leu Ala Lys Lys Ile Lys Ile Phe
185 190 195
Phe Ala Leu Ala Pro Val Val Thr Val Lys Tyr Thr Gln Ser Pro
200 205 210
Met Lys Lys Leu Thr Thr Leu Ser Arg Arg Val Val Lys Val Leu
215 220 225
Phe Gly Asp Lys Met Phe His Pro His Thr Leu Phe Asp Gln Phe
230 235 240
Ile Ala Thr Lys Val Cys Asn Arg Lys Leu Phe Arg Arg Ile Cys
245 250 255
Ser Asn Phe Leu Phe Thr Leu Ser Gly Phe Asp Pro Gln Asn Leu
260 265 270
Asn Met Val Gly Val Ser Asn Trp Val Trp Glu Asn Ile Cys Phe
275 280 285
Val Ala Gln Arg

<210> 3

<211> 168

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 7478088CD1

<400> 3

Met Gln His Met Lys Ser Lys Lys Ile Leu Asp Phe Ala Ala Asn
1 5 10 15
Val Trp Leu Ser Arg Ile Gln Ala Asp Gly Asp Val Val Cys Glu
20 25 30
Leu Pro Val Val Lys Gly Gly Gln Ala Ile Phe Pro Leu Val Arg
35 40 45
Tyr Gln Val Asp Val Tyr Thr Gly Gln Leu Lys His Ala Glu Thr
50 55 60
Glu Ser Glu Val Phe Leu Cys Leu Phe Gly Glu Arg Gly Asp Ser
65 70 75
Gly Leu Arg Gln Leu Tyr Lys Ser Asn Met Gln Val Lys Phe Gln
80 85 90
Arg Gly Gln Ile Asp Lys Phe Gln Val Ala Ala Val Ser Leu Gly

WO 02/16597

PCT/US01/26365

95 100 105
 Lys Leu Gln Lys Val Leu Leu Arg Cys Glu Ala Ser Asp Lys Ser
 110 115 120
 Gln Tyr Trp Tyr Cys Glu Gln Val Ile Val Arg Glu Pro Gly Thr
 125 130 135
 Thr Ser Glu Ser Ile Phe Thr Cys Gln Arg Trp Leu Pro Phe Met
 140 145 150
 Ser Gln Gly Ile Ile His Ser Glu Ile Glu Leu Tyr Leu Gln Gly
 155 160 165
 Glu Asp Tyr

<210> 4

<211> 399

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 7480935CD1

<400> 4

Met Trp Gln Leu Leu Ala Ala Ala Cys Trp Met Leu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Tyr Gly Tyr Asp Lys Lys Gly Asn Asn Ala Asn Pro Glu
 20 25 30
 Ala Asn Met Asn Ile Ser Gln Ile Ile Ser Tyr Trp Gly Tyr Pro
 35 40 45
 Tyr Glu Glu Tyr Asp Val Thr Thr Lys Asp Gly Tyr Ile Leu Gly
 50 55 60
 Ile Tyr Arg Ile Pro His Gly Arg Gly Cys Pro Gly Arg Thr Ala
 65 70 75
 Pro Lys Pro Ala Val Tyr Leu Gln His Gly Leu Ile Ala Ser Ala
 80 85 90
 Ser Asn Trp Ile Cys Asn Leu Pro Asn Asn Ser Leu Ala Phe Leu
 95 100 105
 Leu Ala Asp Ser Gly Tyr Asp Val Trp Leu Gly Asn Ser Arg Gly
 110 115 120
 Asn Thr Trp Ser Arg Lys His Leu Lys Leu Ser Pro Lys Ser Pro
 125 130 135
 Glu Tyr Trp Ala Phe Ser Leu Asp Glu Met Ala Lys Tyr Asp Leu
 140 145 150
 Pro Ala Thr Ile Asn Phe Ile Ile Glu Lys Thr Gly Gln Lys Arg
 155 160 165
 Leu Tyr Tyr Val Gly His Ser Gln Gly Thr Thr Ile Ala Phe Ile
 170 175 180
 Ala Phe Ser Thr Asn Pro Glu Leu Ala Lys Lys Ile Lys Ile Phe
 185 190 195
 Phe Ala Leu Ala Pro Val Val Thr Val Lys Tyr Thr Gln Ser Pro
 200 205 210
 Met Lys Lys Leu Thr Thr Leu Ser Arg Arg Val Val Lys Val Leu
 215 220 225
 Phe Gly Asp Lys Met Phe His Pro His Thr Leu Phe Asp Gln Phe
 230 235 240
 Ile Ala Thr Lys Val Cys Asn Arg Lys Leu Phe Arg Arg Ile Cys
 245 250 255

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Ser Asn Phe Leu Phe Thr Leu Ser Gly Phe Asp Pro Gln Asn Leu
 260 265 270
 Asn Met Ser Arg Leu Asp Val Tyr Leu Ser His Asn Pro Ala Gly
 275 280 285
 Thr Ser Val Gln Asn Met Leu His Trp Ala Gln Ala Val Asn Ser
 290 295 300
 Gly Gln Leu Gln Ala Phe Asp Trp Gly Asn Ser Asp Gln Asn Met
 305 310 315
 Met His Phe His Gln Leu Thr Pro Pro Leu Tyr Asn Ile Thr Lys
 320 325 330
 Met Glu Val Pro Thr Ala Ile Trp Asn Gly Gly Gln Asp Ile Val
 335 340 345
 Ala Asp Pro Lys Asp Val Glu Asn Leu Leu Pro Gln Ile Ala Asn
 350 355 360
 Leu Ile Tyr Tyr Lys Leu Ile Pro His Tyr Asn His Val Asp Phe
 365 370 375
 Tyr Leu Gly Glu Asp Ala Pro Gln Glu Ile Tyr Gln Asp Leu Ile
 380 385 390
 Ile Leu Met Glu Glu Tyr Leu Gln Asn
 395

<210> 5

<211> 410

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 7481764CD1

<400> 5

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

WO 02/16597

PCT/US01/26365

185 190 195
 Ser Val Gly Gly Ala Ala Val Ala Ala Ile Thr Gln Ala Leu Val
 200 205 210
 Gly Arg Ser Asp Leu Pro Arg Ile Arg Ala Gln Val Leu Ile Tyr
 215 220 225
 Pro Val Val Gln Ala Phe Cys Leu Gln Leu Pro Ser Phe Gln Gln
 230 235 240
 Asn Gln Asn Val Pro Leu Leu Ser Arg Lys Phe Met Val Thr Ser
 245 250 255
 Leu Cys Asn Tyr Leu Ala Ile Asp Leu Ser Trp Arg Asp Ala Ile
 260 265 270
 Leu Asn Gly Thr Cys Val Pro Pro Asp Val Trp Arg Lys Tyr Glu
 275 280 285
 Lys Trp Leu Ser Pro Asp Asn Ile Pro Lys Lys Phe Lys Asn Arg
 290 295 300
 Gly Tyr Gln Pro Trp Ser Pro Gly Pro Phe Asn Glu Ala Ala Tyr
 305 310 315
 Leu Glu Ala Lys His Met Leu Asp Val Glu Asn Ser Pro Leu Ile
 320 325 330
 Ala Asp Asp Glu Val Ile Ala Gln Leu Pro Glu Ala Phe Leu Val
 335 340 345
 Ser Cys Glu Asn Asp Ile Leu Arg Asp Asp Ser Leu Leu Tyr Lys
 350 355 360
 Lys Arg Leu Glu Asp Gln Gly Val Arg Val Thr Trp Tyr His Leu
 365 370 375
 Tyr Asp Gly Phe His Gly Ser Ile Ile Phe Phe Asp Lys Lys Ala
 380 385 390
 Leu Ser Phe Pro Cys Ser Leu Lys Ile Val Asn Ala Val Val Ser
 395 400 405
 Tyr Ile Lys Gly Ile
 410

<210> 6

<211> 1619

<212> PFT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 72023748CD1

<400> 6

Met Ala Cys Cys Gln Val Val Thr Pro Arg His Leu Gly Pro Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Thr Thr Val Ala Leu Val Leu Val Gly Arg Leu Gln Ser
 20 25 30
 Pro Cys Leu Leu Lys Phe Ala Glu Arg Gly Cys Ser Arg Glu Ser
 35 40 45
 Val Tyr Cys Ser Arg Ser Ser Gly Ser Val Ser Leu Glu Thr Tyr
 50 55 60
 Val Gly Gln Asn Ser Glu Ala Glu Thr Glu Ala Pro His Glu Gly
 65 70 75
 Pro Thr Pro Leu Ala Gly Gly Gly Phe Ser Gly Leu Cys Ser Trp
 80 85 90
 Arg Leu Leu Gly Asp Ser Cys Ser Pro Glu Thr Val Ala Phe Ser
 95 100 105

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Gly Thr His Ser Gly His Pro Leu Leu Ala Ala Pro Glu Asp Met
 110 115 120
 Val Leu Gly Phe Cys Ala Gly Ser Val Trp Gly Cys Asp Arg His
 125 130 135
 Gly Leu Cys Ala Arg Gly Ala Pro Ala Arg Ala Gly Ala Gln Gly
 140 145 150
 Thr Pro Gly Ala Ser Thr Gly Pro Gly Val Pro Arg Ala Val Pro
 155 160 165
 Val Thr Gly Ile Gly Thr Arg Arg Pro Trp Lys Ser Leu Gly Pro
 170 175 180
 Gln Val Gly Ser Ala Lys Thr Lys Pro Leu Ile Glu Val Gly Lys
 185 190 195
 Gly Gly Pro Glu Leu Gln Ser Ala Pro Trp Thr Gly Ala Ala Ala
 200 205 210
 Ala Phe Ser Gly Gly Pro Ala Val Ala Val Arg Pro Gln Gly Ser
 215 220 225
 Leu Glu Leu His Ser Glu Gly Gly Glu Pro Ala Glu Gln Ser Leu
 230 235 240
 Gln Thr Pro Arg Ala Ala Glu Asp Gly Ala Asp Gly Pro Val Ser
 245 250 255
 Trp Val Gln Pro Ser Ile Cys Thr Ala Asn Glu Leu Met Thr Met
 260 265 270
 Ala Ser Gln Phe Leu Ala Pro Ser Pro Gly Glu Ala Met Gly Trp
 275 280 285
 Pro Cys Pro Gly Ser Ala Leu Cys Trp Gly Ser Trp Gln Ala Arg
 290 295 300
 Leu His Leu Val Thr Phe Gln Glu Arg Leu Pro His Arg Gly Cys
 305 310 315
 His Glu Pro Gly Ser Leu Cys Ser Ser Ser Gly Val Ser Trp Thr
 320 325 330
 Val Ala Gly Gly Lys Ala Val His Leu Pro Ser Glu Ser Pro Arg
 335 340 345
 Pro Ala Ser Ala Cys Tyr Val Leu Asp His Gly Leu Thr Gly Thr
 350 355 360
 Glu Gln Gly Gly Gly Leu Arg Gly Pro Cys Pro Arg Asp Val Pro
 365 370 375
 Gly Ser Gly Ser Ala Leu Arg Thr Gly Glu Pro His Cys Ala Val
 380 385 390
 Gln Gly Pro Gly Gly Ala Ala Gly Gln Asn Val Gly Thr Asn Val
 395 400 405
 Pro Trp Ala Trp Gly His Leu Leu Arg His Ser Ser Val Thr Val
 410 415 420
 Glu Lys Gly Arg Trp Ala Ser Val Ala Ser Val Lys Gln Ala Arg
 425 430 435
 Leu Ser Ser Gly His Val Trp Ser Met Ala Leu Pro Arg Gln Pro
 440 445 450
 Asp Gln Gly Asn Gly Gly Leu Ala Gly Gly Gly Val Ala Val Pro
 455 460 465
 Pro Leu Thr Ala Val Ser Leu Leu Arg Gly Val Ala Val Pro Pro
 470 475 480
 Leu Thr Ala Val Ser Leu Pro Cys Pro Val Glu Arg Cys Met Gly
 485 490 495
 Ala Met Gln Glu Gly Met Gln Met Val Lys Leu Arg Gly Gly Ser
 500 505 510
 Lys Gly Leu Val Arg Phe Tyr Tyr Leu Asp Glu His Arg Ser Cys
 515 520 525

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Ile Arg Trp Arg Pro Ser Arg Lys Asn Glu Lys Ala Lys Ile Ser
 530 535 540
 Ile Asp Ser Ile Gln Glu Val Ser Glu Gly Arg Gln Ser Glu Val
 545 550 555
 Phe Gln Arg Tyr Pro Asp Gly Ser Phe Asp Pro Asn Cys Cys Phe
 560 565 570
 Ser Ile Tyr His Gly Ser His Arg Glu Ser Leu Asp Leu Val Ser
 575 580 585
 Thr Ser Ser Glu Val Ala Arg Thr Trp Val Thr Gly Leu Arg Tyr
 590 595 600
 Leu Met Ala Gly Ile Ser Asp Glu Asp Ser Leu Ala Arg Arg Gln
 605 610 615
 Arg Thr Arg Asp Gln Tyr Pro Trp Ala Pro Ile Gly Gln Cys Arg
 620 625 630
 Pro Arg Asp Arg Pro Leu Gly Cys Ser Pro Trp Gly Gly Leu Ser
 635 640 645
 Phe Ala Gly Ser His Thr Gly Glu Val Ala Gly Gln Arg Val Glu
 650 655 660
 Trp Leu Lys Gln Thr Phe Asp Glu Ala Asp Lys Asn Gly Asp Gly
 665 670 675
 Ser Leu Ser Ile Gly Glu Val Leu Gln Leu Leu His Lys Leu Asn
 680 685 690
 Val Asn Leu Pro Arg Gln Arg Val Lys Gln Met Phe Arg Val Ala
 695 700 705
 Gly His Ala Trp Leu Glu Gln Gly Lys Leu Ala Cys Ser Gln Asp
 710 715 720
 Arg Ala Leu Val Glu Val Pro Met Gly Thr Gln Gly Leu Ala Leu
 725 730 735
 Gln Glu Ala Asp Thr Asp Asp His Gln Gly Thr Leu Gly Phe Glu
 740 745 750
 Glu Phe Cys Ala Phe Tyr Lys Met Met Ser Thr Arg Arg Asp Leu
 755 760 765
 Tyr Leu Leu Met Leu Thr Tyr Ser Asn His Lys Asp His Leu Asp
 770 775 780
 Ala Ala Ser Leu Gln Arg Phe Leu Gln Val Glu Gln Lys Met Ala
 785 790 795
 Gly Val Thr Leu Glu Ser Cys Gln Asp Ile Ile Glu Gln Phe Glu
 800 805 810
 Pro Cys Pro Glu Asn Lys Ser Lys Gly Leu Leu Gly Ile Asp Gly
 815 820 825
 Phe Thr Asn Tyr Thr Arg Ser Pro Ala Gly Asp Ile Phe Asn Pro
 830 835 840
 Glu His His His Val His Gln Asp Met Thr Gln Pro Leu Ser His
 845 850 855
 Tyr Phe Ile Thr Ser Ser His Asn Thr Tyr Leu Val Gly Asp Gln
 860 865 870
 Leu Met Ser Gln Ser Arg Val Asp Met Tyr Ala Trp Val Leu Gln
 875 880 885
 Ala Gly Cys Arg Cys Val Glu Val Asp Cys Trp Asp Gly Pro Asp
 890 895 900
 Gly Glu Pro Ile Val His His Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Lys Ile
 905 910 915
 Leu Phe Lys Asp Val Ile Glu Thr Ile Asn Lys Tyr Ala Phe Ile
 920 925 930
 Lys Asn Glu Tyr Pro Val Ile Leu Ser Ile Glu Asn His Cys Ser
 935 940 945

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Val Ile Gln Gln Lys Lys Met Ala Gln Tyr Leu Thr Asp Ile Leu
 950 955 960
 Gly Asp Lys Leu Asp Leu Ser Ser Val Ser Ser Glu Asp Ala Thr
 965 970 975
 Thr Leu Pro Ser Pro Gln Met Leu Lys Gly Lys Ile Leu Val Lys
 980 985 990
 Gly Lys Lys Leu Pro Ala Asn Ile Ser Glu Asp Ala Glu Glu Gly
 995 1000 1005
 Glu Val Ser Asp Glu Asp Ser Ala Asp Glu Ile Asp Asp Asp Cys
 1010 1015 1020
 Lys Leu Leu Asn Gly Asp Ala Ser Thr Asn Arg Lys Arg Val Glu
 1025 1030 1035
 Asn Thr Ala Lys Arg Lys Leu Asp Ser Leu Ile Lys Glu Ser Lys
 1040 1045 1050
 Ile Arg Asp Cys Glu Asp Pro Asn Asn Phe Ser Val Ser Thr Leu
 1055 1060 1065
 Ser Pro Ser Gly Lys Leu Gly Arg Lys Val Glu Ala Lys Lys Val
 1070 1075 1080
 Thr Pro Leu Met Pro Thr Gly Pro Pro Asp Ser Gln Pro Val Gly
 1085 1090 1095
 Gln Pro Gly Pro Pro Asn Arg Gly Ser Val Gln Ala Gly Pro Gly
 1100 1105 1110
 Pro Gly Trp Gly Glu Arg Ala Ala Val Gly Ala Val Cys Cys Gly
 1115 1120 1125
 Val Ala Glu Arg Arg Val Ser Val Val Met Arg Ala Thr Val Ala
 1130 1135 1140
 Ser Leu Gln Gln Cys Gly Ser Ile Gln Gly Cys Gly Arg Ser Lys
 1145 1150 1155
 Ala Glu Glu Asp Val Glu Ser Gly Glu Asp Ala Gly Ala Ser Arg
 1160 1165 1170
 Arg Asn Gly Arg Leu Val Val Gly Ser Phe Ser Arg Arg Lys Lys
 1175 1180 1185
 Lys Gly Ser Lys Leu Lys Lys Ala Ala Ser Val Glu Glu Gly Asp
 1190 1195 1200
 Glu Gly Gln Asp Ser Pro Gly Gly Gln Ser Arg Gly Ala Thr Arg
 1205 1210 1215
 Gln Lys Lys Thr Met Lys Leu Ser Arg Ala Leu Ser Asp Leu Val
 1220 1225 1230
 Lys Tyr Thr Lys Ser Val Ala Thr His Asp Ile Glu Met Glu Ala
 1235 1240 1245
 Ala Ser Ser Trp Gln Val Ser Ser Phe Ser Glu Thr Lys Ala His
 1250 1255 1260
 Gln Ile Leu Gln Gln Lys Pro Ala Gln Tyr Leu Arg Phe Asn Gln
 1265 1270 1275
 Gln Gln Leu Ser Arg Ile Tyr Pro Ser Ser Tyr Arg Val Asp Ser
 1280 1285 1290
 Ser Asn Tyr Asn Pro Gln Pro Phe Trp Asn Ala Gly Cys Gln Met
 1295 1300 1305
 Val Ala Leu Asn Tyr Gln Ser Glu Gly Arg Met Leu Gln Leu Asn
 1310 1315 1320
 Arg Ala Lys Phe Ser Ala Asn Gly Gly Cys Gly Tyr Val Leu Lys
 1325 1330 1335
 Pro Gly Cys Met Cys Gln Gly Val Phe Asn Pro Asn Ser Glu Asp
 1340 1345 1350
 Pro Leu Pro Gly Gln Leu Lys Lys Gln Leu Val Leu Arg Ile Ile
 1355 1360 1365

WO 02/16597

PCT/US01/26365

Ser Gly Gln Gln Leu Pro Lys Pro Arg Asp Ser Met Leu Gly Asp
 1370 1375 1380
 Arg Gly Glu Ile Ile Asp Pro Phe Val Glu Val Glu Ile Ile Gly
 1385 1390 1395
 Leu Pro Val Asp Cys Ser Arg Glu Gln Thr Arg Val Val Asp Asp
 1400 1405 1410
 Asn Gly Phe Asn Pro Thr Trp Glu Glu Thr Leu Val Phe Met Val
 1415 1420 1425
 His Met Pro Glu Ile Ala Leu Val Arg Phe Leu Val Trp Asp His
 1430 1435 1440
 Asp Pro Ile Gly Arg Asp Phe Ile Gly Gln Arg Thr Leu Ala Phe
 1445 1450 1455
 Ser Ser Met Met Pro Gly Tyr Arg His Val Tyr Leu Glu Gly Met
 1460 1465 1470
 Glu Glu Ala Ser Ile Phe Val His Val Ala Val Ser Asp Ile Ser
 1475 1480 1485
 Gly Lys Val Lys Gln Ala Leu Gly Leu Lys Gly Leu Phe Leu Arg
 1490 1495 1500
 Gly Pro Lys Pro Gly Ser Leu Asp Ser His Ala Ala Gly Arg Pro
 1505 1510 1515
 Pro Ala Arg Pro Ser Val Ser Gln Arg Thr Leu Arg Arg Thr Ala
 1520 1525 1530
 Ser Ala Pro Thr Lys Ser Gln Lys Pro Gly Arg Arg Gly Phe Pro
 1535 1540 1545
 Glu Leu Val Leu Gly Thr Arg Asp Thr Gly Ser Lys Gly Val Ala
 1550 1555 1560
 Asp Asp Val Val Pro Pro Gly Pro Gly Pro Ala Pro Glu Ala Pro
 1565 1570 1575
 Ala Gln Glu Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Arg Gly Lys Ala Pro
 1580 1585 1590
 Ala Ala Val Ala Glu Lys Ser Pro Val Arg Val Arg Pro Cys Val
 1595 1600 1605
 Ser Trp Thr Ala Pro Gly Leu Leu Gly Trp Pro Pro His Ala
 1610 1615

<210> 7
 <211> 1228
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7479063CB1

<400> 7
 atgccaggca tttctatgat gtggctgctt ttaacaacaa cttgtttgat ctgtggaact 60
 ttaaatgctg gtggattcct tgatttggaa aatgaagtga atcctgaggt gtggatgaat 120
 actagtgaaa tcacatctca caatggctac cccagtgaag agtatgaagt caccactgaa 180
 gatgggtata tactccttgt caacagaatt ccttatgggc gaacacatgc taggagcaaa 240
 ggtccccggc cagttgtgta tatgcagcat gccctgtttg caggacaagc ctactggott 300
 gagaattatg ccaatggaag ccttggattc cttctagcag atgcaggtta tgatgtatgg 360
 atgggaaaca gtcggggaaa caottgttca agaagacaca aaacactctc agagacagat 420
 gagaattctt ggccttttag ttttgatgaa atggcacaat atgatctccc aggagtaata 480
 gacttcattg taataaaac tggtcaggag aaattgtatt tcattggaca ttcacttggc 540
 actacaatag ggtttgtagc cttttccacc atgcctgaac tggcacaagc aatcaaatg 600
 aattttgctt tgggtctcac gatctcattc aaatatccca cgggcatttt taccagtttt 660

WO 02/16597

PCT/US01/26365

```

tttctacttc caaatcccat aatcaaggct gtttttgta ccaaaggttt otttttagaa 720
gataagaaaa cgaagatagc ttctacccaa atctgcaaca ataagatact ctggttgata 780
tgtagcgaat ttatgtcctt atgggctgga tccacaaga aaaatatgaa tcagagtcga 840
atggatgtgt atatgtcaca tgcctccact gtttcatcag tacacaecat tctgcatatg 900
aatcagcttt accactctga tgaattcaga gcttatgact ggggaaatga cgtgatabat 960
atgaaacatt acaatcagag tcatccctct atatatgacc tgaactgccat gaaagtgcct 1020
actgtatttt gggctgttgg acatgatgtc ctctgaacac ccagagatgt ggcagagata 1080
ctccctcaaa tcaagagctct tcatctcttt aagotattgc cagattgaaa ccactttgat 1140
tttgcttggg gctctgatgc ccctcaacgg atgtacagtg aatatcatagc tttaatgaag 1200
gcatactcct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1228

```

<210> 8

<211> 1143

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 7479064CB1

<400> 8

```

gagttgagaa atttctagtt gcgccatctt ttgagctgtt taaacagag catgttccac 60
tgacagttgc ctctggaagg atctggaatg cacctgaagc tcccaggact tgaagacaga 120
ctcccaaaag ctttgatcag gtttaagcaag atacagcaag agtataaatg gacaacttca 180
gatggagagt cttctagcaa agaattcga aacagcttgc agaagttaa tgcctttgga 240
aagggactgc tattttatta aggcagatcc caaatgtggc agcttttagc agcagcatgc 300
ttgatctctc ttcttggatc tatgtatggt tatgacaaga aaggaacaa tgcgaacctc 360
gaagctaatc tgaatattag ccagattatt tcttactggg gttatcctta tgaagatgat 420
gatgttacia caaaagatgg ttatatcctt ggaaktata ggattccaca tggagagaga 480
tgcccaggga ggcagctccc aaagcctgct gtgtatttgc agcatggctt aattgcattc 540
ggcagtaact ggatttgcaa cctgcccac aacagtttgg ctttcttctt ggcagatagt 600
ggttatgagc tgtgttgggg gaacaccca ggaacaactt ggtccagaaa acaccttaaa 660
ttgtcaaccg aatcaccaga atactgggcc ttcagtttgg atgagatggc taaatatgac 720
ctccagccca caatcaatct tatcatagag aaaactggac agaagcact ctactactgt 780
ggcactcac aaggcaccac catagctttt atagcatttt ctacaaccc agaactggct 840
aaaaagatta agatattttt tgcactggct ccagttgton cagttaaata caccocaaat 900
cctatgaaaa aactaaccaac cctttccagg cgagtagtta aggtgttgtt tgytgacaaa 960
atgttccacc ctacataatt gtttgccaaa ttcatgtcca ccaagttgtg caatgcaaa 1020
ctattcctgc gtatttgcag caacttcta tttactctga gtggatttga tccgcaaac 1080
ttaaatatgy taggtgtaag taattgggct tgggaaaca tttgttttgt tgcacagag 1140
tga 1143

```

<210> 9

<211> 784

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 7478088CB1

<400> 9

```

taaaggagtc actgggcca taagtctctg caaggacagc tcagagcagc tottctctcc 60
aggacacgag gatgagtttc aggttgaat aagaacact ggaacatat ataagataag 120
gataggacat gatggaacca gtgagcaacc cgagtygaac ttgcaagagg tgaccatgca 180
acatatgaaa sgcaagaaga tccatagatt tgcagcaaac gtatggctgt ctggattca 240

```

WO 02/16597

PCT/US01/26365

```

ggcagatggg gatgtgtct gtgagcttc ttagtaaaa ggaggacaag ctatttttcc 300
attagtgaga taccaggttg acgtctcac tggcagctg aagcatgca agacggagtc 360
tgaggttttc ctctgtctct ttggggagag gggagactct ggcctcagac agctgtacaa 420
atctaaatg caagttaaat ttcaaaaggg acagattgat aaatttcaag tagcagcagt 480
gtcgctggg aaactgcaga aggtgctgtt gcctgtgag gccagtgcac aatcscagta 540
ctggtactgt gaacaagtca tagtcagaga gcccgcaac acatccagat ccatotttac 600
ctgtcaaga tggcttctct tcatgtctca gggcataatt caltccgaaa ttgaacttta 660
tctcaaggt gaggattact gaaaccatca gttagaagaa gtacaagatg attttgttac 720
atctggacat catggaacac tattcccag ttttctcag aacatccct taatacttat 780
gttt 840

```

```

<210> 10
<211> 1473
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7480935CB1

```

```

<400> 10
gagttgagaa atttctagtt gcgccatctt ttgagctgtt taaaacagag catgttccac 60
tgacagttgc ctctggaagg atctggaatg cacctgaagc tcccaggact tgaagacaga 120
cctccaaaga cttggatcag gttcaagcaag atacagcaag agtataatgt gacaacttca 180
gatggagagt cttctagcaa agaattcgaa accgacttgc agaagttaa ttgcccttgg 240
aagggactgc tattttatta agcagatccc caaatgtggc agcttttagc agcagcatgc 300
tggatgcttc ttcttggatc tatgtatggt tatgacaaga aggaaacaa tgcgaacctc 360
gaagtaata tgaatattag ccagattatt tcttactggg gttatcctta tgaagatgat 420
gatgttacaa caaaagatgg ttatactctt ggaattata ggattccaca tgaagagga 480
tgcccaggga gacagctccc aaagctctgt gtgtatttgc agcatggctt aattgcatct 540
gccgtaact ggttttgcaa cctgcccaac aacagtttgg ctttctctct ggcagatagt 600
ggttatgagc tgtggttggg gaacagccga ggaacaactt ggtccagaaa acaccttaaa 660
ttgtcaocga aatcacccga atactggccc ttcagtttgg atgagatggc taaatatgac 720
cttcagccca caatcaattt tatcatagag aaaaactggc agaagcagct ctactactgt 780
ggccactcac aaggcaccac catagctttt atagcatttt ctacaaaacc agaactggct 840
aaaaagatta agtatatttt tgcactgctt ccagtttcca cagttaaata caccaaaagt 900
cctatgaaaa aactaaccaac cctttccagg cagtagtata aggtgtgttt tggtagacaa 960
atgttccacc ctacatacatt gttgacaaa ttcattgcca ccaagttgt caatgaaa 1020
ctattcctgc gtatttgcag caacttcta tttactctga tgggatttga tccgcaaac 1080
ttaaataatg gtctgttggg tgtttatttg tcaacaaac ctgcgggaac atctgttccag 1140
aattgtctgc actgggctca ggtgtttaat totgttcaag tcccaagcttt tgattgggga 1200
aacctctgatc agaacatgat gcaacttccat cagcttacac ctctttata caaacttact 1260
aagatggag ttccaacagc aatattggaat ggtggacagc acattgtggc tgatcccaag 1320
gagttgaaa atttacttcc tcaaatgctt aaccttattt attacaagct gattccaacac 1380
tacaatcagc tggattttta ccttggagag gatgcccttc aggaaattta ccaagaccta 1440
attatattga tggagaanta tttacaaat taa 1473

```

```

<210> 11
<211> 1619
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7481764CB1

```

WO 02/16597

PCT/US01/26365

```

<400> 11
cctccccaca acaacaacag caccaccaat atataatggc taaatctgtt gagcagttgc 60
catggggccag acactgtgct gagtacatgg atatgttttc ttctttaate cteacaaccc 120
ctcagatcag ccccaagcta ggctaccctt tggcaaatc acatcattat tcaatcaaga 180
gcctctgggg agaaaagtgt gaaaccaccg cctctacctt ggacacagtc cagagccetat 240
ggattctctga agagcccccct gtacctacag gaggcagcgt gagaattaaa aaggaacctg 300
aacttgggtg gaccgacctg cgttttggga cgtataccctt gagcgtgttc cagccgcaag 360
cagcatcctc cagaccocgg cgaggcatca tctctacca tggaggggoc acagtatttg 420
ggagcctgga ttgttaccat ggctctgtoa atbatctggc ccgggagact gaatctgtac 480
ttctgatgat tgggtaccgc aagctctctg accaccatcc cctctccctt ttccaagact 540
gcctgaatgc ctccattcac ttctgaagg ccttggaaac ctatggggtg gaccoccca 600
gggtgtgtgt ctgtggagaa agcgtcggag gtgcagcggg ggccgccatc acccagggct 660
tggtagggcag atcagattct ccccgatcc gggctcaggt tctgatttat ccagtgttcc 720
aggcattctg tttgcaattg ccatcctttc agcagaacca aaatgtcca ttactttccc 780
ggaagttcat ggtgacttct ctgtgtaact atctggccat tgacctctcc tggcgtgacg 840
ccacttgaaa cggcaactgt gtacccccag acgtctggag gaagtacgag aagtggctca 900
gcctcgacaa catccccaaq aaatttaaga acagaggcta ccaaccctgg tctcccgccc 960
cttttaatga agctgcctat ctagaagcca aacatagtct ggatgtagaa aattcacccc 1020
tgateagcga tgateaggtc atcgtctcgc ttctctgagg cttctctggtg agctgtgaga 1080
atgcataact ccgtgatgac agctgtctct ataagaagcg cttggaggac cagggggtcc 1140
gggtgacatg gtaaccacctg tatgatggtt ttcacggatc cattatcttt ttgtataaga 1200
aggctctctc ttcccctatg tcccgaaga ttgtgaatgc tgtagtcaat tatataaagg 1260
gcataatgata gtaaccctgg gcccggagga ggaaggggca agtatggact ctaccagaaa 1320
ccgggtgctt tagtgagttc tattttattg actaagaggg tctacatca atgcttgggg 1380
cagctgggaa gggtagaag taagctaaac gtcttgctta gtattcaaga aaatccaaac 1440
tgtgtctgtt tctctccagc actaacaatg tccattctgt gatctagcga cattctctaa 1500
cattcccatt taggtgaaat aaatatcaaa agggaaaaa aatgccttta aaatttctc 1560
aaagcccaaa catataagat ctgtgcagaa taaatgccaa caactggtca taccgtcaa 1619

```

<210> 12

<211> 6551

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 72023748C1

```

<400> 12
atggcctgct gtcaggtggt caccocaagg catcttggtc catccggggc aaetacggtc 60
gcctgggtgc tggtaggcag gctgcagagc cctgctctgc tgaagtttgc tgaacggggc 120
tgcagccgag aatctgttta ctgcagcagg tcatcgggaa gcgtttcctt ggagacatat 180
gtaggacaga actcgggaag tgaaccagag gcaaccacag aaggcccaac accgctggcg 240
ggaggcgttt tctcagggct ctgctcctgg aggtctctgg gagacagctg cagcccgag 300
actgtggcat tttctggaac acactcaggg caccocctgc tggcagcccc agaggacatg 360
gtgctgggct tctgtcggg cagcgtgtgg ggtcgcgac ccgatgggct ctgcgcggcg 420
gggtcccctg ctggtcctgg ggtcagggg acgcgggggg ccagcacagag gcccggtgtc 480
cctcggggcg tgcggtaac tgggattggc acccgccggc catggaagag cctgggcccc 540
caggtgggct cagccaagac caagccocct atcgaggttg gcaaaagtgg cctgagctg 600
cagtcagcac catggacagg ggcagctgct gctttctctg gggggcctgc agttgctgtg 660
cgtctcagag gttccctgga gttacactct gagggggggg agccagcaga acagtcttta 720
cagaactcac gtgccgccga ggacggagca gatgggcccag tgctcctggg ccagccctcc 780
atctgcacag ctaatgagct gatgcagatg gcttcccagt tctctgcaac ttctcctgga 840
gaagccatgg gctggccctg cccgggcagt gccctttgct gggggcagctg gcaggccagg 900
ctccatctgg tgacttttca ggaaggctc ccccaccgtg gctgccaaga gcctggctcc 960
ctctgcagct cctctggggt gtctctggag gtggctgggg gcaaggccgt gcaactgct 1020

```

WO 02/16597

PCT/US01/26365

```

toagagagcc ccagggcagc cagcgccctc tacgtgttgg atcatggcct cacagggaca 1080
gagcagggag gaggacttcg aggtccctgc cccagggatg tcccgggttc aggcagtget 1140
ctgaggactg gggagoccca ctgtctgtct cagggacctg ggggagcagc agggcagaat 1200
gtggggacaa acgtgccctg ggcatggggc caoctctcc cccacagctc ggtgaccctg 1260
gagaagggcc ggtggccctc tbtggccctc gtgaagcagc cccggtctgc gtcaggccat 1320
gtctggtcca tggccctccc ccgacagccg gaccaagggc acggtggcct ggtggcggga 1380
ggagtggccc tgcctccgct gacggccgtg tctctctacc gaggatggc tbtgctccc 1440
ctgacacggg tbtctctccc atgtccagtg gagcggtgca tgggtgccat gcaaggggg 1500
atcgagatgg tgaagctggg tggcggctcc aagggctggc tccgcttcta ctacctggac 1560
gagcaccgct cctgcattcc ctggagggcc tcaogcaaga acgagaaggg caagatctcc 1620
atcgactcca tccagggagt gagtgagggg cggcagctgg aggtcttcca gogctacct 1680
gacggcagct tccagcccaa ctgctgtctc agcatctacc acggcagcca ccggagctg 1740
ctgacactgg tctccaccag cagcgaggtg gcgcgacct ggtcactgg cctgcgtac 1800
ctcatggccg gcatcagcga ccagggcagc ctggctcggc gccagcgcac cagggaccaa 1860
tatccttggg cacctatcgg ycaatgcaga cccagggacc ggcccttgg ctgctcacc 1920
tggggggccc tgcctcttgc cgggtcacac actggggaaq tggccggcca gagggtggag 1980
tggctgaaac agactgttga ccagggccgac aagaacgggg atggcagcct gagcatggc 2040
gaggtctctg agctgtgca caagctcaac gtgaacctgc cccggcagag ggtgaagcag 2100
atgttcaggg tggctgtcca tgcctggctg gagcaagggc agctggcctg ctccagggac 2160
agggccctgg tccaggttgc aatggggacc caaggccttg catctcagga agcggacag 2220
gatgaccacc aagggaagct gggttttgaa gagtctctgt cctctcaaa gatgatgac 2280
accgcgggg accctctacct gctcatgctg acctacagca accacaagga ccacctggat 2340
gccgccaagc tgcagcgttc cctgcaggtg gagcagaaga tggcgggtgt gacctctgag 2400
agctgcagag acatcatcga ccagcttggc ccatgcccag aaaaacagag taaggggctg 2460
ctgggcaatg atggcttcc caactacacc agggccctg ctgggtgacat ctcaacct 2520
gagcaccacc atgtgcacca ggcactgacg cagccctgca gccactact catcactog 2580
tcccacaaca cctacctcgt gggtgaccag ctcatgtccc agtcaagggt ggacatgat 2640
gottgggtcc tgcaggttgg ctgocgtcgc gtggaggtgg actgtggga tggcccgac 2700
ggggagccca ttgtgcacca tggctacact ctgacttcca agatcctct caaagcgtc 2760
attgaaacca tcaacaata tgcctctatc aagaatgagt ecccagtgat cctgtccatc 2820
gaaaaccact gcagtgtcat ccagcagaag aanaatggcc agtatctgac tgacatcct 2880
ggggacaagc tggacctgtc atcagtgagc agtgaagatg cccacacact cccctctcca 2940
cagtgctcga agggcaagat cctcgtgag ggaagaagc tcccagccaa catcagcag 3000
gatcgggagg aaggcagagt gtctgatgg gacagctgtg atgagattga cgtgactgc 3060
aagctcctca atggggatgc atccccaat cgaagcgtg tagaanaaac tctaagagg 3120
aaactggatt cctctatcaa agagtccagc attcgggact gtgaggacc caacaacttc 3180
tccgtctcca cactgtcccc atctggaag ctgggacgca aggtgaggg caaaaaggtg 3240
acaccctgca tggccagcag ccccccgac agccagcctg tgggcccagc agggccccc 3300
aacggagcga gtgtccaggg agggcccaggt ccaggctggg gaaagcggc agcagctgga 3360
cgtgttttgt gtggcgtggc tgaagccgga gtgtctgtgg tcatgagagc tacagtgcc 3420
tctttgcagc agtgtgggag catccagggg tctgggagga gcaaggctga agaggactg 3480
gagctctggg aggtatccgg ggcacagcga cgcactggcc gcctcgtct gggaaagctc 3540
tccagggcca agaagaaggg cagcaagctg aagaagggcg ccagcgtgga gggaggagat 3600
gaggtctagg actccccggg agggccagag cagggggcga cccggcagaa gaagaccatg 3660
aagctgtccc gggccctctc tgacctgggt aagtaacca agtccgtggc caccocagc 3720
atagagatgg aggcggcgtc cagctggcag gtgtcgtctc tcagcagagc caaggccacc 3780
cagattctgc agcagaagcc ggcgcagtac ctacgttcca accagcagca gctctccgc 3840
atctaccctc cctctacagc tgtggactcc agcaactaca accccagacc cttctggaac 3900
gccggtgccc aatgggttgc cctgaaactc cagtcagagg ggcgatgct gcagctgaac 3960
cgagccaagt tcaagcccaa cggtyggctg ggctacgtac tcaagcctgg gtgcatgtg 4020
cagggcgtgt tcaaccocaa ctggagggac cccctgccc ggcagctcaa gaagcagctg 4080
gtgtccggga tcatcagtyg ccagcagctt cccaagccgc ggcactccat gctggggag 4140
cgtggggaga tcatcagacc ctttggggag gtggagatca tgggctccc tbtggactgc 4200
agcagggagc agaccggcgt ggtggagcag aacgggttca acccccactg gaggagacc 4260
ctggtttcca tgggtcacat gccggagatc ggcctgttcc gcttctcgt ctggaccac 4320
gatccccatg ggcgtgactt cattggccag agggactgtg ccttcagcag catgatgca 4380

```

WO 02/16597

PCT/US01/26365

```

ggctacagac acgtgtacct agaagggatg gaagaggcct ccatettegt gcatgtgget 4440
gtcagtgaca tcagcggtaa ggtcaagcag gctctggccc taaaaggcct ctctctcoga 4500
ggcccaaaagc cggctctgct ggacagtcac gctgctgggc ggccccggc cgggcectcc 4560
gttagccagc ggaacctgct ggcacagccc agcggccga ccaagagcca gaagcgggccc 4620
cgcaagggct tccccggact ggtcctgggt acacgggaca caggctccaa gggggtggca 4680
gacgatgtgg tgcccccggt gccggacct gctccggaag cccagacca ggaaggcccc 4740
ggcagcggca gcccccaggt taaggcgcca gctccggtgg cagaagaag cctgtgcga 4800
gtcggccctc gctgtcctg gacggccccg ggcctgctgg gatggccggc acatgcatga 4860
agtgtgtggt gggatcctgc gccggcgtga aacccggggg cctgcagagg gagcggccac 4920
ccagccccgg gctgcaagc aggcagggcag caattcgcca gcagccccgg gcccgggctg 4980
actcactggg ggcctcctgc tgtgycctgg accctcagc tatccccggg agaagcagag 5040
aggccccaaa ggttccctgg gcctggaggc aggtccagg cggtagcggc tccatgtctc 5100
cggactccag cagcccagac agccccggca tccccaaag gtccccccgc tggcctgagg 5160
gtgctctgag caaccggggg gccctgcagg gagagatgag tgcttgttt gctcaaaagc 5220
tggaggagat caggagtaaa tccccatgt tctcccgca caaccggccc ctctcaagc 5280
agcggccact cccccactg tcagcctgg aaacctcgc tgaggagccc gccccaggcc 5340
ctggtcccc gccaccagcg gctglcccca ccagctcttc tcaggagcgg cccccatcc 5400
ccacaggacc cggccaat gtgcaagcc ccttagagga cactgaggag ccccagaca 5460
gccggcctcg gccgtcaac ggcagggcg ccggcggggc atacgagag gcccccggca 5520
gccagacgga cggcaggagc cagccccgga cctggggcca cctgcccgtg attagaagg 5580
tgaagagtga gggcagggtg cccacggagc cctggggagg tgggcgccc ctggcgctc 5640
cctttccagc tctgcccgt tactccgat ccacgggcag tgaccgctg tggcagcggc 5700
tggagccatg tggccaccga gacagcgttt cctctcctc cagcatgtca tccagcaca 5760
ctgtcattga cctctccctg cccagcctgg cctggggcgc cagcctgag aacctcgtg 5820
gagccacat gggacgcctg cccccaggc cccactcggc ttgggtgcc cggccagacc 5880
tgccacctgt gaccaagagc aaatccaacc caacctteg ggctacaggc cagcggcctc 5940
ccatacctga cgaactgag cccaggtccc tggcccaag gatggtggc ctccccttc 6000
ggcctcctg gggctgctt tccctggtg gctgcaaga ctgcccgtg gctgcaagt 6060
ccaagagcct gggcagcctc actgctgat actttgccc tagctttgag gggcctccc 6120
gcagactgag ccaagcctg ggcctccggg gagggacac ggggtgtcg gggccaggg 6180
tgagacggga accctgaca ggcagctgc gctggctcac tgtctccag caggcaggag 6240
acatcacgct acccaagc ctggcccggc ctggggagg ggtggcagg gccctggtt 6300
ttgtgcggc ctctccctc gcagccaca gccgctgct tgccattgcc agccggccc 6360
gccagccca ggaagcggc cagagactgc aggcctggc ccggcaggga ccccagaag 6420
aggagcggg cccccggg ggcgctgct ccgtgggcca ctagggcagt gtggatgcac 6480
cagcaccctc caaggagcc ctggggccag catccgggc tgcgaaac ctggtcctgc 6540
tcgctctg a 6551

```

【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
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/016597 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/55, 9/20, 9/02, 1/21, C07K 16/40, C12Q 1/34, 1/68, A01K 67/027, A61K 38/46, 39/395
- (21) International Application Number: PCT/US01/26365
- (22) International Filing Date: 22 August 2001 (22.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/227,429 23 August 2000 (23.08.2000) US
60/231,370 8 September 2000 (08.09.2000) US
60/233,212 15 September 2000 (15.09.2000) US
60/236,885 29 September 2000 (29.09.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): INCYTE GENOMICS, INC. [US/US]; 3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).
- (72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): GRIFFIN, Jennifer, A. [US/US]; 33691 Mello Way, Fremont, CA 94555 (US). ARVIZU, Chandra, S. [US/US]; 1706 Morueco Drive, San Jose, CA 95125 (US). GANDHI, Ameena, R. [US/US]; 837 Roble Avenue, #1, Menlo Park, CA 94025 (US). LU, Yan [CN/US]; 3885 Corrina Way, Palo Alto, CA 94303 (US). YAO, Monique, G. [US/US]; 111 Frederick Court, Mountain View, CA 94043 (US). BAUGHN, Mariah, R. [US/US]; 14244 Santiago Road, San Leandro, CA 94577 (US). CHAWLA, Narinder, K. [US/US]; 35 Union Square, #712, Union City, CA 94587 (US). HAFALIA, April, J., A. [US/US]; 2227 Calle de Primavera, Santa Clara, CA 95054 (US). DING, Li [CN/US]; 3353 Alma Street, #146, Palo Alto, CA 94306 (US). TRIBOULEY, Catherine, M. [FR/US]; 1121 Tennessee Street, #5, San Francisco, CA 94107 (US). DAS, Debopriya [IN/US]; 1179 Bonita Avenue, #3, Mountain View, CA 94040 (US). THORNTON, Michael [US/US]; 9 Melway Road, Woodside, CA 94062 (US). LAL, Preeti [IN/US]; P.O. Box 5142, Santa Clara, CA 95056 (US).
- (74) Agents: HAMLET-COX, Diana et al.; Incyte Genomics, Inc., 3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
26 June 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/016597 A3

(54) Title: LIPID METABOLISM ENZYMES

(57) Abstract: The invention provides human lipid metabolism enzymes (LMM) and polynucleotides which identify and encode LMM. 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 LMM.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/26365
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/55 C12N9/20 C12N9/02 C12N1/21 C07K16/40 C12Q1/34 C12Q1/68 A01K67/027 A61K38/46 A61K39/395		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q A01K A61K		
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) SEQUENCE SEARCH, WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANDERSON R A ET AL: "Cloning and expression of cDNA encoding human lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 266, no. 33, 25 November 1991 (1991-11-25), pages 22479-22484, XP002192752 ISSN: 0021-9258 the whole document --- -/--	1, 3, 6-10, 13-15, 35-37
<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 (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or inventive if considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document, member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
24 October 2002	17. 01. 2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2911 Patentplan 2 N-1250 HY Brno/CZ Tel. (+31-70) 340-2000, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-0018	Authorized officer Oderwald, H	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/26365

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 86 01532 A (CELLTECH LTD) 13 March 1986 (1986-03-13) the whole document ---	1,3, 6-10, 13-16, 18,25, 29,35-37
A	WO 99 24587 A (HAWKINS PHILLIP R ; INCYTE PHARMA INC (US); CORLEY NEIL C (US); BAN) 20 May 1999 (1999-05-20) ---	
E	WO 02 36754 A (BAYER AG ; XIAO YONGHONG (US)) 10 May 2002 (2002-05-10) see SEQ ID NO: 4 and 5 page 1 -page 60; claims 1-71; figures 4,5; examples 1-9 -----	1,3, 6-16,18, 19, 22-45,51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/26365
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.: (20, 21 complete), (23, 24 partially) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependant 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.: 1-44 (partially); 45, 51 (complete)	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/26365

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 18 and 24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
Although claims 32 and 34 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: (20, 21 complete), (23, 24 partially)

Present claims 20 and 21 relate to a product/compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely an agonist of a polypeptide. Present claims 23 and 24 relate to a product/compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely an antagonist of a polypeptide. The claims cover all products/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 products/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 product/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 the product/compound antibodies (as antagonists) mentioned in the description at pages 18, 49 and 50. No search has been carried out for the product/compound agonist.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/26365

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-44 (partially); 45 and 51 (complete)

An isolated polypeptide comprising amino acid sequence SEQ ID NO: 1. An isolated polynucleotide encoding said polypeptide comprising SEQ ID NO: 7. A cell, a transgenic organism, a method of producing a polypeptide, an antibody, a method of detecting a target polynucleotide or a polypeptide, compositions, methods for treating a disease, methods for screening a compound, a method of assessing toxicity, a diagnostic test, methods of diagnosing a disease, methods of making antibodies, a method of purifying a polypeptide comprising said polypeptide or polynucleotide.

2. Claims: 1-44 (partially); 46 and 52 (complete)

same as invention 1 but comprising SEQ ID NO: 2 and 8.

3. Claims: 1-44 (partially); 47 and 53 (complete)

same as invention 1 but comprising SEQ ID NO: 3 and 9.

4. Claims: 1-44 (partially); 48 and 54 (complete)

same as invention 1 but comprising SEQ ID NO: 4 and 10.

5. Claims: 1-44 (partially); 49 and 55 (complete)

same as invention 1 but comprising SEQ ID NO: 5 and 11.

6. Claims: 1-44 (partially); 50 and 56 (complete)

same as invention 1 but comprising SEQ ID NO: 6 and 12.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/26365

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8601532 A	13-03-1986	AT 55414 T	15-08-1990
		DE 3579148 D1	13-09-1990
		EP 0191061 A1	20-08-1986
		WO 8601532 A1	13-03-1986
		GB 2176489 A ,B	31-12-1986
		JP 2514167 B2	10-07-1996
		JP 6315387 A	15-11-1994
		JP 8029081 B	27-03-1996
		JP 61503035 T	25-12-1986
		US 5691181 A	25-11-1997
		US 5858755 A	12-01-1999
WO 9924587 A	20-05-1999	US 6103469 A	15-08-2000
		AU 1382099 A	31-05-1999
		WO 9924587 A2	20-05-1999
		US 2002177208 A1	28-11-2002
		US 6399301 B1	04-06-2002
WO 0236754 A	10-05-2002	AU 2175502 A	15-05-2002
		WO 0236754 A2	10-05-2002

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 25/00	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/00	C 0 7 K 16/40	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/40	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 16/46	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 9/00	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/20	
C 1 2 N 9/00	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 9/20	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 33/53	N
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(31)優先権主張番号 60/236,885

(32)優先日 平成12年9月29日(2000.9.29)

(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,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,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

- (72)発明者 パターソン、チャンドラ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 2 5・メンロパーク・# 1・シャーウッドウェイ 4 9 0
- (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 0 2 5・メンロパーク・# 1・ローブルアベニュー 8 3 7
- (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 ヤオ、モニーク・ジー
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 4 3・マウンテンビュー・フレデリックコート 1 1 1
- (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・サニーベイル・サンティアゴロード 1 4 2 4 4
- (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 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・コーレデプリマベール 2 2 2 7
- (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 トリボレー、キャサリン・エム
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 0 7 ・ サンフランシスコ ・ # 5 ・ テネシーストリート 1
 1 2 1
- (72)発明者 ダス、デボプリヤ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 0 ・ マウンテンビュー ・ # 3 ・ ボニータアベニュー 1
 1 7 9
- (72)発明者 ソートン、マイケル
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 6 2 ・ ウッドサイド ・ メッドウェイロード 9
- (72)発明者 ラル、ブリーティ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 6 ・ サンタクララ ・ ピーオーボックス 5 1 4 2

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB46 BB48 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03 FB07
 FB08 FB12 GC15
 4B024 AA01 AA11 BA07 BA11 BA44 CA01 CA11 GA11 GA18 HA04
 HA13
 4B050 CC01 DD11 EE10 LL01 LL03
 4B063 QA18 QA19 QA20 QQ02 QQ08 QQ42 QQ79 QQ96 QR32 QR48
 QR56 QS33 QS34 QX01
 4B064 AG27 CA20 CC24 CE13 DA01 DA13
 4B065 AA93Y AB04 AC14 BA01 BA08 CA25 CA31 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA17 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 NA14 ZA012 ZA362
 ZA662 ZB072 ZB262
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 DA89 EA20 EA50 FA74
 GA20

专利名称(译)	脂质代谢酵素		
公开(公告)号	JP2004527216A	公开(公告)日	2004-09-09
申请号	JP2002522270	申请日	2001-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	グリフィンジェニファーエイ パターソンチャンドラ ガンディーアミーナアール リュヤン ヤオモニークジー ボーグンマライアアール チョーラナリンダーケイ ハファリアエープリルジェイエイ ディングリー トリボレーキャサリーンエム ダステポプリヤ ソーントンマイケル ラルプリーティ		
发明人	グリフィン、ジェニファー・エイ パターソン、チャンドラ ガンディー、アミーナ・アール リュ、ヤン ヤオ、モニーク・ジー ボーグン、マライア・アール チョーラ、ナリンダー・ケイ ハファリア、エープリル・ジェイ・エイ ディング、リー トリボレー、キャサリーン・エム ダス、デポプリヤ ソーントン、マイケル ラル、プリーティ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/00 C07K16/40 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12N9/20 C12N15/09 C12N15/55 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P25/00 C12N9/20		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P1/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/00 C07K16/40 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12N9/20 C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15. Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.N G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB46 2G045/BB48 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045 /FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/BA11 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024 /HA04 4B024/HA13 4B050/CC01 4B050/DD11 4B050/EE10 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063 /QR32 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE13 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93Y 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065 /BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA31 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA17		

4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA362 4C084/ZA662 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA20

優先権
60/227429 2000-08-23 US
60/231370 2000-09-08 US
60/233212 2000-09-15 US
60/236885 2000-09-29 US

外部リンク Espacenet

摘要(译)

本发明提供了人脂质代谢酶 (LMM) 和鉴定和编码LMM的多核苷酸。本发明还提供表达载体，宿主细胞，抗体，激动剂和拮抗剂。本发明还提供了用于诊断，治疗或预防与LMM异常表达有关的疾病的方法。

4と5を参照)。。

接頭コード	解析タイプマプログラムの例
GNN, GPG, ENST	例えば、GENSCAN (Stanford University, CA, USA) または PCGENES (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 予想ゲノム位置と EST 組成物データを結合して、エキソンと生 じる転写を予想する。