

(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2004-500813

(P2004-500813A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 3
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 3/10	4 B O 6 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 7/06	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 242 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-547165 (P2001-547165)	(71) 出願人	301005050
(86) (22) 出願日	平成12年12月21日 (2000.12.21)		インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成14年6月21日 (2002.6.21)		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) 国際出願番号	PCT/US2000/034919		
(87) 国際公開番号	W02001/046256	(74) 代理人	100089266
(87) 国際公開日	平成13年6月28日 (2001.6.28)		弁理士 大島 陽一
(31) 優先権主張番号	60/172,968	(72) 発明者	タング、ワイ・トム
(32) 優先日	平成11年12月21日 (1999.12.21)		アメリカ合衆国カリフォルニア州95118・サンノゼ・ランウィックコート 4230
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/172,066		
(32) 優先日	平成11年12月23日 (1999.12.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 小胞輸送タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、小胞輸送タンパク質 (V E T R P) と、V E T R P を同定及びコードするポリヌクレオチドとを提供する。本発明はまた、発現ベクター及び宿主細胞、抗体、アゴニスト、アンタゴニストを提供する。更に、本発明は、V E T R P の発現に関連する疾患の診断・治療・予防方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離されたポリペプチドであって、

(a) SEQ ID NO: 1 乃至 SEQ ID NO: 23 (SEQ ID NO: 1-23) からなる群から選択されたアミノ酸配列と、

(b) SEQ ID NO: 1-23 からなる群から選択されたアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、

(c) SEQ ID NO: 1-23 からなる群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、

(d) SEQ ID NO: 1-23 からなる群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする単離されたポリペプチド。 10

【請求項 2】

SEQ ID NO: 1-23 からなる群から選択された請求項 1 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: 24-46 からなる群から選択された請求項 4 の単離されたポリヌクレオチド。 20

【請求項 6】

請求項 3 のポリヌクレオチドに機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 6 の組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞。

【請求項 8】

請求項 6 の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物。

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

(b) そのように発現したポリペプチドを回収するステップとを含むことを特徴とする請求項 1 のポリペプチドの生産方法。

【請求項 10】

請求項 1 のポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 11】

単離されたポリヌクレオチドであって、 40

(a) SEQ ID NO: 24-46 からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列と、

(b) SEQ ID NO: 24-46 からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも 70% の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、

(c) 前記 (a) に相補的なポリヌクレオチド配列と、

(d) 前記 (b) に相補的なポリヌクレオチド配列と、

(e) 前記 (a) 乃至 (d) の RNA 等価物とで構成される群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 11 のポリヌクレオチドの少なくとも 60 個の連続するヌクレオチドを含む単離さ 50

れたポリヌクレオチド。

【請求項 1 3】

サンプルにおいて、請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、

(a) 前記サンプルをプローブでハイブリダイズするステップであって、前記プローブが、前記サンプル内の前記標的ポリヌクレオチドと相補的な配列を含む少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含み、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片との間でハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする、該ステップと、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体が存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含むことを特徴とする標的ポリヌクレオチドの検出方法。 10

【請求項 1 4】

前記プローブが少なくとも 60 個の連続するヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

サンプルにおいて、請求項 1 1 のポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドを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ステップと、 20

(b) 増幅された前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含むことを特徴とする標的ポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項 1 6】

有効量の請求項 1 のポリペプチド及び医薬的に容認できる賦形剤を含む組成物。

【請求項 1 7】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1-23 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項 1 6 の組成物。

【請求項 1 8】

機能的な VETRP (新規の小胞輸送タンパク質) 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 1 6 の組成物を投与することを 30
含むことを特徴とする治療方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 のポリペプチドのアゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(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 2 0】

請求項 1 9 のスクリーニング方法によって同定されたアゴニスト化合物及び医薬的に容認 40
できる賦形剤を含む組成物。

【請求項 2 1】

機能的な VETRP 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 2 0 の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 のポリペプチドのアンタゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(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 50

とするスクリーニング方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 のスクリーニング方法によって同定されたアンタゴニスト化合物及び医薬的に容認できる賦形剤を含む組成物。

【請求項 2 4】

機能的な V E T R P の過剰な発現に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項 2 3 の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 のポリペプチドに特異的に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、 10

(a) 請求項 1 のポリペプチドを好適な条件下で少なくとも 1 つの試験化合物と結合させるステップと、

(b) 請求項 1 のポリペプチドと前記試験化合物との結合を検出して、請求項 1 のポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 のポリペプチドの活性を変化させる化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 1 のポリペプチドを、その活性が許容される条件下で少なくとも 1 つの試験化合物と結合させるステップと、

(b) 前記試験化合物の存在下での請求項 1 のポリペプチドの活性を評価するステップと 20

(c) 前記試験化合物の存在下での請求項 1 のポリペプチドの活性と、前記試験化合物の不在下での請求項 1 のポリペプチドの活性とを比較するステップとを含み、

前記試験化合物の存在下での請求項 1 のポリペプチドの活性の変化が、請求項 1 のポリペプチドの活性を変化させる化合物の存在を示唆すること特徴とするスクリーニング方法。

【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、 30

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップと、

(c) 様々な量の前記化合物の存在下での前記標的ポリヌクレオチドの発現と、前記化合物の不在下での前記標的ポリヌクレオチドの発現とを比較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 2 8】

試験化合物の毒性を評価する方法であって、

(a) 核酸を含む生体サンプルを前記試験化合物で処理するステップと、

(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) 前記処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量を、未処理の生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量と比較するステップとを含み、

前記処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量の差が試験化合物の毒性を示唆すること特徴とする試験化合物の毒性評価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、小胞輸送タンパク質の核酸配列及びアミノ酸配列に関する。本発明はまた、小胞輸送障害、自己免疫／炎症性の疾患、および癌の診断・治療・予防へのこれらの配列の使用に関する。本発明はさらに、小胞輸送タンパク質の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の効果についての評価に関する。

【0002】

(発明の背景)

真核細胞は脂質二重層膜によって結合され、機能が異なる膜結合型区画に細分されている。膜はサイトゾル、細胞外の環境、及び各細胞内オルガネラの内腔空間間の本質的な相違を保持する。脂質膜は大部分の極性分子に対して高い不浸透性があるので、必要な栄養素、代謝老廃物、細胞シグナル物質、生体高分子、及び脂質膜を通りオルガネラ間を行き来するタンパク質の輸送は、様々な輸送関連分子によって仲介されなければならない。

【0003】

膜内在性タンパク質、分泌タンパク質、及びオルガネラ内腔へのタンパク質は小胞体（ER）内で合成され、翻訳後の処理と識別のためにゴルジ体に運ばれ、そして細胞内及び細胞外の特定の目的地に輸送される。材料は細胞外からエンドサイトーシスによって内部に取り入れられる。前記エンドサイトーシスはニューロン、代謝物、細胞増殖シグナルの伝達；多くの必須栄養素の摂取；及びオルガネラへの侵略に対しての防御に必要なプロセスである。この細胞内及び細胞外のタンパク質分子の移動は小胞輸送と呼ばれている。輸送はタンパク質分子を、ドナーオルガネラ膜から発生し、ターゲットの膜と融合した特定の小胞体の中に包みこむことで成し遂げられる（R o t h m a n, J. EとF. T. W i e l a n d（1996）S c i e n c e 272:227-234）。

【0004】

ER膜を通るタンパク質の輸送は、細菌、酵母、及び哺乳類で類似なプロセスを含んでいる（G o r l i c h, D. 他（1992）C e l l 71:489-503）。哺乳動物のシステムでは、成長する新生ポリペプチドのシグナル配列を認識し、ポリペプチド及びそのリボソーム複合体をER膜にあるSRP受容体を通してERと結合させる細胞質シグナル認識粒子（SRP）の活動により輸送が開始される。このシグナルペプチドは切断され、リボソーム複合体が、付着したポリペプチドと一緒に、膜と結合する。このポリペプチドは、その後ER膜を通り小胞体の中に移行される（B l o b e l, G. とB. D o b b e r s t e i n（1975）J. C e l l B i o l. 67:852-862）。

【0005】

酵母のER膜を通るポリペプチドの移行に関係しているタンパク質にはSEC61p、SEC62p、及びSEC63pが含まれる。これらのタンパク質をコードする遺伝子の突然変異は、移行プロセスの異常をもたらした。SEC61pは特に重要かも知れない。なぜならば、このタンパク質に対する遺伝子の一定の突然変異によって多くのタンパク質の移行が阻害されるからである（G o r l i c h, 前出）。

【0006】

酵母のSEC61の哺乳動物相同体（mSEC61）は、イヌとラットで同定されている。哺乳動物のSEC61は、細菌の細胞質膜移行タンパク質SECYpとも構造的に類似している。mSEC61は膜結合リボソームと密接な関連があることが分かっている。この関連は新生ポリペプチド鎖の膜ターゲッティングによって誘発され、リボソームのその成分サブユニットへの分離によって弱められる。mSEC61は、リボソームによる翻訳完了に続いて新生ポリペプチドが運ばれる、ER膜中にある複数のタンパク質透過チャネルのコンポーネントであると仮定されている（G o r l i c h, 前出）。

【0007】

分泌及びエンドサイトーシスの経路に沿っての物質の輸送でのいくつかのステップは、輸送小胞の形成を必要とする。特に、移行型小胞体（tER）、ゴルジ槽の縁、トランスゴルジ網（TGN）の表面、形質膜（PM）、及びエンドソームの管状拡張で小胞形式とな

る。ドナーオルガネラからある膜領域が離れ、出芽すると小胞形成が生じる。この膜結合小胞体は、輸送するタンパク質を含み、タンパク膜で囲まれており、サイトゾルから補充されるコンポーネントを含む。ドナーオルガネラから小胞体が出芽すると小胞形成が始まる。初期の発達及びコーティングプロセスは、サイトゾルの *ras*-様 GTP 結合タンパク質、ADP リボシル化因子 (Arf)、及びアダプタータンパク質 (AP) によって制御されている。Arf 及び AP の両方の異なるアイソフォームは出芽の異なる部位を含んでいる。例えば、ゴルジの出芽のために Arf 1、3、及び 5 が必要で、エンドソームの出芽のためには Arf 4 が必要で、細胞膜の出芽のためには Arf 6 が必要となる。コートタンパク質の二つの異なるクラスも同定されている。小胞体のクラスリンコート形状は TGN 及び PM からもたらされ、他方で、小胞体のコートマーコート (COP) 形状は ER 及びゴルジよりもたらされる (Mellman, I. (1996) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 576-625)。

10

【0008】

ドナー膜内の荷物であるタンパク質とアダプタータンパク質 (AP) が相互作用し、クラスリンが出芽部位に補充されると小胞体形成が始まる。AP は二つの大きい鎖 (a、g、d、若しくは e、及び b)、中位の大きさの鎖 (m)、及び小さい鎖 (s) から構成されるヘテロ四量体の複合体である。クラスリンは、b-アダプチンサブユニットのカルボキシ末端付加ドメインを介して AP と結合する (Le Bourgne, R. と B. Hflack (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 499-503)。AP-1 は、TGN 及びエンドソームからエンドソームの／リソソームのシステムの区画へのタンパク質のソーティング (細胞選別) として機能する。AP-2 は形質膜でクラスリン-媒介エンドサイトーシスとして機能し、他方で AP-3 はエンドソーム及び／又は TGN と関連しており、リソソーム及びリソソーム関連オルガネラの輸送のための膜内在性タンパク質の補充をする。最近、単離された AP-4 複合体は TGN 若しくは近隣区画に局在化し、後ゴルジ (post-Golgi) 区画で生じると考えられているソーティングイベントで役割を果たしている可能性がある (Dell'Angelica, E. C. 他 (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 7278-7285)。サイトゾル GTP-結合 Arf もその形状で小胞体に組み入れられている。他の GTP-結合タンパク質であるダイナミンは形成小胞体のくびれの周りのリング複合体の形状であり、小胞体をドナー膜から遊離させるのに必要なメカノケミカルな力を提供する。コートされた小胞複合体は次に、サイトゾルを通して輸送される。輸送プロセスの間、Arf-結合 GTP は GTP に加水分解され、コートは輸送小胞体から分離される (West, M. A. 他 (1997) *J. Cell Biol.* 138: 1239-1254)。

20

30

【0009】

コートタンパク質 (COP) のコートは ER 及びゴルジ上に形成される。さらに、COP コートはゴルジから ER への逆行性の往来に含まれる COP I や、ER からゴルジへの順行性の往来に含まれる COP II と区別される得る。この COP コートは主要な二つのコンポーネント、GTP 結合タンパク質 (Arf 又は Sar) 及びコートプロトマー (コートマー) から成る。コートマーは、名称が α 、 β 、 β' 、 γ 、 δ 、 ϵ 、及び ζ -COP である 7 つのタンパク質の等モル複合体である。このコートマー複合体は、膜内在性タンパク質の細胞質の尾部に含まれるディリシン (dilysine) モチーフと結合している。これらは、ER の膜タンパク質のディリシン-含有の抽出モチーフ及び p24 ファミリーのメンバーの 2 塩基/ジフェニルアミンモチーフを含む。I 型膜タンパク質のこの p24 ファミリーは COP I 小胞体の主要な膜タンパク質に相当する (Harter, C. と F. T. Wieland (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11649-11654)。

40

【0010】

小胞体はホモ型若しくはヘテロ型融合を生じる可能性がある。適切なターゲティング及び小胞体の融合に必要な分子は、ターゲットの膜、小胞体の膜中のタンパク質、及びサイト

50

ゾルから補充されたタンパク質中のタンパク質を含んでいる。ドナー区画からの小胞体の出芽の間、膜内在性タンパク質であるVAMP（小胞体関連膜タンパク質）は小胞体に組み入れられる。小胞体の脱コートの後すぐに、サイトゾルのプレニル化-GTP結合タンパク質Rabは小胞体の膜の中に挿入される。Rabタンパク質のこのアミノ酸配列は、Rasスーパーファミリーメンバーの保存GTP-結合ドメインの特性を示す。小胞体膜の中で、GTP結合RabはVAMPと相互作用する。いったん小胞体がターゲットの膜に到着すれば、ターゲット膜中のGTPアーゼ活性化タンパク質（GAP）がRabタンパク質をGDP結合型に変える。次に、サイトゾルタンパク質であるグアニンヌクレオチド解離抑制因子（GDI）は小胞体膜からGDP結合Rabを取り除く。いくつかのRabアイソフォームが同定され、細胞内の特定の区画と関連していると思われる。例えば、Rabs 4、5及び11は前期エンドソームに関係しており、それに対し、Rabs 7及び9は後期エンドソームと関係している。これらの違いは、小胞体とそのターゲット膜との間の関係において選択性を提供し得る（Novic, P. とM. Zerial (1997) *Cur. Opin. Cell Biol.* 9: 496-504)。

10

20

30

40

50

【0011】

輸送小胞体とターゲット膜のドッキングは、小胞体SNARE受容体（v-SNARE）、ターゲット膜（t-SNARE、及び他のなんらかの膜及びサイトゾルタンパク質の間の複合体の形成を含んでいる。これら他のタンパク質の多くは同定されているが、ドッキング複合体におけるそれらの正確な働きははっきり分からないまま残っている（Teillac, J. T. 他 (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 5857-5863; Hata, Y. とT. C. Sudhof (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 13022-13028)。N-エチルマレイミド感受性因子（NSF）及び可溶性NSF-付着タンパク質（ α -SNAP及び β -SNAP）は酵母から人へと進化の過程で保存され、細胞内の膜の融合作用の大部分で機能する二つのタンパク質である。Sec1は、膜融合を含む分泌経路の多くの異なる段階で機能する酵母タンパク質のファミリーに相当する。最近になって、Munc-18タンパク質と呼ばれるSec1の哺乳動物相同体が同定された（Katagiri, H 他 (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 4963-4966; Hata 他前出）。

【0012】

SNARE複合体は三つのSNARE分子を含み、一つは小胞膜中にあり、二つはターゲット膜中にある。それらが一緒になり、四つの α ヘリックスコイルドコイルの杆状複合体を形成する。膜が、杆状体の一端から突き出たSNAREの三つ全てのドメインをつなぎ留める。この複合体は、ミクソウイルス、インフルエンザ、フィロウイルス（エボラ）、及びHIVやSIVレトロウィルスのような被膜ウィルスの特性である融合タンパク質によって形成された杆状様構造と類似している（Skehel, J. J. とD. C. Wiley (1998) *Cell* 95: 871-874)。このSNARE複合体が膜融合に十分であるという提案がなされており、それによりこの複合体に関連するタンパク質が融合イベントの制御を提供していると示している（Weber, T. 他 (1998) *Cell* 92: 759-772)。例えば、制御されたエキソサイトーシスを示すニューロンでは、ドッキングした小胞体は、カルシウムの流入が導かれる脱分極までシナプス前部の膜と融合しない（Bennett, M. K. とR. H. Scheller (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63: 63-100)。シナプス小胞体の膜内在性タンパク質であるシナプトタグミンはドッキング複合体の中のt-SNAREシンタキシンと関連がある。シナプトタグミンは、複合体中のカルシウムを負電荷を帯びたリン脂質と結びつけ、それによりサイトゾルのSNAPタンパク質がシンタキシンからシナプトタグミンを外し、融合が生じ得る。そのようにして、シナプトタグミンはニューロンの中の融合の負の制御因子である（Littleton, J. T. 他 (1993) *Cell* 74: 1125-1134)。シナプス小胞体で最も豊富にある膜タンパク質は4回膜貫通ドメインを伴った38kDaタンパク質である糖タンパク質シナプトフィジンであると思われる。シナプトフィジンの機能はよく知られていないが、チロシンリン酸化

反応というそのカルシウム結合性能と、神経組織中に広く行き渡っての分布は神経分泌での潜在的な役割を示唆している（Bennett, 前出）。

【0013】

小胞体から、及び中へのタンパク質の輸送は、スペクトリン及び他のタンパク質から成る膜支持の細胞骨格と細胞膜との間の相互作用に基づいている。アンキリンと呼ばれる関連タンパク質のラージファミリーは、細胞膜裏打ちタンパク質スペクトリンと陰イオンチャネル中のコンポーネントであるバンド3と呼ばれる細胞膜中のタンパク質への結合で、輸送プロセスに関係がある。それゆえに、アンキリンは細胞骨格と細胞膜の間の重要なリンクとして機能する。

【0014】

当初は、赤血球系細胞関連で見つけられたが、他の細胞でも同様にアンキリンが見つけられている（Birkenmeier, C. S. 他（1993）J. Biol. Chem. 268:9533-9540）。アンキリンは、N-末端、細胞膜タンパク質バンド3とチューブリンを結合する89kDaドメイン、細胞骨格のタンパク質スペクトリンとビメンチン及びC-末端とを結合する中央の62kDaドメイン、他の二つのドメインの結合活動の変更因子として機能する調節ドメイン55kDaを含む大きなタンパク質（～1800アミノ酸）である。様々な挿入や欠失により、アンキリンの個々の遺伝子の複数のアンキリンアイソフォームを製造することが可能である。これらのアイソフォームはほぼ同じサイズであるが、異なる機能を持っている。さらに、N-末端（バンド3結合）及び中央（スペクトリン結合）ドメインからのコード化配列の大きな領域を失ったより小さな転写を生じる。そのようなアンキリンタンパク質のラージファミリーの存在と、同じ細胞内に二つ以上の型のアンキリンが発現し得るという観察結果より、アンキリンは単に細胞骨格を形質膜とを結合するだけでなく、もっと特殊な機能を持っている可能性があると考えられる（Birkenmeier, 前出）。

【0015】

ヒトの場合、赤血球及び成熟赤血球がそれぞれ発生する代わりに、アンキリンの二つのアイソフォームが発現する（Lambert, S. 他（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1730-1734）。赤血球のスペクトリン及びアンキリンの欠失は、溶血性貧血と遺伝性球状赤血球症と関連している（Coetzer, T. L. 他（1988）New Engl. J. Med. 318:230-234）。

【0016】

タンパク質の正確な往来は、明白な頂膜部分と、脂質や膜関連タンパク質のような異なる細胞膜コンポーネントを含む側底ドメインに分極した上皮細胞が適切に機能するために特別重要である。あるタンパク質は融通性があり、細胞の型若しくは成長状況に依存して側底側又は頂膜側にソーティングされ得る。例えば、腎臓陰イオン交換体（kAE1）は、細胞が高い密度で覆われると頂膜部分から側底ドメインへとターゲットを変えることが可能である。タンパク質カナダプチン（kanadapatin）はkAE1の細胞質ドメインに結合するタンパク質として単離された。それは小胞体中でkAE1と共存もするが、膜の中ではそうでなく、それによりカナダプチンの機能はkAE1-含有小胞体を側底部ターゲット膜へ導くことだと考えられる（Chen, J. 他（1998）J. Biol. Chem. 273:1038-1043）。

【0017】

小胞体輸送は神経伝達のプロセスできわめて重要である。シナプス小胞体は神経伝達物質の分子をニューロンの細胞質からシナプスへと運ぶ。Rab3はシナプス小胞体にあるGTP-結合タンパク質のファミリーである。タンパク質のRIMファミリーはRab3のエフェクターであると考えられている（Wang, Y. 他（2000）J. Biol. Chem. 275:20033-20044）。Rabphilin-3はシナプス小胞体タンパク質である。グラニューフィリン（granuphilin）はラプフィリンと相同なタンパク質であり、エキソサイトーシスで特異な役割を持っている可能性がある（Wang, J. 他（1999）J. Biol. Chem. 274:28542-2854

10

20

30

40

50

8)。

【0018】

ヒトの多くの疾病及び疾患の原因は、オルガネラ若しくは細胞表面へのタンパク質輸送の異常に帰することができる。膜結合受容体やイオンチャネルの往来の障害が、嚢胞性線維症（嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子；CFTR）、グルコース-ガラクトース吸収不全症候群（ Na^+ /グルコース共輸送体）、高コレステロール血症（低密度リポタンパク質（LDL）受容体）、及び糖尿病の形態（インシュリン受容体）と関連している。ホルモン分泌異常は、尿崩症（バソプレシン）、高血糖症と低血糖症（インシュリン、グルカゴン）、甲状腺機能亢進症と甲状腺腫（甲状腺ホルモン）、及びクッシング病とアディソン病（副腎皮質刺激ホルモン；ACTH）に結びついている。

10

【0019】

癌細胞は過剰な量のホルモンや他の生理活性ペプチドを分泌する。疾患は含まれる腫瘍細胞による生理活性ペプチドの過剰分泌に関連している：インシュリノーマ島細胞腫瘍からのインシュリン分泌の増加による空腹時低血糖；副腎髄質の好クローム性細胞腫や交感神経性傍神経節腫から分泌されるエピネフリン及びノルエピネフリンの増加による高血圧；及び内包された腫瘍から過剰な量の血管作用性物質（セロトニン、ブラジキニン、ヒスタミン、プロスタグランジン、及びポリペプチドホルモン）が分泌されたことによって生じた、腹部痙攣と下痢と弁膜性心疾患を含むカルチノイド症候群。生理活性ペプチド（腫瘍からでないと考えられるペプチド）の分泌及び異所性合成には、肺癌及び膵臓癌でのバソプレシンとACTH；肺癌及び膀胱癌での副甲状腺ホルモン；肺癌及び乳癌でのカルシトニン；及び甲状腺の髄様癌での甲状腺刺激ホルモンが含まれる。

20

【0020】

ヒトの様々な病原体は、宿主細胞のタンパク質輸送経路を自分達自身の有利になるように作り変える。例えばHIVタンパク質Nefは、クラスリンでコートされた孔を通してのそれらのエンドサイトーシスを加速することで、CD4分子の細胞表面での発現を減少させる。Nefのこの機能は、感染した細胞からHIVを蔓延させるのに重要である（Harris, M. (1999) Curr. Biol. 9:R449-R461）。最近同定されたヒトのタンパク質であるNef-関連要因（Naf1）は四つの延長したコイルドコイルドメインを有するタンパク質で、Nefと関連があることが判明している。Naf1の過剰発現により、CD4分子の細胞表面での発現が増加されたが、この効果がNefによって抑制されている可能性がある（Fukushi, M. 他 (1999) FEBS Lett. 442:83-88）。

30

【0021】

新規の小胞輸送タンパク質、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、小胞輸送障害、自己免疫／炎症性の疾患、および癌の診断・治療・予防において有用であり、また、小胞輸送タンパク質の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の効果についての評価にも有用である。

【0022】

（発明の要約）

40

本発明は、総称して「VETRP」、個別にはそれぞれ「VETRP-1」、「VETRP-2」、「VETRP-3」、「VETRP-4」、「VETRP-5」、「VETRP-6」、「VETRP-7」、「VETRP-8」、「VETRP-9」、「VETRP-10」、「VETRP-11」、「VETRP-12」、「VETRP-13」、「VETRP-14」、「VETRP-15」、「VETRP-16」、「VETRP-17」、「VETRP-18」、「VETRP-19」、「VETRP-20」、「VETRP-21」、「VETRP-22」、及び「VETRP-23」と呼ぶ精製されたポリペプチドである小胞輸送タンパク質を提供する。本発明の一実施態様では、（a）SEQ ID NO: 1乃至23（SEQ ID NO: 1-23）からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、（b）SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたアミノ酸

50

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と、(c) SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO: 1-23とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択された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。別法では、SEQ ID NO: 1-23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。

【0023】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO: 1-23からなる一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と、(c) SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたポリペプチドをコードする。別法では、このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 24-46からなる一群から選択される。

【0024】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO: 1-23からなる一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と、(c) SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供する。別法では、本発明は、この組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を提供する。更なる別法では、本発明は、この組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物を提供する。

【0025】

また、本発明は、(a) SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO: 1-23からなる一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と、(c) SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO: 1-23とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドの生産方法を提供する。この方法は、(a) このポリペプチドの発現に好適な条件下で、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養するステップと、(b) このように発現したポリペプチドを回収するステップとを含む。

【0026】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO: 1-23からなる一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と、(c) SEQ ID NO: 1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO: 1-23とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体を提供する。

【0027】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO: 24-46からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(b) SEQ ID NO: 24-46からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と70%以上の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と

、（c）前記（a）に相補的なポリヌクレオチド配列と、（d）前記（b）に相補的なポリヌクレオチド配列と、（e）前記（a）乃至（d）のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む。

【0028】

更に本発明は、（a）SEQ ID NO：24-46からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、（b）SEQ ID NO：24-46からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と70%以上の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、（c）前記（a）に相補的なポリヌクレオチド配列と、（d）前記（b）に相補的なポリヌクレオチド配列と、（e）前記（a）乃至（d）のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプルにおいて検出する方法を提供する。この方法は、（a）前記サンプル内の標的ポリヌクレオチドと相補的な配列を構成する少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むプローブと前記サンプルをハイブリダイズさせるステップであって、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片とでハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で、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、該ステップと、（b）前記ハイブリダイゼーション複合体の存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含む。別法では、前記プローブは、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む。

10

【0029】

更に本発明は、（a）SEQ ID NO：24-46からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、（b）SEQ ID NO：24-46からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と70%以上の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、（c）前記（a）に相補的なポリヌクレオチド配列と、（d）前記（b）に相補的なポリヌクレオチド配列と、（e）前記（a）乃至（d）のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプルにおいて検出する方法を提供する。この方法は、（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ステップと、（b）増幅された前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含む。

20

30

【0030】

更に本発明は、（a）SEQ ID NO：1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、（b）SEQ ID NO：1-23からなる一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と、（c）SEQ ID NO：1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、（d）SEQ ID NO：1-23とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含む効果的な量のポリペプチド及び好適な医薬用賦形剤を含む組成物を提供する。一実施例では、SEQ ID NO：1-23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VETRP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。

40

【0031】

更に本発明は、（a）SEQ ID NO：1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、（b）SEQ ID NO：1-23からなる一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と、（c）SEQ ID NO：1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、（d）SEQ ID NO：1-23とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドのアゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、（a）このポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、（b）このサンプルのアゴニスト活性を検

50

出するステップとを含む。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 V E T R P 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。

【0032】

更に、本発明は、(a) S E Q I D N O : 1 - 2 3 からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) S E Q I D N O : 1 - 2 3 からなる一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と、(c) S E Q I D N O : 1 - 2 3 からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) S E Q I D N O : 1 - 2 3 とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドのアンタゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a) このポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b) このサンプルのアンタゴニスト活性を検出するステップとを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアンタ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 V E T R P 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。

10

【0033】

更に本発明は、(a) S E Q I D N O : 1 - 2 3 からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) S E Q I D N O : 1 - 2 3 からなる一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と、(c) S E Q I D N O : 1 - 2 3 からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) S E Q I D N O : 1 - 2 3 とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a) このポリペプチドを好適な条件下で少なくとも 1 つの化合物と結合させるステップと、(b) このポリペプチドとこの試験化合物との結合を検出して、このポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定するステップとを含む。

20

【0034】

更に本発明は、(a) S E Q I D N O : 1 - 2 3 からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) S E Q I D N O : 1 - 2 3 からなる一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と、(c) S E Q I D N O : 1 - 2 3 からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) S E Q I D N O : 1 - 2 3 とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含む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。このスクリーニング方法は、(a) このポリペプチドを、その活性が許容される条件下で少なくとも 1 つの化合物と結合させるステップと、(b) この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性を評価するステップと、(c) この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性と、この試験化合物の不在下でのこのポリペプチドの活性とを比較するステップとを含み、この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性の変化が、このポリペプチドの活性を調節する化合物の存在を示唆するという特徴を有する。

30

40

【0035】

更に本発明は、S E Q I D N O : 2 4 - 4 6 からなる一群から選択された配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、(a) この標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b) この標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップとを含む、該スクリーニング方法を提供する。

【0036】

本発明はさらに、試験化合物の毒性を評価する方法を提供する。この方法は、(a) 核酸

50

を含む生体サンプルを前記試験化合物で処理するステップと、(b) 処理した前記生体サンプルの核酸をプローブとハイブリダイズするステップと、(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を測定するステップと、(d) 前記処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量を、未処理の生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量とを比較するステップとを含み、前記処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量の差異が試験化合物の毒性を示唆する。この方法における前記プローブは、(1) SEQ ID NO: 24-46 からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(2) SEQ ID NO: 24-46 からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(3) 前記(1)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(4) 前記(2)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(5) 前記(1)乃至(4)のRNA等価物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの連続する少なくとも20個のヌクレオチドを含む。また、前記ハイブリダイゼーションは、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る。また、前記標的ポリヌクレオチドが、(1) SEQ ID NO: 24-46 からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(2) SEQ ID NO: 24-46 からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(3) 前記(1)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(4) 前記(2)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(5) 前記(1)乃至(5)のRNA等価物とを含む。代替的に前記標的ポリヌクレオチドは前記ポリヌクレオチド配列の断片である。

10

20

【0037】

(本発明の記載について)

本発明のタンパク質及び核酸配列、方法について説明する前に、本発明は、ここに開示した特定の装置及び材料、方法に限定されず、その実施形態を変更できることを理解されたい。また、ここで用いられる用語は、特定の実施例のみを説明する目的で用いられたものであり、後述の請求の範囲によってのみ限定され、本発明の範囲を限定することを意図したものではないということも理解されたい。

【0038】

本明細書及び請求の範囲において単数形を表す「或る」、「その(この等)」は、文脈で明確に示していない場合は複数形を含むことに注意されたい。従って、例えば「或る宿主細胞」は複数の宿主細胞を含み、その「抗体」は複数の抗体は含まれ、当業者には周知の等価物なども含まれる。

30

【0039】

本明細書で用いた全ての科学技術用語は、別の方法で定義されていない限り、本発明の属する技術分野の一般的な技術者が普通に解釈する意味と同じである。本明細書で記述したものと類似、或いは同等の全ての装置及び材料、方法は本発明の実施及びテストに使用できるが、好適な装置及び材料、方法をここに記す。本明細書に記載の全ての文献は、本発明に関連して使用する可能性のある文献に記載された細胞系、プロトコル、試薬、ベクターを記述し開示するために引用した。従来発明を引用したからと言って、本発明の新規性が損なわれると解釈されるものではない。

40

【0040】

(定義)

用語「VETRP」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VETRPのアミノ酸配列を指す。

【0041】

用語「アゴニスト」は、VETRP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、VETRPに直接相互作用するか、或いはVETRPが関与する生物学的経路の成分と作用して、VETRPの活性を調節するタンパク質、核酸、糖質、小分子

50

、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

【0042】

用語「アレル変異配列」は、V E T R Pをコードする遺伝子の別の形を指す。アレル変異配列は、核酸配列における少なくとも1つの変異によって生じ、変異m R N A若しくは変異ポリペプチドになり、これらの構造や機能は変わる場合もあれば変わらない場合もある。ある遺伝子は、天然型のアレル変異配列が存在しないもの、1つ或いは多数存在するものがある。一般にアレル変異配列を生じる変異は、ヌクレオチドの自然な欠失、付加、或いは置換による。これらの各変異は、単独或いは他の変異と同時に起こり、所定の配列内で一回或いはそれ以上生じる。

【0043】

V E T R P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、V E T R Pと同じポリペプチド或いはV E T R P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、V E T R P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アレル変異配列との不適合或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにV E T R Pをコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な或いは検出困難な多形性を含む。コードされたタンパク質も変異され得り、サイレント変化を生じV E T R Pと機能的に等価となるアミノ酸残基の欠失、挿入、或いは置換を含み得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にV E T R Pの活性が保持される範囲で、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び／または両親媒性についての類似性に基づいて成され得る。例えば、負に荷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含まれ、正に荷電したアミノ酸にはリシン及びアルギニンが含まれ得る。類似の親水性の値をもち極性非荷電側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニンが含まれ得る。類似の親水性の値をもち非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、フェニルアラニン及びチロシンが含まれ得る。

10

20

30

【0044】

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。

【0045】

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。一般に増幅は、この技術分野で周知のポリメラーゼ連鎖反応（P C R）技術によって行われる。

【0046】

用語「アンタゴニスト」は、V E T R P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、V E T R Pに直接相互作用するか、或いはV E T R Pが関与する生物学的経路の成分と作用して、V E T R P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。

40

【0047】

用語「抗体」は、抗原決定基と結合可能なF a b及びF（a b'）₂、及びそれらの断片、F v断片などの無傷の分子を指す。V E T R Pポリペプチドと結合する抗体は、抗体を免疫する小ペプチドを含む無傷の分子またはその断片を用いて作製可能である。動物（例えば、マウス、ラット、若しくはウサギ）を免疫化するのに使用されるポリペプチド或いはオリゴペプチドは、R N Aの翻訳から、或いは化学的に合成可能であり、必要に応じて担体タンパク質と結合させることも可能である。ペプチドと化学的に結合した一般に用いられる担体は、ウシ血清アルブミン、チログロブリン、及びキーホールリンペットヘモニアン（K L H）を含む。次ぎに、この結合したペプチドを用いて動物を免疫化する。

【0048】

50

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。タンパク質或いはタンパク質の断片が、宿主動物を免疫化するのに用いられるとき、このタンパク質の種々の領域は、抗原決定基（タンパク質上の特定の領域或いは三次元構造体）に特異的に結合する抗体の産生を誘発し得る。抗原決定基は、抗体と結合するために無傷の抗原（即ち、免疫応答を引き出すために用いられる免疫原）と競合し得る。

【0049】

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と、RNAと、ペプチド核酸（PNA）と、ホスホロチオネートやメチルホスホネート、ベンジルホスホネート（benzylphosphonate）などの修飾された骨格（backbone linkage）を有するオリゴヌクレオチドと、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖などの修飾された糖を有するオリゴヌクレオチドと、5-メチルシトシンまたは2'-deoxyuracil、7-deaza-2'-deoxyguanosineなどの修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドを含み得る。アンチセンス分子は、化学合成や転写を含む任意の方法で作ることができる。相補的アンチセンス分子は、一度細胞に導入されると、細胞によって作られた天然の核酸配列と塩基対となって二重鎖を形成し、転写や翻訳を阻害する。「負」または「マイナス」という表現はアンチセンス鎖であり、「正」または「プラス」という表現はセンス鎖である。

【0050】

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VETRP、合成のVETRP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。

【0051】

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' AGT 3'」が相補的な配列「3' TCA 5'」と対をなす。

【0052】

「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、所定のヌクレオチド配列若しくはアミノ酸配列を含む任意の組成物を指す。この組成物は、乾燥した製剤或いは水溶液を含み得る。VETRP若しくはVETRP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、プローブは、塩（例えば、NaCl）及び界面活性剤（例えば、SDS：ドデシル硫酸ナトリウム）、その他の物質（例えば、デンハート液、乾燥ミルク、サケ精子DNAなど）を含む水溶液に展開され得る。

【0053】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにDNA配列の解析を繰り返し行い、XL-PCRキット（PE Biosystems, Foster City CA）を用いて5' 及び／または3' の方向に伸長され、再度シー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。伸長及び重複の両方によって構築されるコンセンサス配列もある。

【0054】

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。以下に、あるタンパク質の元のアミノ酸が別のアミノ酸に置換される保存的なアミノ酸置換を示す。

元の残基	保存的な置換	
A l a	G l y, S e t	
A r g	H i s, L y s	
A s n	A s p, G l n, H i s	
A s p	A s n, G l u	
C y s	A l a, S e r	
G l n	A s n, G l u, H i s	
G l u	A s p, G l n, H i s	
G l y	A l a	
H i s	A s n, A r g, G l n, G l u	10
I l e	L e u, V a l	
L e u	I l e, V a l	
L y s	A r g, G l n, G l u	
M e t	L e u, I l e	
P h e	H i s, M e t, L e u, T r p, T y r	
S e r	C y s, T h r	
T h r	S e r, V a l	
T r p	P h e, T y r	
T y r	H i s, P h e, T r p	
V a l	I l e, L e u, T h r	20

一般に、保存されたアミノ酸置換の場合は、a) 置換された領域のポリペプチドの骨格構造、例えば、 β シートや α ヘリックス高次構造、b) 置換された部位の分子の電荷または疎水性、及び／または、c) 側鎖の大半が維持される。

【0055】

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。

【0056】

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。ポリヌクレオチド配列の化学修飾には、例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基、或いはアミノ基による水素の置換がある。誘導体ポリヌクレオチドは、自然分子（未修飾の分子）の生物学的或いは免疫学的機能の少なくとも1つを維持するポリペプチドをコードする。誘導体ポリペプチドとは、もとのポリペプチドの生物学的機能、或いは免疫学的機能の少なくとも1つを維持する、グリコシル化、ポリエチレングリコール化、或いは任意の同様のプロセスによって修飾されたポリペプチドのことである。

【0057】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を生成し得る、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。

【0058】

用語「断片」は、V E T R PまたはV E T R P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」の最大の長さは、親配列から1つのヌクレオチド／アミノ酸残基を差し引いた長さである。例えば、ある断片は、5～1000個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基を含む。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子、またはその他の目的に用いる断片は、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基の長さである。断片は、優先的に分子の特定の領域から選択される場合もある。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示された最初の250若しくは500のアミノ酸（或いは、ポリペプチドの最初の25%または50%）から選択された連続するアミノ酸の所定の長さを含み得る。これらの長さは一例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の任意の長さが、本発明の実施例に含まれ得る。

【0059】

SEQ ID NO: 24-46の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO: 24-46を明確に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を含む。SEQ ID NO: 24-46のある断片は、例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術、またはSEQ ID NO: 24-46を関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法に有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO: 24-46の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に決定できる。

【0060】

SEQ ID NO: 1-23のある断片は、SEQ ID NO: 24-46のある断片によってコードされる。SEQ ID NO: 1-23のある断片は、SEQ ID NO: 1-23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: 1-23のある断片は、SEQ ID NO: 1-23を特異的に認識する抗体の開発における免疫原性ペプチドとして有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO: 1-23の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に決定できる。

【0061】

「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）、それに続く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。

【0062】

「相同性」は、2つ以上のポリヌクレオチド配列間または2つ以上のポリペプチド配列間の配列類似性である。この配列類似性は配列同一性と言い換えることができる。

【0063】

SEQ ID NO: 1-23のある断片は、SEQ ID NO: 24-46のある断片によってコードされる。SEQ ID NO: 1-23のある断片は、特異的にSEQ ID NO: 1-23を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: 1-23のある断片は、特異的にSEQ ID NO: 1-23を認識する抗体の作製用の免疫原性ペプチドとして有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO: 1-23の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に測定できる。

【0064】

用語「類似性」は相補性の程度を表す。これには、部分的類似性と完全な類似性とがある。用語「同一性」を「類似性」とも言える。同一の配列と標的の核酸とのハイブリダイゼーションが少なくとも部分的に阻止される部分的に相補的な配列は、「実質的に類似」と呼ばれる。完全に相補的な配列と標的の配列とのハイブリダイゼーションの阻止は、緩いストリンジェントな条件の下、ハイブリダイゼーションアッセイ（サザンブロッティング或いはノーザンブロッティング法、溶液ハイブリダイゼーション等）を用いて検査される。実質的に類似の配列或いはハイブリダイゼーションプローブは、緩いストリンジェントな条件の下、完全に類似（同一）の配列と標的の配列との結合に対して競合して抑制する。これは、緩いストリンジェントな条件下では非特異的な結合が許容されるということではなく、緩いストリンジェントな条件では、2つの配列の互いへの結合が特異的（即ち、選択的）に相互作用しなければならない。部分的な相補性ともいえない（例えば、30%未満の類似性或いは同一性）第2の標的配列を用いて、非特異的結合が存在しないことの検査が可能である。非特異的結合が存在しない場合は、実質的に類似配列或いはプローブが第2の非相補的標的配列とハイブリダイズしない。

【0065】

ポリヌクレオチド配列についての用語「パーセントの同一性」または「%の同一性」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、標準化され

再現できる方法で、2つの配列間のアラインメントを最適化するべく、配列にギャップを挿入して、より意味をもつ2つの配列間の比較を行うことができる。

【0066】

ポリヌクレオチド配列間の同一性のパーセントは、MEGALIGN version 3.12e 配列アラインメントプログラムに組込まれるCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて決定可能である。このプログラムはLASERGENEソフトウェアパッケージの一部であり、分子生物学分析プログラム一式(DNA STAR, Madison WI)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の対のアライメントの場合、デフォルトパラメータは、Ktupple=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。同一性のパーセントは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列間の「類似性のパーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

10

【0067】

別法では、National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S. F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410) が提供する、広く用いられている無料の配列比較アルゴリズム一式が、NCBI (Bethesda, MD) を含む幾つかのソース及びインターネット (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) で入手可能である。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/bl2.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、デフォルトを設定するギャップ及び他のパラメーターと共に用いられる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較する場合、ある者は、デフォルトパラメータに設定された「BLAST 2 Sequences」ツール Version 2.0.12 (April-21-2000) でblastnを使用するであろう。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、以下のようにする。

20

30

【0068】

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties

40

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

同一性のパーセントは、例えば、特定の配列番号で決められた、所定の配列の全長に対して測定してもよいし、それより短い長さに対して、例えば、ある大きな所定の配列から得られた断片、例えば、連続する少なくとも、20または30、40、50、70、100、200のヌクレオチドの断片の長さに対して測定してもよい。このような長さは単なる例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の配列の任意の長さの断片を用いて、同一性のパーセントが測定される長さを示すことができる。

50

【0069】

高い同一性を示さない核酸配列でも、遺伝子コードの縮重によって類似のアミノ酸配列をコードし得る。縮重を利用して核酸配列を変え、それぞれが実質的に同じタンパク質をコードする様々な核酸配列を作製できることを理解されたい。

【0070】

ポリペプチド配列に用いられる用語「パーセントの同一性」または「%の同一性」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周知である。アラインメント方法の中には、保存的なアミノ酸置換を考慮したものもある。詳細に上述したこのような保存的な置換は、一般に、置換部位の電荷や疎水性が保存され、ポリペプチドの構造（従って機能も）が保存される。 10

【0071】

ポリペプチド配列間の同一性のパーセントは、MEGALIGN バージョン3.12e 配列アラインメントプログラム（上記）に組込まれるCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて決定可能である。CLUSTAL Vを用いる対方式のポリペプチド配列のアラインメントの場合、デフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、及び「diagonals saved」=5と設定する。PAM250マトリクスが、デフォルトの残基重み付け表として選択される。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、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、「類似性のパーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。 20

【0072】

別法では、NCBI BLASTソフトウェア一式が用いられる。例えば、2つのポリペプチド配列を対で比較をする場合、ある者は、デフォルトパラメータで設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12（Apr-21-2000）でblastpを使用するであろう。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、以下のようにする。

【0073】

Matrix: BLOSUM62
Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties 30
Gap x drop-off: 50
Expect: 10
Word Size: 3
Filter: on

同一性のパーセントは、例えば、特定の配列番号で決められた、所定のポリペプチド配列の全長に対して測定してもよいし、それより短い長さに対して、例えば、ある大きな所定のポリペプチド配列から得られた断片、例えば、連続する少なくとも15、20または30、40、50、70、150の残基の断片の長さに対して測定してもよい。このような長さは単なる例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の配列の任意の長さの断片を用いて、同一性のパーセントが測定される長さを示すことができる。 40

【0074】

「ヒト人工染色体（HAC）」は、約6kb（キロベース）～10MbのサイズのDNA配列を含み得る、安定した有糸分裂染色体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。

【0075】

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。

【0076】

「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 50

る。特異的なハイブリダイゼーションとは、2つの核酸配列が高い相同性を有することを意味する。アニーリングが許容される条件下で、特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成され、洗浄過程の後にもハイブリダイズしたままである。洗浄過程は、ハイブリダイゼーションプロセスの厳密性即ちストリンジェント (stringency) の決定において特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異的な結合、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。核酸配列間のアニーリングが許容される条件は、当業者によって日常的に決定され、ハイブリダイゼーションの間は一定であるが、洗浄過程は、目的のストリンジェントにするためにその最中に条件の変更が可能であり、ハイブリダイゼーション特異性が得られる。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

10

【0077】

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、洗浄過程を行う際の温度によっても左右される。この洗浄温度は通常、所定のイオン強度とpHにおける特定の配列の熱融点 (T_m) より約5～20℃低く選択される。このT_mは、(所定のイオン強度とpHの下) 標的の配列の50%が完全に一致するプローブと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の条件は、周知であり、Sambrook, J. 他による、1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版の1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY; 特に2巻の9章に記載されている。

20

【0078】

本発明のポリヌクレオチド間の高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションでは、約0.2×SSC及び約1%のSDSの存在の下、約68℃で1時間の洗浄過程を含む。別法では、65℃、60℃、55℃、42℃の温度で行う。SSCの濃度は、約0.1%のSDSが存在の下、約0.1～2×SSCの範囲である。通常は、ブロッキング試薬を用いて非特異的なハイブリダイゼーションを阻止する。このようなブロッキング試薬には、例えば、約100～200 μg/mlの切断され変性したサケ精子DNAが含まれる。約35～50% v/vの濃度のホルムアミドなどの有機溶剤が、例えば、RNAとDNAのハイブリダイゼーションなどの特定の場合に用いることができる。これらの洗浄条件の有用な改変は、当業者には周知である。特に高いストリンジェントな条件でのハイブリダイゼーションは、ヌクレオチド間の進化における類似性を示唆し得る。このような類似性は、それらのヌクレオチド及びコードされたポリペプチドが類似の役割を果たしていることを強く示唆する。

30

【0079】

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液中 (例えば、C₀tまたはR₀t分析) で形成されるか、或いは溶液中の1つの核酸配列と固体の支持物 (例えば、紙、膜、フィルター、チップ、ピン、或いはスライドガラス、または細胞及びその核酸を固定する任意の適当な基板) に固定されたもう一つの核酸配列とで形成され得る。

40

【0080】

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。

【0081】

「免疫応答」は、炎症性疾患及び外傷、免疫異常、感染症、遺伝病などに関連する症状を指す。これらの症状は、細胞系及び全身防衛系に影響を及ぼすサイトカイン及びケモカイン、別の情報伝達分子などの様々な因子の発現という特徴をもつ。

【0082】

用語「免疫原性断片」は、例えば哺乳動物などの生きている動物に導入すると、免疫反応を引き起こすGVREDのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を指す。用語「免

50

疫原性断片」はまた、本明細書で開示するまたは当分野で周知のあらゆる抗体生産方法に有用な G C R E C のポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を含む。

【0083】

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。

【0084】

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。

【0085】

用語「変調」は、V E T R P の活性の変化を指す。例えば、変調によって、V E T R P 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。 10

【0086】

用語「核酸」及び「核酸配列」は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、或いはそれらの断片を指し、一本鎖若しくは二本鎖であって、センス鎖或いはアンチセンス鎖であるゲノム起源若しくは合成起源の D N A 或いは R N A、ペプチド核酸 (P N A)、任意の D N A 様物質、及び R N A 様物質である。

【0087】

「機能的に結合した」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与える場合、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に結合している。一般に、機能的に結合した D N A 配列は、同じ読み枠内で 2 つのタンパク質をコードする領域が結合する必要がある場合は、非常に近接或いは連続する。 20

【0088】

「ペプチド核酸 (P N A)」は、末端がリシンで終わるアミノ酸残基のペプチド骨格に結合した、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。この末端のリシンにより、この組成物が溶解性となる。P N A は、相補的な一本鎖 D N A や R N A に優先的に結合して転写物の伸長を止め、ポリエチレングリコール化して細胞における寿命を延ばし得る。

【0089】

V E T R P 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、V E T R P の酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なり得る。 30

【0090】

「プローブ」とは、同一配列或いはアレル核酸配列、関連する核酸配列の検出に用いる、V E T R P 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、検出可能な標識またはレポーター分子が結合され単離されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドである。典型的な標識には、放射性アイソトープ及びリガンド、化学発光試薬、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 D N A オリゴヌクレオチドである短い核酸である。プライマーがポリヌクレオチドにアニーリングした後、ある D N A ポリメラーゼ酵素によって、標的の D N A 一本鎖に沿って伸長される。プライマーの組は、例えば、P C R 法における核酸配列の増幅 (及び同定) に用いることができる。 40

【0091】

本発明に用いられるプローブ及びプライマーは、既知の配列の少なくとも 15 の連続するヌクレオチドを含む。特異性を高めるために、より長いプローブ及びプライマーが用いることも可能である。例えば、開示した核酸配列の連続する少なくとも 20 または 25、30、40、50、60、70、80、90、100、150 のヌクレオチドを含む。プローブ及びプライマーは、上記した例より相当長いものも用いることができ、本明細書の表 50

及び図面、配列表に示された任意の長さのヌクレオチドも用いることができることを理解されたい。

【0092】

プローブ及びプライマーの準備及び使用方法については、例えば、Sambrook, J. 他による、1989年、名称「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版の1-3巻 (Cold Spring Harbor Press, Plainview NY)、またはAusubel, F. M. 他による、1987年、名称「Current Protocols in Molecular Biology」(Greene Publi. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY)、並びに Innis他による、1990年、名称「PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications」(Academic Press, San Diego CA.)を参照されたい。PCR用のプライマーの組は、例えば、Primer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA)などのそのような目的のためのコンピュータプログラムを用いて、ある既知の配列から引き出すことができる。

【0093】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドは、当分野で周知のプライマー選択用のコンピュータプログラムで選択される。例えば、OLIGO 4.06ソフトウェアは、それぞれが最大100ヌクレオチドまでのPCR用のプライマーの対の選択、及び32,000塩基までの入力ポリヌクレオチド配列から最大5,000ヌクレオチドまでの大きなポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドの分析に有用である。類似のプライマー選択用プログラムには、能力を拡大する追加の機能が含まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム (Genome Center at University of Texas South West Medical Center, Dallas TXより入手可能)は、メガベース配列から特定のプライマーを選択できるため、ゲノムワイドスコープ (genome-wide scope)におけるプライマーの設計に有用である。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。また、Primer3は、特にマイクロアレイのオリゴヌクレオチドの選択に有用である (後の方の2つのプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれのソースから得ることができ、ユーザーのニーズを満たすように変更することもできる)。PrimerGenプログラム (UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UKより入手可能)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するため、アラインメントされた核酸配列の最も保存された領域或いは最も保存されていない領域のどちらかとハイブリダイズするプライマーを選択することができる。従って、このプログラムは、固有及び保存されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記した任意の選択方法で同定されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片は、例えば、PCR法やシーケンシングプライマー、マイクロアレイエレメント、或いはサンプルの核酸の完全或いは部分的に相補的なポリヌクレオチドを同定する特定のプローブなどの、ハイブリダイゼーション技術に有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記した方法に制限されるものではない。

【0094】

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。この人工の組み合わせは、化学合成によって作られる場合も多いが、前出のSambrookに記載されたような遺伝子工学の技術を用いて核酸の離れたセグメントを人工的に操作する方がより一般的である。この「組換え核

酸」には、単に核酸の一部の追加または置換、欠失によって変更された核酸も含む。組換え核酸は、あるプロモーター配列に機能的に結合した核酸配列を含む場合もある。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のに用いられるベクターの一部であり得る。

【0095】

別法では、このような組換え核酸は、この組換え核酸を発現する哺乳動物のワクチン接種に用いると、その哺乳動物の防衛的な免疫応答を誘発する、ワクシニアウイルスに基づいたウイルスベクターの一部であり得る。

【0096】

「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、転写や翻訳、またはRNAの安定性を調節する宿主またはウイルスタンパク質と相互作用する。

10

【0097】

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

【0098】

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、糖鎖の背骨がデオキシリボースではなくリボースからなる。

20

【0099】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。VETRPをコードする核酸若しくはその断片、VETRP自体を含むと推定されるサンプルには、体液と、細胞からの抽出物や細胞から単離された染色体や細胞内小器官、膜と、細胞と、溶液中に存在するまたは基板に固定されたゲノムDNA、RNA、cDNAと、組織または組織プリント等も含まれ得る。

【0100】

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、結合する分子によって認識される、例えば、抗原決定基つまりエピトープなどのタンパク質の特定の構造の存在によって左右される。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。

30

【0101】

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

40

【0102】

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

【0103】

用語「基板」は、任意の好適な固体或いは半固体の支持物を指し、膜及びフィルター、チップ、スライド、ウェハ、ファイバー、磁気または非磁気ビード、ゲル、チューブ、プレート、ポリマー、微小粒子、毛細管が含まれる。この基板には、壁または塹壕、ピン、チャンネル、細孔などの様々な表面形態があり、そこにポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

50

【0104】

「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。

【0105】

「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、当分野で周知の種々の方法により、自然或いは人工の条件下で起こり、原核宿主細胞若しくは真核宿主細胞の中に外来核酸配列を挿入する任意の周知の方法によって行うことができる。この形質転換の方法は、形質転換される宿主細胞のタイプによって選択される。この方法には、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）、リポフェクション、及び微粒子照射が含まれるが、これらに限定されるものではない。「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。

10

【0106】

本明細書における「遺伝子組換え生物」とは、当分野で周知の遺伝子組換え技術などを用いて、人間が生物の1つ以上の細胞に異種の核酸を導入した任意の生物であり、動物及び植物を含むが、それらに限定されるものではない。微量注入や組換えウイルスに感染させるなどの慎重な遺伝子操作によって、細胞の前駆体に直接或いは間接的に異種核酸を細胞に導入する。「遺伝子操作」とは、典型的な交雑育種や*in vitro*での受精ではなく、組換えDNA分子を導入することである。本発明に従った遺伝子組換え生物には、細菌及びラン藻類、菌類、植物、動物が含まれる。本発明の単離されたDNAは、当分野で周知の、例えば、感染、形質移入、形質転換、トランス接合（*trans conjugation*）などの方法によって、宿主に導入することができる。本発明のDNAをそのような生物に導入する技術は周知であり、前出のSambrook他（1989）に記載されている。

20

【0107】

特定の核酸配列の「変異配列」とは、デフォルトパラメータ設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9（May-07-1999）を用いるblastnによって、ある核酸配列のある長さに対する該特定の核酸配列の同一性が、少なくとも40%と決定された核酸配列のことである。このような核酸の対は、ある長さにおいて、例えば、少なくとも50%または60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、或いはそれ以上の同一性を示し得る。ある変異配列は、例えば、「アレル」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。スプライス変異配列は基準分子と同一性が極めて高い可能性があるが、mRNAプロセッシング中のエキソンの択一的スプライシングによってポリヌクレオチドの数が多くなったり、少なくなったりする。対応するポリペプチドは、基準分子に存在する追加の機能ドメインを有したり、基準分子に存在するドメインが欠落したりし得る。種変異配列は、種によって異なるポリヌクレオチド配列である。得られるポリペプチドは、互いに高いアミノ酸同一性を有する。多型変異配列は、所定の種と種における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ヌクレオチド多型」（SNP）も含み得る。SNPの存在は、例えば、或る集団、病態、病態の性向を示唆し得る。

30

40

【0108】

特定のポリペプチド配列の「変異体」とは、デフォルトパラメータ設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9（May-07-1999）を用いるblastpによって、ある核酸配列のある長さに対する該特定のポリペプチド配列の同一性が、少なくとも40%と決定されたポリペプチド配列のことである。このようなポリペプチドの対は、ある長さにおいて、例えば、少なくとも50%または60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、或いはそれ以上の同一性を示し得

50

る。

【0109】

(発明)

本発明は、新規のヒト小胞輸送タンパク質 (VETRP) 及び VETRP をコードするポリヌクレオチドの発見に基づき、これらの組成物を利用した小胞輸送障害、自己免疫/炎症異常、及び癌の診断、治療、及び予防に関する。

【0110】

表1は、VETRPをコードする完全長のヌクレオチド配列の構築に用いたインサイト社クローンを示す。列1及び列2はそれぞれ、ポリペプチド配列及びヌクレオチド配列の配列番号 (SEQ ID NO) を示す。列3は、各VETRPをコードする核酸が同定された Incyte クローンのクローンIDを示し、列4は、それらのクローンが単離された cDNA ライブラリを示す。列5は、Incyte クローン及びそれらに対応する cDNA ライブラリを示す。cDNA ライブラリが示されていないインサイト社クローンは、プールされた cDNA ライブラリに由来する。場合によっては、GenBank 配列識別子が列5に示されている。列5に示されているインサイト社クローン及び GenBank cDNA 配列は、各VETRPのコンセンサスヌクレオチド配列の構築に用いられ、ハイブリダイゼーション技術における断片として有用である。

【0111】

表2の各列は、本発明の各ポリペプチドの様々な特性を示す。列1は配列番号 (SEQ ID NO)、列2は各ポリペプチドにおけるアミノ酸残基の数、列3は潜在的なリン酸化部位、列4は潜在的なグリコシル化部位、列5はシグネチャ (signature) 配列及びモチーフを有するアミノ酸残基、列6は、BLAST分析によって同定された相同配列、及び相当する引用を示し、引用することを以ってその全てを本明細書の一部とする。列7は、分析方法、場合によってはその分析方法が適用できる検索可能なデータベースを示す。列7の分析方法は、配列相同性及びタンパク質モチーフによって各ポリペプチドを特長つけるために用いられた。

【0112】

表3の列は、VETRPをコードするヌクレオチド配列に関連した組織特異性及び疾患、異常症、症状を示している。表3の列1は、ヌクレオチドの配列番号 (SEQ ID NO) を示している。列2は、列1のヌクレオチド配列の断片を示している。これらの断片は、例えば、SEQ ID NO: 24-46を同定し、SEQ ID NO: 24-46と関連するポリヌクレオチド配列とを区別する、ハイブリダイゼーション若しくは増幅の技術において有用である。これらの断片によってコードされるポリペプチドは、例えば、免疫原性ペプチドとして有用である。列3は、VETRPを発現する組織名、及びVETRPを発現する全組織におけるその割合を示す。列4は、VETRPを発現する組織に関連する疾患若しくは異常症、症状、並びにVETRPを発現する全組織におけるそれらの割合を示す。列5は、各cDNAライブラリのサブクローニングに用いたベクターを示す。神経組織中でのSEQ ID NO: 25の発現に特に注意されたい。SEQ ID NO: 41では癌及び生殖組織の両方の中で発現しており、またSEQ ID NO: 43は癌及び神経組織中で発現していることに注意されたい。

【0113】

表4の各列は、VETRPをコードするcDNAのクローンが単離されたcDNAライブラリの作製に用いられた組織についての説明である。列1は、ヌクレオチドのSEQ ID NOを示し、列2はそれらのクローンが単離されたcDNAライブラリを示し、列3は列2のcDNAライブラリに対応する組織の由来及び詳細を示す。

【0114】

本発明はまた、VETRPの変異体も含む。好適なVETRPの変異体は、VETRPの機能的或いは構造的特徴の少なくともどちらか一方を有し、かつVETRP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。

【0115】

SEQ ID NO: 31は、第12番染色体の70.60～76.50センチモルガンの範囲及び第1番染色体の159.60～164.10センチモルガンの範囲マッピングされる。SEQ ID NO: 36は、第3番染色体の129.00～131.80センチモルガンの範囲及び第4番染色体の86.00～91.90センチモルガンの範囲マッピングされる。SEQ ID NO: 38は、第6番染色体のp-末端～27.10センチモルガンの範囲にマッピングされる。SEQ ID NO: 42は、第2番染色体の233.10～236.10センチモルガンの範囲にマッピングされる。SEQ ID NO: 44は、第5番染色体の61.10～69.60センチモルガンの範囲、第11番染色体の117.90～123.50センチモルガンの範囲及び第17番染色体の99.30～103.70センチモルガンの範囲マッピングされる。 10

【0116】

本発明はまた、VETRPをコードするポリヌクレオチドを提供する。特定の実施例において、本発明は、VETRPをコードするSEQ ID NO: 24-46からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を提供する。配列表に示したSEQ ID NO: 24-46のポリヌクレオチド配列は、窒素系塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の背骨がデオキシリボースではなくリボースからなる等価RNA配列を含む。

【0117】

本発明はまた、VETRP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、VETRP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: 24-46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: 24-46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、VETRP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

【0118】

遺伝暗号の縮重により作り出され得るVETRP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、可能なコドン選択に基づいた組み合わせの選択によって作り出され得る可能なポリヌクレオチド配列の変異の全てが含まれ得る。これらの組み合わせは、天然のVETRP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。 30

【0119】

VETRPをコードするヌクレオチド配列及びその変異配列は一般に、好適に選択されたストリンジェントな条件下で、天然のVETRP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VETRP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。特定のコドンが宿主によって利用される頻度に基づいてコドンを選択して、ペプチドの発現が特定の真核細胞または原核宿主に発生する割合を高めることが可能である。コードされたアミノ酸配列を変えないで、VETRP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。 40

【0120】

本発明はまた、VETRP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 50

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、VETRPまたはその任意の断片をコードする配列の中に突然変異を導入することも可能である。

【0121】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO: 24-46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; and Kimmel, 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。 10

【0122】

当分野で周知のDNAのシーケンシング方法を用いて、本発明の何れの実施例も実行可能である。この方法には、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, Foster City CA)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech Piscataway NJ)、或いはELONGASE増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg MD) にみられるような校正エキソヌクレアーゼとポリメラーゼとの組み合わせなどの酵素が用いられる。好ましくは、MICROLAB 2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200 Thermal Cycler 200 (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800 (PE Biosystems) など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 (PE Biosystems)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) または当分野で周知の他の方法を用いてシーケンシングを行う。得られた配列を当分野で周知の様々なアルゴリズムを用いて分析する（例えば、Ausubel, F. M. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7. 7; Meyers, R. A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY, p. 856-853. を参照）。 20 30

【0123】

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、VETRP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。例えば制限部位PCR法を利用する1つの方法では、一般的なプライマー及び入れ子プライマー (nested primer) 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（例えば、Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic* 2: 318-322を参照）。逆PCR法を用いる別法では、広範な方向に伸長して環状化した鋳型から未知の配列を増幅するプライマーを用いる。この鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列を含む制限断片に由来する（例えば、Triglia, T. 等 (1988) *Nucleic Acids Res* 16: 8186を参照）。キャプチャPCR法を用いる第3の方法は、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断片のPCR増幅を含む（例えば、Lagerstrom, M. 他 (1991) *PCR Methods Applic* 1: 111-119を参照）。この方法では、多数の制限酵素による消化及びライゲーションを用いて、PCRを行う前に未知の配列の領域の中に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、当分野で周知の別の方法を用いて未知の配列を得ることも可能である。（例えば、Parker, J. D. 他 (1991) *Nucleic Ac* 40 50

ids Res. 19:3055-3060を参照)。更に、PCR、ネスト化プライマー、PROMOTERFINDERライブラリ(Clontech, Palo Alto CA)を用いれば、ゲノムDNA内の歩行が可能である。この方法で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/エキソン接合部を探すのに有用である。全てのPCR法をベースにした方法では、プライマーは、市販のOLIGO 4.06 Primer Analysis software(National Bioscience, Plymouth MN)或いは別の好適なプログラムなどを用いて、長さが22~30ヌクレオチド、GC含量が50%以上、約68℃~72℃の温度で鋳型に対してアニーリングするよう設計される。

【0124】

完全長のcDNAをスクリーニングする場合は、大きなcDNAを含むようにサイズが選択されたライブラリを用いるのが好ましい。更に、オリゴd(T)ライブラリが完全な長さのcDNAを生成できない場合は、遺伝子の5'領域を有する配列を含むものが多いランダムに初回抗原刺激を受けたライブラリが有用である。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。

【0125】

市販のキャピラリー電気泳動システムを用いて、シーケンシングまたはPCR産物のヌクレオチド配列のサイズの分析、または確認が可能である。詳しくは、キャピラリーシーケンシングには、電気泳動による分離のための流動性ポリマー、及び4つの異なったヌクレオチドに特異的なレーザーで活性化される蛍光色素、放出された波長の検出に利用するCCDカメラを使用することが可能である。出力/光強度は、適切なソフトウェア(例えば、GENOTYPER及びSEQUENCE NAVIGATOR、PE Biosystems)を用いて電気信号に変換され、サンプルのローディングからコンピュータ分析までのプロセス及び電子データ表示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場合もあるDNAの小片のシーケンシングに特に適している。

【0126】

本発明の別の実施例では、VETRPをコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を組換えDNA分子にクローニングして、適切な宿主細胞内にVETRP、その断片または機能的等価物を発現させることが可能である。遺伝暗号固有の縮重により、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VETRPのクローン化及び発現に利用可能である。

【0127】

種々の目的でVETRPをコードする配列を変えるために、当分野で一般的に知られている方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列を組換えることができる。この目的には、遺伝子産物のクローン化、プロセッシング及び/または発現の調節が含まれるが、これらに限定されるものではない。ランダムな断片によるDNAの混合や遺伝子断片と合成オリゴヌクレオチドのPCR再組み立てを用いて、ヌクレオチド配列の組換えが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド媒介性定方向突然変異誘発を利用して、新しい制限部位を生成する突然変異の導入、グリコシル化パターンの変更、コドン選択の変更、スプライスバリエーションの作製等が可能である。

【0128】

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シャフリング技術を用いてシャフリングして、VETRP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VETRPの生物学的特性を変更或いは改良することができる。DN

10

20

30

40

50

Aシャフリングは、PCR法による遺伝子断片の組換えで遺伝子変異体のライブラリを製作するプロセスである。次に、このライブラリを、目的の特性を有する遺伝子変異体を同定するために選択或いはスクリーニングする。これらの好ましい変異体をプールし、DNAシャフリング及び選択／スクリーニングを繰り返す。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、ランダムな位置に変異がある1つの遺伝子の断片を、目的の特性が最適化するまで、組換え及びスクリーニング、シャフリングを実施することもできる。別法では、所定の遺伝子の断片を、同じ或いは異なった種の同じ遺伝子ファミリーの相同な遺伝子の断片で組換え、それによってプロトコルに従った調節可能な方法で、多数の天然遺伝子の遺伝子多様性を最大にすることができる。

【0129】

別の実施例によれば、VETRP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. 等（1980）*Nucl. Acids Res. Symp. Ser* 7:215-223；及びHorn, T. 他（1980）*Nucl. Acids Res. Symp. Ser* 225-232を参照）。別法として、化学的方法を用いてVETRP自体またはその断片を合成することが可能である。例えば、ペプチド合成は種々の固相技術を用いて実行可能である（例えば、Creighton, T. （1984）*Proteins. Structures and Molecular Properties*, WH Freeman, New York NY, pp. 55-60；Roberge, J. Y. 等（1995）*Science* 269:202-204を参照）。また、合成の自動化は例えばABI 431Aペプチドシンセサイザー（PE Biosystems）を用いて達成し得る。更にVETRP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。

【0130】

このペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィー（例えば、Chiez, R. M. 及び F. Z. Regnier （1990）*Methods Enzymol.* 182:392-421を参照）を用いて実質的に精製可能である。合成されたペプチドの組成は、アミノ酸分析或いはシーケンシングにより確認することができる（例えば、Creighton, 前出、pp 28-53を参照）。

【0131】

生物学的に活性なVETRPを発現させるために、VETRP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。これらのエレメントには、ベクター及びVETRP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のプロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列が含まれる。このようなエレメントは、その長さ及び特異性が様々である。特定の開始シグナルによって、VETRPをコードする配列のより効果的な翻訳を達成することが可能である。このようなシグナルには、ATG開始コドン及びコザック配列などの近傍の配列が含まれる。VETRP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なければならない。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、自然及び合成の様々なものから得ることが可能である。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。（例えば、Scharf, D. 他（1994）*Results Probl. Cell Differ.* 201-18-162. を参照）。

【0132】

10

20

30

40

50

当業者に周知の方法を用いて、VETRPをコードする配列、好適な転写及び翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法には、in vitro組換えDNA技術、合成技術、及びin vivo遺伝子組換え技術が含まれる。(例えば、Sambrook, J. 他. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 4章及び8章, 及び16-17章; 及びAusubel, F. M. 他. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, ch. 9章及び13章1-4章を参照)。

【0133】

種々の発現ベクター／宿主系を利用して、VETRPをコードする配列の保持及び発現が可能である。これらには、限定するものではないが、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れた細菌などの微生物や、酵母菌発現ベクターで形質転換された酵母菌や、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; タバコモザイクウイルス、TMV)または細菌発現ベクター(例えば、TiまたはpBR322プラスミド)で形質転換された植物細胞系や、動物細胞系などが含まれる(前出のSambrook、前出のAusubel、Van Heeke, G. and S. M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509、Bitter, G. A. 他 (1987) Methods Enzymol. 153:516-544; Scorer, C. A. ら (1994) Bio/Technology 12:181-184; Engelhard, E. K. 他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945、タカマツ, N. (1987) EMBOJ. 6:307-311、Coruzzi, G. 他 (1984) EMBOJ. 3:1671-1680、Broglie, R. 他 (1984) Science 224:838-843、Winter, J. 他 (1991) Results Probl. Cell Differ. 17:85-105、『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, pp. 191-196、Logan, J. and T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659、Harrington, J. J. 他 (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. and 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。

【0134】

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、VETRP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、VETRP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、PBLUESCRIPT(Stratagene, La Jolla CA)またはpSPORT1プラスミド(GIBCO BRL)などの多機能の大腸菌ベクターを用いることが

10

20

30

40

50

できる。ベクターの多数のクローニング部位にVETRP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、これらのベクターを用いて、クローニングされた配列の*in vitro*での転写、ジデオキシンスクリーニング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失を作り出すことが可能である（例えば、Van Heeke, G. 及び 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VETRPが必要な場合は、VETRP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、強力に発現を誘発するT5またはT7バクテリオファージプロモーターを含むベクターを使用できる。

10

【0135】

VETRPの発現に酵母の発現系の使用が可能である。α因子やアルコールオキシダーゼやPGHプロモーターなどの構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多種のベクターが、酵母菌サッカロミセス・セレビジエまたは*Pichia pastoris*に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の分泌か細胞内への保持のどちらかを誘導し、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列を組み込む。（例えば、Ausubel, 1995, 前出、Bitter, 前出、及びScorer, 前出を参照）。

【0136】

植物系もVETRPの発現に使用可能である。VETRPをコードする配列の転写は、例えば、CaMV由来の35S及び19Sプロモーターなどのウイルスプロモーターが単独で、或いはTMV（例えば、Coruzzi, 前出、Broglie, 前出、Winter, 前出を参照）由来のオメガリーダー配列と組み合わせて促進される。これらの作製物は、直接のDNA形質転換或いは病原体を介したトランスフェクションによって、植物細胞の中に導入可能である。（例えば、*The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology* (1992) McGraw Hill NY, pp. 191-196を参照）。

20

【0137】

哺乳動物細胞では、多種のウイルスベースの発現系が利用され得る。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VETRPをコードする配列を結合し得る。ウイルスのゲノムの非必須のE1またはE3領域への挿入により、感染した宿主細胞にVETRPを発現する生ウイルスを得ることが可能である（Logan, J. 及びShenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 3655-3659を参照）。さらに、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーなど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ることが可能である。タンパク質を高レベルで発現させるために、SV40またはEBVを基にしたベクターを用いることが可能である。

30

【0138】

ヒト人工染色体(HAC)を用いて、プラスミドで発現しそれに含まれているものより大きなDNAの断片を供給可能である。治療のために約6kb~10MbのHACsを作製し、従来の輸送方法（リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル）で供給する。（例えば、Harrington, J. J. 他 (1997) Nat Genet. 15: 345-355. を参照）。

40

【0139】

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VETRP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、VETRP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。ベクターの導入の後、細胞を選択培地に移す前に、強化培地で約1~

50

2日の間増殖させる。選択マーカーの目的は選択的な媒介物に対する抵抗性を与えるとともに、その存在により導入された配列を確実に発現する細胞の増殖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、その細胞型に好適な組織培養技術を用いて増殖可能である。

【0140】

任意の数の選択系を用いて、形質転換された細胞系を回収することが可能である。選択系には、以下のものに限定はしないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子が含まれ、それぞれ tk^{-} または $ap r^{-}$ 細胞において使用される。(例えば、Wigler, M. 他 (1977) Cell 11:223-232; 及び Lowy, I. 他 (1980) Cell 22:817-823 を参照)。また代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を選択のベースとして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 或いは pat はクロルスルフロン ($cVETRP sulfuron$)、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ ($phosphinotricin acetyltransferase$) に対する耐性を与える (例えば、Wigler, M. 他. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F. 他 (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14 を参照)。さらに選択に利用できる遺伝子、例えば、代謝のために細胞が必要なものを変える $trpB$ 及び $hisD$ が文献に記載されている (例えば、Hartman, S. C. 及び R. C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8047-51 を参照)。アニトシアニン、緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、 β グルクロニダーゼ及びその基質 GUS、ルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリンなどの可視マーカーが用いられる。緑色蛍光タンパク質 (GFP) (Clontech, Palo Alto, CA) も使用できる。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 (例えば、Rhodes, C. A. 他 (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131 を参照)。

【0141】

マーカー遺伝子の発現の存在／不在によって目的の遺伝子の存在が示されても、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、VETRP 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、VETRP をコードする配列を含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により特定可能である。または、1つのプロモーターの制御下でマーカー遺伝子が VETRP 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。

【0142】

一般に、VETRP をコードする核酸配列を含み、VETRP を発現する宿主細胞は、当業者に周知の種々の方法を用いて特定することが可能である。これらの方法には、DNA-DNA 或いは DNA-RNA ハイブリダイゼーションや、PCR 法、核酸或いはタンパク質の検出及び／または数量化のための膜系、溶液ベース、或いはチップベースの技術を含むタンパク質生物学的試験法または免疫学的アッセイが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0143】

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 VETRP の発現の検出及び計測のための免疫学的方法は、当分野で周知である。このような技法には、酵素に結合したイムノソルベントアッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、蛍光標示細胞分取器 (FACS) などがある。VETRP 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その他のアッセイは、当分野では十分に知られている。(例えば、Hampton, R. 他. (1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN, Sect. IV; Coligan, J. E. 他 Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York, NY; 及び Pound, J. D. (1990) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ)。

10

【0144】

種々の標識技術及び結合技術が当業者には周知であり、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイに用いられ得る。VETRP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、VETRP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。当分野では周知であり市販されているこのようなベクターを、T7, T3, またはSP6などの好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドの追加によって、in vitroでのRNAプローブの合成に用いることができる。これらの方法は、例えば、Amersham Pharmacia Biotech及びPromega (Madison WI)、U. S. Biochemical Corp (Cleveland OH) が市販する種々のキットを用いて行うことができる。容易な検出の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、コファクター、インヒビター、磁気粒子、及び放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、色素産生剤などが含まれる。

20

【0145】

VETRP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。形質転換された細胞から産生されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用されるその配列及び／またはそのベクターによる。VETRP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VETRP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。

30

【0146】

更に、挿入した配列の発現調節能力または発現したタンパク質を所望の形にプロセッシングする能力によって宿主細胞株が選択される。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 (lipidation)、及びアシル化が含まれるが、これらに限定されるものではない。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特定の細胞装置及び特徴のある機構をもつ種類の宿主細胞 (例えば、CHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38) がAmerican Type Culture Collection (ATCC; Bethesda, MD) より入手可能であり、外来のタンパク質の正しい修飾及びプロセッシングを確実にするために選択される。

40

【0147】

本発明の別の実施例では、VETRPをコードする自然或いは変更された、または組換えの核酸配列を上記した任意の宿主系の融合タンパク質の翻訳となる異種配列に結合させる。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラVETRPタンパク質が、VETRPの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が、市販の親和性基質を用いて

50

融合タンパク質の精製を促進し得る。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-mc、赤血球凝集素 (HA) が含まれるが、これらに限定されるものではない。GST及びMBP、Trx、CBP、6-Hisによって、固定されたグルタチオン、マルトース、フェニルアルシン酸化物 (phenylarsine oxide)、カルモジュリン、金属キレート樹脂のそれぞれで同族の融合タンパク質の精製が可能となる。FLAG、c-mc、及び赤血球凝集素 (HA) によって、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販のモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いた融合タンパク質の免疫親和性の精製ができる。また、VETRPをコードする配列と異種タンパク質配列との間にあるタンパク質分解切断部位を融合タンパク質が含むように遺伝子操作すると、VETRP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と精製の方法は、Ausubel. (1995、前出 ch 10). に記載されている。市販されている様々なキットを用いて、融合タンパク質の発現及び精製を促進できる。

10

【0148】

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VETRPの合成が可能である。これらの系は、T7またはT3、SP6プロモーターと機能的に結合したタンパク質をコードする配列の転写と翻訳をつなげる。翻訳は、例えば、³⁵Sメチオニンである放射能標識されたアミノ酸前駆体の存在の下で起こる。

20

【0149】

本発明のVETRPまたはその断片を用いて、VETRP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、VETRP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。

【0150】

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VETRP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)。

30

同様に、化合物は、VETRPが結合する天然受容体、或いは例えばリガンド結合部位などの少なくとも受容体のある断片に密接に関連し得る。何れの場合も、既知の技術を用いてこの化合物を合理的に設計することができる。一実施例では、このような化合物に対するスクリーニングには、分泌タンパク質或いは細胞膜上のタンパク質の何れか一方としてVETRP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、大腸菌からの細胞が含まれる。VETRPを発現する細胞またはVETRPを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、VETRP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。

【0151】

あるアッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに実験的に結合させ、結合を、フルオロフォア、放射性同位体、酵素抱合体またはその他の検出可能な標識により検出することができる。例えば、このアッセイは、少なくとも1つの試験化合物を、溶液中の或いは固体支持物に固定されたVETRPと結合させるステップと、VETRP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、細胞遊離剤、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。

40

【0152】

本発明のVETRPまたはその断片を用いて、VETRP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

50

、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、VETRPが少なくとも1つの試験化合物と結合する、VETRPの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、試験化合物の存在下でのVETRPの活性が試験化合物不在下でのVETRPの活性と比較する。試験化合物の存在下でのVETRPの活性の変化は、VETRP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VETRPの活性に適した条件下でVETRPを含む *in vitro* または細胞遊離系と結合させてアッセイを実施する。これらアッセイの何れかにおいて、VETRPの活性を調整する試験化合物は間接的に結合することが可能であり、試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも1つから複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

【0153】

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

【0154】

VETRP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）。

【0155】

VETRPをコードするポリヌクレオチドを用いて、ヒト疾患をモデルとした「ノックイン」ヒト化動物（ブタ）または遺伝子組換え動物（マウスまたはラット）を作製することが可能である。ノックイン技術を用いて、VETRP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、潜在的な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VETRPを乳汁内に分泌するなどVETRP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）。

【0156】

（治療）

VETRPのある領域と小胞輸送タンパク質のある領域との間に、例えば配列及びモチーフの文脈における化学的及び構造的類似性が存在する。更に、VETRPの発現は、生殖組織、神経組織、癌、及び炎症／外傷に密接に関連する。従って、VETRPは、小胞輸送障害、自己免疫／炎症異常、および癌においてある役割を果たすと考えられる。VETRP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、VETRPの発現また

10

20

30

40

50

は活性を低下させることが望ましい。また、V E T R P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、V E T R Pの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0157】

従って、一実施例において、V E T R P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V E T R Pまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患には小胞輸送障害、自己免疫／炎症異常、および癌が含まれ、小胞輸送障害の中には、嚢胞性線維症、グルコース－ガラクトース吸収不全症候群、高コレステロール血症、糖尿病、尿崩症、高／低血糖症、グレーブス病、甲状腺腫、クッシング病、副腎機能不全と、潰瘍性大腸炎や胃潰瘍、十二指腸潰瘍を含む胃腸疾患と、後天性免疫不全症候群（A I D S）を含む小胞輸送障害に関連した別の症状と、枯草熱や喘息、じんま疹を含むアレルギーと、自己免疫性溶血性貧血、増殖性糸球体腎炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、リウマチ様変形性関節症、硬皮、チェディアック－東症候群、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、トキシックショック症候群、外傷性組織損傷、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染、蠕虫感染、原虫感染が含まれ、また、自己免疫／炎症異常の中には、後天性免疫不全症候群（A I D S）及び副腎機能不全、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌障害－カンジダー外胚葉ジストロフィー（A P E C E D）、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、偶発性リンパ球減少症、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、心筋又は心膜炎、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、全身性エリテマトーデス、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、癌合併症、血液透析、体外循環と、ウィルス感染症及び細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症、外傷が含まれ、さらに、癌の中には、腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、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、子宮の癌などが含まれる。

10

20

30

【0158】

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V E T R P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、V E T R P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。

【0159】

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V E T R P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V E T R P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。

【0160】

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V E T R P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、V E T R Pの活性を調節するアゴニストを患者に投与することも可能である。

40

【0161】

更なる実施例では、V E T R P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V E T R P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、上記した小胞輸送障害、自己免疫／炎症異常、および癌が含まれる。一実施態様では、V E T R P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V E T R P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。

【0162】

50

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V E T R P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、V E T R P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。

【0163】

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、相補的な配列、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。当業者は、従来の医薬原理にしたがって併用療法で用いる好適な治療薬を選択可能である。治療薬との組み合わせにより、上に列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。この方法を用いて少ない量の各薬剤で医薬効果をあげることが可能であり、広範囲な副作用の可能性を低減し得る。

10

【0164】

V E T R Pのアンタゴニストは、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。詳しくは、精製されたV E T R Pを用いて抗体を作ったり、治療薬のライブラリをスクリーニングしてV E T R Pと特異的に結合するものを同定が可能である。V E T R P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、F a bフラグメント、及びF a b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。治療用には、中和抗体（即ち、二量体の形成を阻害するもの）が特に好ましい。

【0165】

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、V E T R P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。このようなアジュバントにはフロイントアジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲルアジュバント、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、及びジニトロフェノールなどの界面活性剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。ヒトに用いられるアジュバントの中では、B C G (b a c i l l i C a l m e t t e - G u e r i n) 及び C o r y n e b a c t e r i u m p a r v u m が特に好ましい。

20

【0166】

V E T R P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或いはペプチド、またはそれらの断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であることが望ましい。V E T R P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。

30

【0167】

V E T R P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、抗体分子を生産する任意の技術を用いて作製することが可能である。これらの技術には、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E B V-ハイブリドーマ技術が含まれるが、これらに限定されるものではない（例えば、K o h l e r , G . 等 . (1 9 7 5) N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7 ; K o z b o r , D . 等 . (1 9 8 5) . J . I m m u n o l . M e t h o d s 8 1 - 8 - 4 2 ; C o t e , R . J . 等 . (1 9 8 3) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 8 0 : 2 0 2 6 - 2 0 3 0 ; C o l e , S . P . 等 . (1 9 8 4) M o l . C e l l B i o l . 6 2 : 1 0 9 - 1 2 0 を参照）。

40

【0168】

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、M o r r i s o n , S . L . 他 . (1 9 8 4) P r o c . N

50

at l. Acad. Sci. 81-4851-4855; Neuberger, M. S. 他. (1984) Nature 312:604-608; Takeda, S. 等. (1985) Nature 314:452, 454を参照)。別法では、当分野で周知の方法を用いて、一本鎖抗体の生産のための記載された技術を適用して、VETRP特異性一本鎖抗体を生成する。関連する特異性を備えるが別のイディオタイプの組成の抗体は、ランダムな組み合わせの免疫グロブリンライブラリから鎖混合によって生成することもできる（例えば、Burton D. R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:11120-3を参照）。

【0169】

抗体は、リンパ球集団の中の in vivoでの産生を誘発することによって、また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示されているような、高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって、産生することもできる（例えば、Orlandi, R. 他. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3833-3837; Winter, G. 他. (1991) Nature 349:293-299を参照）。

【0170】

VETRPに対する特異的な結合部位を含む抗体も産生することができる。例えば、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって生成されるF(ab')に断片と、F(ab')に断片のジスルフィド架橋を減じることによって生成されるFab断片が含まれるが、これらに限定されるものではない。別法では、Fab発現ライブラリを作製することによって、所望の特異性とモノクローナルFab断片の迅速且つ容易な同定が可能となる（例えば、Huse, W. D. 等. (1989) Science 254:1275-1281を参照）。

【0171】

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。隔離された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる競合的な結合、または免疫放射線活性のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このようなイムノアッセイには、VETRPとその特異性抗体との間の複合体調整の計測が含まれる。二つの非干渉性VETRPエピトープに対して反応性のモノクローナル抗体を用いる、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合的結合アッセイも利用することができる（Pound、前出）。

【0172】

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、VETRP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VETRP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。多数のVETRPエピトープに対して親和性が不均一なポリクローナル抗体医薬のKaは、VETRPに対する抗体の平均親和性または結合活性を表す。特定のVETRP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、VETRP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、VETRP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. and Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0173】

ある下流での適用におけるこのような医薬品の品質及び適性を調べるために、ポリクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体医薬の抗体価及び結合活性を更に評価する。例えば、少なくとも1～2mg/mlの特異的な抗体、好ましくは5～10mg/mlの特異的な抗体を含むポリクローナル抗体医薬は一般に、VETRP抗体複合体を沈殿させなければならない処理に用いられる。様々な適用例における抗体の特異性及び抗体価、結合活性、抗体の品質や使用法の指針は一般に入手可能である。(例えば、Catty, 前出, 及びColigan 他、前出を参照)。

【0174】

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

【0175】

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送達することができる(例えば、Slater, J. E. 他(1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102(3):469-475; and Scanlon, K. J. 他(1995) 9(13):1288-1296. を参照)。また、アンチセンス配列は、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(例えば、Miller, A. D. (1990) Blood 76:271; Ausubel, 前出; Ucker t, W. and W. Walther (1994) Pharmacol. Ther. 63(3):323-347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、及び当分野で周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. 他(1998) J. Pharm. Sci. 87(11):1308-1315; and Morris, M. C. 他(1997) Nucleic Acids Res. 25(14):2730-2736. を参照)。

【0176】

本発明の別の実施例では、VETRPをコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞の遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療は、(i) 遺伝子欠損症(例えば、X染色体連鎖遺伝(Cavazzana-Calvo, M. 他(2000) Science 288:669-672)によって特徴づけられる重度の複合型免疫欠損(SCID)-X1)、遺伝性アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症(Blaese, R. M. 他(1995) Science 270:475-480; Bordignon, C. 他(1995) Science 270:470-475)に関連する重度の複合型免疫欠損、嚢胞性繊維症(Zabner, J. 他(1993) Cell 75:207-216; Crystal, R. G. 他(1995) Hum. Gene Therapy 6:643-666; Crystal, R. G. 他(1995) Hum. Gene Therapy 6:667-703)、サラセミア(thalassemia)、家族性高コレステロール血症、第VIII因子若しくは第IX因子欠損による血友病(Crystal, R. G. (1995) Science 270:404-410; Verma, I. M. and Somia, N. (1997) Nature 389:239-242)を治療したり、(ii) 条件的致死性遺伝子産物(例えば、細胞増殖の制御不能による癌の場合)を発現させたり、及び(iii) 細胞内の寄生虫(例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)(Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396; Poeschl, E. 40 50

他 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:11395-11399) や、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、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て行うことができる。VETRPの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を引き起こす場合、導入した細胞の好適な集団からVETRPを発現させて、遺伝子欠損によって起こる症状の発現を緩和することが可能である。

【0177】

本発明の更なる実施例では、VETRPの欠損による疾患や異常症は、VETRPをコードする哺乳動物発現ベクターを作製して、これらのベクターを機械的手段によってVETRP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な導入技術には、(i) 個々の細胞内へのDNAのマイクロインジェクション、(ii) 金粒子の打ち込み、(iii) リポソーム仲介性トランスフェクション、(iv) 受容体仲介性遺伝子導入、及び(v) DNAトランスポソン (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. Recipon (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:445-450) の使用が含まれる。

10

20

【0178】

VETRPの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAXベクター (Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA)、PTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA) が含まれる。VETRPを発現させるために、(i) 恒常的に活性なプロモーター (例えば、サイトメガロウイルス (CMV)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ (TK)、若しくはβ-アクチン遺伝子等)、(ii) 誘導性プロモーター (例えば、市販されているT-R

EX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. and 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. and 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/ミフェプリストン誘導性プロモーター (Rossi, F. M. V. and H. M. Blau, 前出)、または(iii) 正常な個体に由来するVETRP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。

30

40

【0179】

市販のリポソーム形質転換キット (例えば、Invitrogenが販売しているPERFECT LIPID及び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である。別法では、リン酸カルシウム法 (Graham, F. L. and A. J. Eb (1973) *Virology* 52:456-467) 若しくは電気穿孔法 (Neumann, B. 他 (1982) *EMBO J.* 1:841-845) を用いて形質転換を行う。初代細胞にDNAを導入するためには、これらの標準的な哺乳動物トランスフェクションプロトコルを変更する必要がある。

50

【0180】

本発明の別の実施例では、VETRPの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、(i)レトロウイルス末端反復配列(LTR)プロモーター若しくは独立したプロモーターのコントロール下でVETRPをコードするポリヌクレオチドと、(ii)好適なRNAパッケージングシグナルと、(iii)追加のレトロウイルス・シス作用性RNA配列及び効率的なベクターの増殖に必要なコーディング配列を伴うRev応答性エレメント(RRE)とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター(例えば、PFB及びPFBNEO)はStratagene社から入手可能であり、公表データ(Riviere, I. 他. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:6733-6737)に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。このベクターは、VSVg(Armentano, D. 他 (1987) J. Virol. 61:1647-1650; Bender, M. A. 他 (1987) J. Virol. 61:1639-1646; Adam, M. A. and A. D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806; Dull, T. 他 (1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zufferey, R. 他 (1998) J. Virol. 72:9873-9880)等の乱交雑エンベロープタンパク質若しく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を発現する好適なベクター生成細胞系(VPCL)において増殖される。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、ある細胞集団(例えば、CD4⁺T細胞)の形質導入、並びに形質導入した細胞を患者に戻す方法は、遺伝子治療の分野では周知であり、多数の文献に記載されている(Ranga, U. 他. (1997) J. Virol. 71:7020-7029; Bauer, G. 他 (1997) Blood 89:2259-2267; Bonyhadi, M. L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716; Ranga, U. 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:1201-1206; Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

【0181】

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、VETRPの発現に関連する1或いは複数の遺伝子異常を有する細胞にVETRP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は当分野では周知である。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の中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. 他. (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が、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また、Antinuzzi, P. A. 他 (1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544; and Verma, I. M. and N. Somia (1997) Nature 18:389:239-242を参照し、引用することをもって本明細書の一部とする。

【0182】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、VETRPの発現に関連する1或いは複数の遺伝子異常を有する標的細胞にVETRP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VE

10

20

30

40

50

TRP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分野では周知である。複製適格性の単純疱疹ウイルス(HSV) I型系のベクターは、霊長類の眼にレポーター遺伝子を送達するために用いられてきた(Liu, X. 他 (1999) Exp. Eye Res. 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製は、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号(Herpes simplex virus swains for gene transfer)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。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コントロールの下で、細胞に導入される少なくとも1つの内在性遺伝子を含むゲノムからなる組換えHSV d92についての記載がある。また上記特許には、ICP4、ICP27及びICP22のために除去される組換えHSV株の作製及び使用方法が開示されている。HSVベクターについては、Goins, W. F. 他 (1999) J. Virol. 73:519-532 and Xu, H. 他 (1994) Dev. Biol. 163:152-161を参照し、引用することをもって本明細書の一部とする。クローニングされたヘルペスウイルス配列の操作や、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トランスフェクトした後の組換えウイルスの継代、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分野で周知の技術である。

10

【0183】

別法では、αウイルス(正の一本鎖RNAウイルス)ベクターを用いてVETRPをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプのαウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス(Semliki Forest Virus, SFV)の生物学的な研究が広範に行われ、遺伝子伝達ベクター(gene transfer vector)がSFVゲノムに基づいていることが分かった(Garoff, H. and K. -J. Li (1998) Cun. Opin. Biotech. 9:464-469)。αウイルスRNAの複製中に、通常はウイルスカプシ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が完全長のゲノムRNAより高いレベルで複製されるため、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対してカプシドタンパク質が過剰に産生される。同様に、VETRPをコードする配列をαウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のVETRPをコードするRNAが産生され、高いレベルでVETRPが合成される。通常はαウイルス感染は2~3日以内の細胞溶解に関係するが、シンドビスウイルス(SIN)の変異体を有するハムスターの正常な腎細胞(BHK-21)の持続的な感染を確立する能力は、αウイルスの溶解性の複製が遺伝子治療に適用できるように好適に変更することが可能であることを示唆している(Dryga, S. A. 他. (1997) Virology 228:74-83)。様々な宿主にαウイルスを導入できることから、様々なタイプの細胞にVETRPを導入することできる。ある集団における細胞のサブセットの特定の形質導入には、形質導入する前に細胞のソーティングを必要とする場合がある。αウイルスの感染性cDNAクローンの操作、αウイルスcDNA及びRNAのトランスフェクション、並びにαウイルスの感染方法は当分野で周知である。

20

30

40

【0184】

例えば開始部位から約-10から約+10までの転写開始部位に由来するオリゴヌクレオチドを用いて、遺伝子の発現を阻害することが可能である。同様に、三重らせん塩基対合法を用いて阻害することができる。三重らせん構造は、二重らせんがポリメラーゼ、転写因子、または調節分子の結合のために十分に広がるのを阻止するため有用である。三重式DNAを用いる最近の治療の進歩は文献に記載されている(例えば、Gee, J. E. 等. (1994) In: Huber, B. E. 及び B. I. Carr, Molecular and Immunological VETRP approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NYを参照)。相補的な配列また

50

はアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによって mRNA の翻訳を阻止するように設計できる。

【0185】

酵索性 RNA 分子であるリボザイムは、RNA の特異的切断を触媒するために用いることができる。リボザイム作用の機構には、相補的な標的 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が含まれ、ヌクレオチド鎖切断が続く。例えば、VETRP をコードする配列のヌクレオチド鎖切断を、特異的且つ効果的に触媒する組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子が含まれる。

【0186】

任意の潜在的 RNA 標的内の特異的なリボザイム切断部位が、後続の配列 GUA、GUU、及び GUC を含むリボザイム切断部位に対して、標的分子をスキャンングすることによって初めに同定される。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 個から 20 個のリボヌクレオチドの短い RNA 配列を、オリゴヌクレオチドの機能を不全にする二次的な構造の特徴について評価することが可能である。候補標的の適合性も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて、相補的なオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの容易性をテストすることによって評価することが可能である。

【0187】

本発明の相補的なリボ核酸分子及びリボザイムは、当分野で周知の方法を用いて、核酸分子の合成のために作製することができる。これらの方法には、固相ホスホラミダイト化合物などのオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法が含まれる。別法では、RNA 分子が *in vitro* 及び *in vivo* で VETRP をコードする DNA 配列の転写によって生成され得る、このような DNA 配列は T7 または SP6 等の好適な RNA ポリメラーゼプロモータを用いて、種々のベクターの中に組み入れることが可能である。別法では、相補的な RNA を構成的または誘導的に合成するこれらの cDNA 作製物は、細胞株、細胞、または組織の中に導入することができる。

【0188】

RNA 分子を修飾することによって、細胞内の安定性を高め、半減期を長くすることができる。可能な修飾には、分子の 5' 及び/または 3' 端部でのフランキング配列の追加、または分子のバックボーン内のホスホジエステル結合の代わりにホスホロチオネートまたは 2' O メチルを用いる修飾が含まれるが、これらに限定されるものではない。PNA の生成に固有のこの概念は、内在性の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、及びウリジンのアセチル、メチル、チオール、及び同様の修飾形態だけでなく、イノシン、キューエオシン (queosine)、及びワイブトシン (wybutosine) などの従来のものでない塩基を含めることによって、これらの分子の全体に拡大することができる。

【0189】

本発明の更なる実施例は、VETRP 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。特定のポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物には、限定するものではないが、特定のポリヌクレオチド配列と相互作用可能な非高分子化学物質、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、転写因子やその他のポリペプチド転写調節因子が含まれる。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビター或いはエンハンサーとして作用し、ポリヌクレオチドの発現を変化させ得る。従って、VETRP 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、VETRP 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、VETRP 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、VETRP 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。

【0190】

特定のポリヌクレオチドの発現の変化の有効性を調べるために、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することができる。試験化合物は、有効な化合物の化学

修飾を含む当分野で周知の任意の方法で得ることができる。このような方法は、ポリヌクレオチドの発現を変化させる場合、一般に市販されている或い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、標的ポリヌクレオチドの化学的及び／または構造的な特性に基づいて化合物を合理的にデザインする場合、更に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。VETRPをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルは、少なくとも1つの試験化合物に曝露して得る。サンプルには、例えば無傷細胞、透過処理した細胞、in vitro細胞遊離系または再構成生化学系が含まれ得る。VETRPをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で周知の任意の方法でアッセイする。通常、VETRPをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特定のヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーションの収量を定量し、その値が1或いは複数の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較における基準となり得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現の変化が検出される場合は、ポリヌクレオチドの発現の変化に試験化合物が有効であることを示している。特定のポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物を調べるために、例えば Schizosaccharomyces pombe 遺伝子発現系 (Atkins, D. 他 (1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G. M. 他 (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:E15) または HeLa 細胞等のヒト細胞株 (Clarke, M. L. 他 (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13) を用いてスクリーニングする。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を調べるための、各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、及び修飾オリゴヌクレオチド) の組み合わせライブラリのスクリーニングを含む (Bruice, T. W. 他 (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruice, T. W. 他 (2000) 米国特許第6,022,691号)。

10

20

30

40

【0191】

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でき、in vivo、in vitro、及び ex vivo での使用に等しく適している。ex vivo での治療の場合、患者から採取された肝細胞の中にベクターを導入して、自家移植で同じ患者に戻すためにクローニング増殖される。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運搬は、当分野で周知の方法を用いて実行することができる (例えば、Goldman, C. K. 他. (1997) *Nature Biotechnology* 15:462-66:を参照)。

【0192】

上記したいかなる治療方法も、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ及びサルなどの哺乳動物を含む、治療が必要な全ての被験者に適用できる。

【0193】

本発明の別の実施例は、上記した全ての治療効果のために、医学上認められる担体と共に医薬品或いは無菌組成物の投与に関連する。このような組成物は、VETRP、VETRPの抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、またはVETRPのインヒビターなどからなる。この組成物は、単体で、或いは安定剤などの1種類以上の別の薬剤と共に、無菌の生体適合性医薬品担体に投与することができる。このような医薬品担体には、生理食塩水、緩衝食塩水、ブドウ糖、及び水などが含まれるがこれらに限定されるものではない。この組成物は、単独或いは薬物またはホルモンなどの別の薬剤と共に投与することができる。

【0194】

本発明に用いられる組成物は、様々な経路を用いて投与するが可能である。この経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下、または直腸が含まれるがこれらに限定されるものではない。

【0195】

50

肺投与用の組成物は、液状または乾燥粉末状に調製することができる。このような組成物は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子（例えば、従来の低分子量有機薬剤）の場合には、速効製剤のエアロゾル輸送が当分野で周知である。高分子（例えばより大きなペプチドやタンパク質）の場合には、肺の肺胞領域を介する肺輸送の技術が近年向上したため、インスリン等の薬剤を実際に血中に輸送することが可能となった（Patton, J. S. 他, 米国特許第5,997,848号等を参照）。肺輸送は、針注射を用いないで投与できるという点で優れており、潜在的に有毒な浸透エンハンサーが必要でなくなる。

【0196】

本発明に用いる好適な組成物には、目的を達成するため、効果的な量の活性処方成分を含む組成物が含まれる。当業者は、十分に自身の能力で効果的な服用量を定めることができる。

10

【0197】

組成物の特殊な形状は、VETRPまたはその断片を含む高分子を直接細胞内に輸送するべく調製される。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輸送を促進し得る。別法では、VETRPまたはその断片をHIV Tat-1タンパク質の陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして作製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されることが確認されている（Schwarze, S. R. 他（1999）Science 285:1569-1572）。

20

【0198】

どのような組成物であっても、治療に効果的な薬用量は、初めは、例えば腫瘍細胞の腫瘍細胞アッセイで、或いは動物モデルのどちらかで推定することができる。通常、動物モデルには、マウス、ウサギ、イヌ、サル、またはブタなどが用いられる。動物モデルはまた、好適な濃縮範囲及び投与の経路を決めるのに用いることができる。このような治療をもとに、ヒトへの有益な薬用量及び投与経路を決定することができる。

【0199】

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VETRPまたはその断片、VETRPの抗体、VETRP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、たとえば、ED₅₀（服用に対して集団の50%に医薬的効果がある用量）またはLD₅₀（服用に対して集団の50%に致命的である用量）統計を計算するなど、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決定することができる。毒性効果と治療効果との薬用量比は治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀と示すことができる。高い治療指数を示す組成物が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータが、ヒトへの適用のために、薬用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薬用量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、ED₅₀を含む血中濃度の範囲であることが望ましい。薬用量は、用いられる投与形態及び患者の感受性、投与の経路によって、この範囲内で様々である。

30

【0200】

正確な薬用量は、治療が必要な患者に関する要素を考慮して、実務者によって決められるであろう。薬用量及び投与は、効果的なレベルの活性成分を与えるため或いは所望の効果を維持するために調節される。薬用量の要素として考慮されるものには、疾患の重症度、患者の一般的な健康状態、年齢、体重、及び患者の性別、投与の時間及び頻度、併用する薬剤、反応感受性、及び治療に対する応答が含まれる。作用期間が長い組成物は、三日か四日に一度、一週間に一度、二週間に一度、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって左右され、投与され得る。

40

【0201】

通常、薬用量は投与の経路によって異なるが、約0.1~100,000 µgまでの最大約1グラムまでである。特定の薬用量及び運搬の方法に関するガイダンスは文献に記載されており、一般に当分野の実務者はそれを利用することができる。当業者は、タンパク質

50

またはインヒビターとは異なったヌクレオチドの製剤を利用するであろう。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの運搬は、特定の細胞、状態、位置などに対して特異的であろう。

【0202】

(診断)

別の実施例では、V E T R Pに特異的に結合する抗体が、V E T R Pの発現によって特徴付けられる疾患の診断、またはV E T R PやV E T R P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。診断に有用な抗体は、治療のところで記載した方法と同じ方法で製剤される。V E T R Pの診断アッセイには、抗体及び標識を用いてヒトの体液或いは細胞や組織から採取されたものからV E T R Pを検出する方法が含まれる。これらの抗体は、修飾をして或いはしないで使用され、レポーター分子の共有結合性或いは非共有結合性の接着によって標識化され得る。当分野で周知の種々のレポーター分子が用いられるが、その内の幾つかは上記した。

10

【0203】

V E T R Pを測定するためのE L I S A、R I A、及びF A C S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V E T R P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V E T R Pの発現の値は、複合体の形成に適した条件の下、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V E T R Pに対する抗体とを結合させることによって決定する。標準的な複合体形成の量は、測光法(p h o t o m e t r i c)などの種々の方法で定量され得る。被験者のV E T R P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間の偏差が、診断の指標となる。

20

【0204】

別の実施例によれば、V E T R P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。用いられるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的なR N A及びD N A分子、及びP N Aが含まれる。このポリヌクレオチドを用いて、疾患と関連し得るV E T R Pを発現する生検組織における遺伝子の発現を検出し定量する。この診断アッセイを用いて、V E T R Pの存在の有無、更に過剰な発現を調べ、治療中のV E T R P値の調節を監視する。

30

【0205】

ある実施形態では、V E T R P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P C Rプローブを用いたハイブリダイゼーションによって、V E T R P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V E T R Pをコードする自然界の配列のみを同定するかどうか、或いはアレルや関連配列コードする自然界の配列のみを同定するかどうかによって決まるであろう。

40

【0206】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、V E T R P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、D N AあるいはR N Aが可能であり、S E Q I D N O: 24-46の配列、或いはV E T R P遺伝子のプロモーター、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

【0207】

V E T R PをコードするD N A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、V E T R P及びV E T R P誘導体をコードするポリヌクレオチド配列をm R N A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。このようなベクターは市販されており、当業者には周知であり、好適なR N Aポリメラーゼ及び好適な標識さ

50

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る。ハイブリダイゼーションプローブは、例えば³²P或いは³⁵Sなどの放射性核種、或いはアビジン／ビオチン（*biotin*）結合系によってプローブに結合されたアルカリホスファターゼなどの酵素標識等の種々のレポーターの集団によって標識され得る。

【0208】

VETRPをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、VETRP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、このような疾患には小胞輸送障害、自己免疫／炎症異常、および癌が含まれ、小胞輸送障害の中には、囊胞性線維症、グルコース-ガラクトース吸収不全症候群、高コレステロール血症、糖尿病、尿崩症、高／低血糖症、グレーブス病、甲状腺腫、クッシング病、副腎機能不全と、潰瘍性大腸炎や胃潰瘍、十二指腸潰瘍を含む胃腸疾患と、後天性免疫不全症候群（AIDS）を含む小胞輸送障害に関連した別の症状と、枯草熱や喘息、じんま疹を含むアレルギーと、自己免疫性溶血性貧血、増殖性糸球体腎炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、リウマチ様変形性関節症、硬皮、チェディアック-東症候群、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、トキシックショック症候群、外傷性組織損傷、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染、蠕虫感染、原虫感染が含まれ、また、自己免疫／炎症異常の中には、後天性免疫不全症候群（AIDS）及び副腎機能不全、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌障害-カンジダー外胚葉ジストロフィー（APECED）、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、偶発性リンパ球減少症、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、心筋又は心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、腓炎、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、全身性エリテマトーデス、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、癌合併症、血液透析、体外循環と、ウイルス感染症及び細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症、外傷が含まれ、さらに、癌の中には、腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、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、子宮の癌などが含まれる。VETRPをコードするポリヌクレオチド配列は、サザン法やノーザン法、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VETRP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。このような質的或いは量的方法は、当分野では周知である。

【0209】

ある実施態様では、VETRP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。VETRPをコードするヌクレオチド配列は、標準的な方法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件の下、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができるであろう。好適な培養期間の後、サンプルを洗浄し、シグナルを定量して基準値と比較する。患者のサンプルのシグナルの量が、制御サンプルと較べて著しく変わっている場合は、サンプル内のVETRPをコードするヌクレオチド配列の変異レベルにより、関連する疾患の存在が明らかになる。このようなアッセイを用いて、動物実験、臨床試験、或いは個人の患者の治療を監視における、特定の治療効果を推定することが可能である。

【0210】

VETRPの発現に関連する疾患の診断の基準となるものを提供するために、正常あるいは標準的な発現の概要が確立される。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適

な条件の下、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から抽出された体液或いは細胞と、VETRPをコードする配列或いはその断片とを結合させることにより達成され得る。標準的なハイブリダイゼーションは、正常な被験者から得た値と周知の量の実質的に精製されたポリヌクレオチドが用いられる実験からの値とを比較することによって定量可能である。正常なサンプルから得た標準的な値を、疾患の症状を示す被験者から得た値と比較可能である。基準値と被験者の値との偏差を用いて罹患しているかどうかを決定する。

【0211】

疾患の存在が確定され、治療プロトコルが開始されると、ハイブリダイゼーションアッセイを通常ベースで繰り返して、被験者における発現のレベルが正常な患者に示される値に近づき始めたかどうかを推定することが可能である。繰り返し行ったアッセイの結果を、数日から数ヶ月の期間の治療の効果を見るのに用いることができる。

【0212】

癌では、個体からの生体組織における異常な量の転写物が、疾患の発生の素因を示し、また実際に臨床的症状が出る前に疾患を検出する方法を提供することが可能である。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或いは積極的な治療法を早くから利用して、癌の発生または進行を防ぐことが可能となる。

【0213】

VETRPをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドのさらなる診断への利用には、PCRの利用が含まれ得る。このようなオリゴマーは、化学的な合成、酵素を用いた生成、或いは*in vitro*で生成され得る。オリゴマーは、好ましくはVETRPをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはVETRPをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適な条件の下、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェントな条件の下、近縁のDNA或いはRNA配列の検出及び／または定量のため用いることが可能である。

【0214】

或る実施態様において、VETRP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、一塩基多型(SNP)を検出し得る。SNPは、ヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となる場合が多いヌクレオチドの置換、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、一本鎖立体構造多型(SSCP)及び蛍光SSCP(fSSCP)法が含まれる。SSCPでは、VETRP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。このDNAは、例えば病変或いは正常な組織、生検サンプル、体液等に由来し得る。このDNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR産物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。この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標識することによって、DNAシーケンシング装置などのハイスループット機器でアンプリマー(amplimer)の検出をすることが可能になる。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、共通のコンセンサス配列の構築に用いられる個々の重複するDNA断片の配列を比較することによって、多型を同定することができる。これらのコンピュータベースの方法は、DNA配列クロマトグラムの自動分析及び統計モデルを用いたシーケンシングエラーや研究室でのDNAの調整に起因する配列のばらつきを排除する。別法では、例えばハイスループットのMASSARRAYシステム(Sequenom, Inc., San Diego CA)を用いた質量分析によりSNPを検出し、特徴付ける。

【0215】

VETRPの発現を定量するために用いられ得る方法には、ヌクレオチドの放射標識或いはビオチン標識、調節核酸の相互増幅(coamplification)、及び標準的な曲線に結果が加えられたものが含まれる(例えば、Melby, P. C. 等(1993) J. Immunol. Methods, 159:235-44; Duplaa, C. 等(1993) Anal. Biochem. 229-236を参照)。多数のサ

ンプルの定量速度は、目的のオリゴマーやポリヌクレオチドが種々の希釈液に含まれ、分光光度法或いは非色応答によって定量が迅速なハイスループット型のアッセイを用いることで加速された。

【0216】

更に別の実施例では、本明細書で記載した任意のポリヌクレオチド配列に由来する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標的として用いることができる。マイクロアレイを転写イメージング技術に用いて、多数の遺伝子の相対発現レベルを同時にモニタリングすることができる。これについては、Seilhamer, J. J. 他に付与された米国特許第5,840,484号（名称「Comparative Gene Transcript Analysis」）に記載されており、この引用を以って本明細書の一部とする。マイクロアレイはまた、遺伝子変異、突然変異及び多型の同定に用いることができる。この情報を用いて、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を解明し、疾患を診断し、遺伝子発現に関連する疾病の進行／後退をモニタリングし、疾患の治療における治療薬の開発や活性のモニタリングを行うことができる。特に、患者にとって最適かつ有効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作成することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づいて、患者に対して極めて効果的でありながら副作用を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

【0217】

別の実施例では、VETRPに特異的な抗体、VETRPまたはその断片をマイクロアレイ上でエレメントとして用いることができる。マイクロアレイを用いて、上記のようにタンパク質間相互作用、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リング及び測定することが可能である。

【0218】

或る実施例は、或る組織または細胞型の転写イメージを生成する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型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、所定の条件下で所定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される（Seilhamer 他、米国特許第5,840,484号の「Comparative Gene Transcript Analysis」を参照。この特許に言及することを以って本明細書の一部とする）。従って、特定の組織または細胞型の転写物全体または逆転写物全体に本発明のポリヌクレオチドまたはその相補配列をハイブリダイズすることにより、転写イメージが生成され得る。或る実施例では、本発明のポリヌクレオチドまたはその相補配列がマイクロアレイ上に複数のエレメントのサブセットを構成するハイスループット型でハイブリダイゼーションさせる。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となり得る。

【0219】

転写イメージは、組織、細胞株、生検サンプル、またはその他の生体サンプルから単離した転写物を用いて生成し得る。従って、転写イメージは、組織または生検サンプルの場合には in vivo、または細胞株の場合には in vitro における遺伝子発現を反映する。

【0220】

本発明のポリヌクレオチドの発現プロファイルを示す転写イメージはまた、合成化合物または天然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され得る。全ての化合物は、作用及び毒性の機構を示唆する、頻繁に分子フィンガープリント若しくは毒性シグネチャと称されるような特徴的な遺伝子発現パターンを引き起こす（Nuwaysir, E. F. 他（1999）Mol. Carcinog. 24:153-159、Steiner, S. and N. L. Anderson（2000）Toxicol. Lett. 112-113:467-471、また言及することを以って本明細書の一部とする）。試験化合物が、毒性を有する既知の

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高い。フィンガープリンまたはシグネチャが、より多く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れば、より有用かつ正確になる。理想としては、発現のゲノム全域にわたって測定し、最高品質のシグネチャを提供することである。任意の試験化合物によっても発現が変化しない遺伝子も同様に重要である。それは、これらの遺伝子の発現レベルを用いて残りの発現データを標準化することができるためである。標準化処理は、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。毒性シグネチャのエLEMENTへの遺伝子機能を割り当てることは毒性機構の解明に役立つが、毒性の予測につながるシグネチャの統計的な一致には遺伝子機能の知識は必要ではない（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、毒性シグネチャを用いる毒性スクリーニングにおいて、全ての発現した遺伝子配列を含めることは重要でありまた望ましいことである。

10

【0221】

或る実施例では、試験化合物の毒性は、核酸を含有する生体サンプルをその試験化合物で処理して評価する。処理した生体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若しくは複数のプローブでハイブリダイズさせ、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することができる。処理した生体サンプル中の転写レベルを、非処理生体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が、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唆する。

20

【0222】

別の実施例は、本発明のポリペプチド配列を用いて組織または細胞型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」という用語は、特定のある組織または細胞型におけるタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームを構成する各タンパク質は、更に個々に分析することができる。プロテオーム発現パターン即ちプロファイルは、所定の条件下で所定の時間に発現したタンパク質の数及びそれらの相対的な存在量を定量することにより分析する。従って、ある細胞のプロテオームのプロファイルは、特定の組織または細胞型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、このような分離は2次元ゲル電気泳動によって行う。この2次元ゲル電気泳動法では、まず、1次元の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、次に、2次元の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従って分離する（前出のSteiner and Anderson）。これらのタンパク質は、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染色剤を用いてゲルを染色して、分散した個別の位置にあるスポット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済みまたは未処理のいずれかの生体サンプルから得られる等位置にあ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調べる。スポット内のタンパク質は、例えば化学的または酵素的に切断した後、質量分析す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、好適には少なくとも5個の連続するアミノ酸残基であるその部分的な配列を、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。

30

40

【0223】

プロテオームのプロファイルは、VETRPに特異的な抗体を用いてVETRP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、マイクロアレイ上のELEMENTとして抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝露して各アレイELEMENT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. 270:103-1

50

11、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、チオール反応性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、各アレイエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

【0224】

プロテオームレベルでの毒性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して分析するべきである。或る組織における或るタンパク質では、転写物の存在量とタンパク質の存在量との相関性が低いことがあるため (Anderson, N. L. and J. Seilhamer (1997) *Electrophoresis* 18: 533-537)、プロテオーム毒性シグネチャは、転写イメージにはそれ程影響しないがプロテオームのプロフィールを変化させる化合物の分析において有用たり得る。更に、体液中での転写の分析は、mRNAが急速に分解するため困難である。しがたがって、このような場合にはプロテオームのプロフィール作成はより信頼でき、情報価値がある。

10

【0225】

別の実施例では、試験化合物の毒性は、タンパク質を含む生体サンプルをその試験化合物で処理して評価する。処理された生体サンプル中で発現したタンパク質を分離して、各タンパク質の量が定量できるようにする。各タンパク質の量を、未処理生体サンプル中の対応するタンパク質の量と比較する。両サンプル中のタンパク質の量の差は、処理されたサンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示唆する。個々のタンパク質は、それらのアミノ酸残基をシーケンシングし、これらの部分配列を本発明のポリペプチドと比較することで同定する。

20

【0226】

別の実施例では、試験化合物の毒性は、タンパク質を含む生体サンプルをその試験化合物で処理することにより評価する。生体サンプルから得たタンパク質を、本発明のポリペプチドに特異的な抗体と共にインキュベートする。その抗体により認識されたタンパク質の量を定量する。処理された生体サンプル中のタンパク質の量を、未処理生体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が、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示唆する。

30

【0227】

当分野で周知の方法でマイクロアレイを準備して使用し、分析する。(例えば、Brennan, T. M. 他 (1995) 米国特許第5, 474, 796号; Schena, M. 他 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 10614-10619; Baldeschweiler 他 (1995) PCT出願番号WO95/251116; Shalon, D. 他 (1995) PCT出願番号WO95/35505; Heller, R. A. 他 (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 2150-2155; 及び Heller, M. J. 他 (1997) 米国特許第5, 605, 662号を参照)。様々なタイプのマイクロアレイが周知であり、詳細については、DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, ed. (1999) Oxford University Press, Londonに記載されている。また、この文献を引用することを以って本明細書の一部とする。

40

【0228】

本発明の別の実施例ではまた、VETRP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。コーディング配列または非コーディング配列の何れかを用いることができるが、或る例では、コーディング配列より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間にコーディング配列が保存されていることにより、染色体マッピング時に望ましくない交差ハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。この配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工の染色体、例えば、ヒト人工染色体 (HAC)、酵

50

母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、細菌 P1 産物、或いは単一染色体 cDNA ライブラリに対してマッピングされる (Harrington, J. J. ら (1997) Nat Genet. 15:345-355、Price, C. M. (1993) Blood Rev. 7:127-134、Trask, B. J. (1991) Trends Genet. 7:149-154 等を参照)。一度マッピングすると、本発明の核酸配列を用いて、例えば病状の遺伝と特定の染色体領域やまたは制限断片長多型 (RFLP) の遺伝とが相関するような遺伝子連鎖地図を作成可能である (Lander, E. S. and D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357 を参照)。

【0229】

in situ 蛍光ハイブリダイゼーション (FISH) は、他の物理的及び遺伝子地図データと相関し得る (例えば、Heinz-Ulrich, 他による (1995) in Meyers, 前出, pp. 965-968 を参照)。遺伝子地図データの例は、種々の科学誌あるいは Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のワールドワイドウェブのサイトで見付けることができる。物理的な染色体地図上の VETRP 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ニングが行われる。

【0230】

染色体標本の in situ ハイブリダイゼーション、及び確定した染色体マーカーを用いた結合分析などの物理的マッピング技術を用いて、遺伝子地図を拡張することもできる。マウスなどの別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置させることにより、たとえ正確なヒト染色体の位置が分かていなくても、関連するマーカーが明らかになる場合が多い。この情報は、位置クロニング或いは別の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患の研究をしている研究者にとって価値がある。疾患や症候群に關与する 1 つ或いは複数の遺伝子の位置が、例えば血管拡張性失調症の 11q22-23 などの特定の遺伝子領域に遺伝子結合によって大まかに決定されると、その領域に対するどの配列マッピングも、さらなる調査のための関連する遺伝子或いは調節遺伝子を表す (例えば、Gatti, R. A. 他による (1988) Nature 336:577-580 を参照)。また、目的の本発明のスクレオチド配列を用いて、正常者、保有者、即ち感染者の間の、転位置、反転などによる染色体位置の違いを検出することもある。

【0231】

本発明の別の実施例では、VETRP、その触媒作用断片或いは免疫原断片またはそのオリゴペプチドを、種々の任意の薬剤スクリーニング技術における化合物のライブラリのスクリーニングに用いることができる。このようなスクリーニングに用いる断片は、溶液に遊離、固体支持物に固定、細胞の表面上に保持、或いは細胞内に存在する。VETRP 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。

【0232】

薬剤スクリーニングに用いる別の方法は、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のスクリーニング処理能力を高めるために用いられる (例えば、Geyse 40 en, 他による (1984) PCT 出願番号 WO84/03564 を参照)。この方法では、相当な数の異なる小さな試験用化合物が、プラスチックピン或いは他の基板の上に合成される。試験用化合物は、VETRP、或いはその断片と反応してから洗浄される。次ぎに、結合された VETRP が、当分野で周知の方法で検出される。精製された VETRP 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、ペプチドを捕らえ、固体支持物に固定することもできる。

【0233】

別の実施例では、VETRP と結合可能な中和抗体が VETRP と結合するため試験用化合物と特に競合する、競合的薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この方 50

法では、抗体が、V E T R Pと1つ以上の抗原決定因子を共有するどのペプチドの存在も検出する。

【0234】

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

【0235】

当分野の技術者であれば、更なる説明がなくても前述の説明だけで最大限に本発明を利用できるであろう。したがって、以下に記載する特定の好適な実施例は、例示目的であって本発明を限定するものではない。

【0236】

前述した及び以下に記載した全ての特許出願、特許、刊行物、特に米国特許出願第60／172，968号及び米国特許出願第60／172，066号に言及することをもって本明細書の一部とする。

【0237】

(実施例)

1 cDNAライブラリの作製

RNAは、Clontech社から購入、或いは表4に列記した組織から単離した。まず、この組織の一部を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する一方、この組織の別の一部をホモジナイズしてフェノールに溶解するか、或いはTRIzol (Life Technologies)、グアニジニウムイソチオシアネート及びフェノールの単相溶液などの好適な変性剤の混合液に溶解した。この溶解物を塩化セシウムにおいて遠心分離によって、或いはクロロホルムで抽出した。イソプロパノール或いは酢酸ナトリウムのどちらかとエタノール、或いは別の方法でこの溶解物からRNAを沈殿させた。

【0238】

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

【0239】

ある場合には、Stratagene社にRNAを提供し、Stratagene社が対応するcDNAライブラリを作製した。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)を用いて当分野で周知の推奨方法または類似の方法でcDNAを合成してcDNAライブラリを作製した。(例えば、Ausubel, 1997, 前出, ユニット5.1-6.6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に結合させてから、好適な1つの制限酵素或いは複数の制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリでは、SEPHACRYL S 1000またはSEPHAROSE CL2B、SEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー(Amersham Pharmacia Biotech)、アガロースゲル電気泳動法によってcDNAの大きさ(300~1000bp)を選択した。PBLUESCRIPTプラスミド(Stratagene)またはpSPORT1プラスミド(Life Technologies)、pcDNA2.1プラスミド(Invitrogen Carlsbad CA)、pINCYプラスミド(Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA)などの好適なプラスミドのポリリンカーの適合性制限酵素部位にcDNAを

10

20

30

40

50

結合させた。この組換えプラスミドを、Stratagene社のXL1-Blue, XL1-BlueMRF、SOLR、またはLife Technologies社のDH5αまたはDH10B、ELECTROMAX DH10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に導入し組み込んだ。

【0240】

2 cDNAクローンの単離

上記実施例1で記載したように得たプラスミドは、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) 或いは細胞溶解を利用した *in vivo* 切除によって宿主細胞から回収した。MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム (Promega)、及びAGTC Miniprep精製キット (Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid、QIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、REAL Prep 96プラスミドキットの内の少なくとも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しないで4℃で保管した。

【0241】

別法では、ハイスルーブットの直接結合PCR法によっ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を単一反応混合液で行った。サンプルを処理してから384-ウェルプレートに移して保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素 (Molecular Probes, Eugene OR) 及びFluoroskan II蛍光スキャナー (Lab systems Oy, Helsinki, Finland) を用いて蛍光定量的に測定した。

【0242】

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において回収したインサイト社cDNAは、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンシング反応は、標準的な方法で、或いはABI CATALYST 800 (PE Biosystems) thermal cyclerまたはPTC-200 thermal cycler (MJ Research) と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の組み合わせなどのハイスルーブット装置で行った。cDNAのシークエンシング反応の準備には、Amersham Pharmacia Biotech社の試薬、またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット (PE Biosystems) などのABIシークエンシングキットに含まれる試薬を用いた。cDNAのシークエンシング反応の電気泳動的な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)、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 (PE Biosystems)、当分野で周知のその他の配列解析システムを用いた。cDNA配列の読み枠は、標準的な方法 (Ausubel, 1997, 前出, unit 7.7) を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例6に記載した方法で配列を伸長した。

【0243】

cDNAのシークエンシングから得たポリヌクレオチド配列の構築及び解析は、当分野の技術者に周知のアルゴリズムを利用したソフトウェアを組合せて行った。表5は、利用したツール、ソフトウェア、アルゴリズム、それらの説明、引用文献、閾値パラメーターの概要を示す。表5の列1は用いたツール及びプログラム、アルゴリズム、列2はそれらの簡単な説明、列3は引用することで本明細書の一部とした引用文献、列4の記載部分は2つの配列の一致度の評価に用いたスコア及び確率値、他のパラメータを示す (確率値が高

ければ高いほど配列間の相同性が高くなる)。配列の解析には、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, S. San Francisco CA) 及びLASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いた。ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列のアラインメントを、アラインメントした配列間のパーセント同一性も計算するMEGALIGNマルチシーケンスアラインメントプログラム (DNASTAR) に組み込まれたCLUSTALアルゴリズムによって指定されたデフォルトパラメータを用いて作成した。

【0244】

ポリヌクレオチド配列の確証は、BLAST及び動的計画法、ジヌクレオチド最近接分析に基づいたプログラム及びアルゴリズムを用いて、ベクター及びリンカー、ポリA配列を取り除き、あいまいな塩基対をマスクすることで行った。次に、BLAST及びFASTA、BLIMPSに基づいたプログラムを用いて、公共のデータベースであるGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳類、脊椎動物、真核生物のデータベースやBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPFAMなどのデータベースから選択した配列に対してこれらの配列を問合わせて注釈を得た。Phred及びPhrap、Consedに基づいたプログラムを用いて完全長のポリヌクレオチド配列の中にこれらの配列を構築して、BLAST及びFASTA、BLIMPSに基づいたプログラムでオープンリーディングフレームのためにスクリーニングした。完全長のポリヌクレオチド配列を翻訳して対応する完全長のアミノ酸配列を引き出し、GenBankデータベース (上記) 及びSwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPrositateなどのデータベース、またはPFAMなどの隠れマルコフモデル (HMM) に基づいたタンパク質ファミリーデータベースに対して問い合わせてこれらの完全長の配列を分析した。HMMは、確率を利用して遺伝子ファミリーのコンセンサス一次構造を解析する (例えば、Eddy, S. R. (1996) Curr. Opin. Struct. Biol. 6:361-365を参照)。

【0245】

完全長のポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の構築及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO: 24-46からのポリヌクレオチド配列の断片の同定にも使用できる。約20~4000個までのヌクレオチドの断片はハイブリダイゼーション及び増幅に有用であり、上記の発明で説明した。

【0246】

4 ポリヌクレオチド発現の分析

ノーザン分析は、遺伝子の転写物の存在を検出するために用いられる実験用技術であり、特定の細胞種或いは組織からのRNAが結合されてい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を伴う (例えば、Sambrook, 前出, 7章; 及びAusubel, F. M. 他、前出, 4章及び16章を参照)。

【0247】

BLASTに用いる類似のコンピュータ技術を用いて、GenBank或いはLIFESEQ (Incyte Pharmaceuticals) のようなcDNAデータベース内の同一或いは関連する分子を検索する。この分析は多くの膜系ハイブリダイゼーションより非常に速度が速い。さらにコンピュータ検索の感度を変更して、任意の特定の一致が、厳密な一致或いは相同的一致の何れかとして分類されるかを確定することができる。検索の基準は、

【0248】

【数1】

(BLAST スコア×配列一致率)

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

として定義される積スコアである。積スコアは、0~100の標準化された値であり、以

下のように求める。BLASTスコアにヌクレオチド配列の一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。高スコアのセグメントの対(HSP)において一致する各塩基に+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(ギャップにより離隔される)。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、BLASTアラインメントの断片的重複と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%一致する場合にのみ得られる。積スコア70は、100%の一致で一端が70%重畳しているか、或いは88%一致で他端が100%重畳しているかの何れかの場合である。積スコア50は、100%の一致で一端が50%重畳しているか、或いは79%の一致で他端が100%重畳しているかの何れかの場合である。

10

【0249】

ノーザン分析の結果は、VETRPをコードする転写物が発生したライブラリの分布割合として報告される。分析には、器官/組織及び疾患によるcDNAライブラリの分類も含まれる。器官/組織のカテゴリーには、心血管、皮膚、発生、内分泌、胃腸、造血/免疫、筋骨格、神経、生殖、泌尿器が含まれる。疾患のカテゴリーには、癌、炎症、外傷、細胞増殖、神経、プール(pool)ed)が含まれる。カテゴリー別に、目的の配列を発現するライブラリの数を数えて、それを全ての範囲のライブラリの数で除した。各組織に特異的に発現する割合(パーセント)と各疾患で発現する割合を表3に示した。

【0250】

20

5 VETRP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: 24-46を構築するために用いたcDNA配列を、BLAST及びSmith-Watermanアルゴリズムを用いて、インサイト社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: 24-46と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrap(表5)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。Stanford Human Genome Center (SHGC)、Whitehead Institute for Genome Research (WIGR)及びGenethonなどの公共の情報源から入手できる放射線ハイブリッド(radiation hybrid)及び遺伝子マッピングのデータを用いて、クラスター化した配列がすでにマッピングされているかを調べる。クラスターにマッピングされた配列が含まれている場合は、そのクラスターの全ての配列(特定のSEQ ID NOを含む)をそのマッピング位置に割り当てた。

30

【0251】

SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 42、及びSEQ ID NO: 44の遺伝子地図の位置は、ヒト染色体の区間即ち範囲として本明細書の(発明)の部分に記載した。SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 36、及びSEQ ID NO: 44に対して二つ以上の地図の位置が報告されており、それにより過去にマッピングされた配列が各々のクラスターに組み入れられたSEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 36、及びSEQ ID NO: 44と完全に同一ではないが、類似性を持っているということが示される。センチモルガンで示したマッピング位置の範囲は、染色体の短腕(p)の末端から測定した(センチモルガン(cM)は、同一染色体上の遺伝子間の乗換え率に基づいた距離を表す単位である。平均すると、1cMはヒトの染色体の1メガベースに概ね等しいが、組換え率の高い部分と低い部分があるため、大きく変化し得る)。距離cMは、配列がそれぞれのクラスターに含まれている放射線ハイブリッドマーカーの境界を検出できるGenethonによってマッピングされた遺伝子マーカーに基づいている。NCBI「GeneMap99」(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap>)などの公衆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。

40

50

【0252】

6 VETRPをコードするポリヌクレオチドの伸長

SEQ ID NO: 24-46の完全長の核酸配列は、完全長分子の好適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その完全長分子の好適な断片を伸長して作製した。一方のプライマーは既知の断片の5'の伸長を開始するために合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'の伸長を開始するために合成した。開始プライマーは、OLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences)或いは他の適切なプログラムを用いて、約22個から約30個のヌクレオチドの長さで約50%以上のGC含量を有し、かつ約68~72℃の温度で標的配列にアニールするように設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体が生じないようにヌクレオチドを伸長した。 10

【0253】

選択されたヒトcDNAライブラリを用いてこの配列を伸長した。2段階以上の伸長が必要な場合、若しくは望ましい場合は、追加或いはネスト化プライマーの組を設計する。

【0254】

当分野で既知の方法を利用したPCR法で高い忠実度で増幅した。PCRはPTC-200 thermal cycler (MJ Research, Inc.) 用いて96ウェルブロックプレートで行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200 nmolの各プライマー、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ とβ-メルカプトエタノールを含むバッファー、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech 20)、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ーで増幅を行った。

ステップ1 94℃で3分間
 ステップ2 94℃で15秒
 ステップ3 60℃で1分間
 ステップ4 68℃で2分間
 ステップ5 ステップ2、3、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℃で保管 30

別法では、プライマーの組、T7とSK+に対して以下のパラメーターで増幅を行った。

ステップ1 94℃で3分間
 ステップ2 94℃で15秒
 ステップ3 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℃で保管。

【0255】

各ウェルのDNA濃度は、1X TE及び0.5 µlの希釈していないPCR産物に溶解した100 µlのPICO GREEN定量試薬(0.25% (v/v) PICO GREEN; 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。このプレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンして、サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量化する。反応混合物の5~10 µlのアリコットを1%のアガロースミニゲル上での電気泳動によって解析し、何れの反応物が配列を伸長することに成功したかを決定する。 40

【0256】

伸長したヌクレオチドを脱塩及び濃縮してから384ウェルプレートに移し、CviJI 50

コレラウィルスエンドヌクレアーゼ (Molecular Biology Research, Madison WI) で消化し、pUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) に再連結する前に音波処理またはせん断を行った。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に分離して断片を切断し、寒天をAgar ACE (Promega) で消化した。T4リガーゼ (New England Biolabs, Beverly MA) を用いて伸長したクローンをpUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) で制限部位の伸び出しを処理してコンピテント大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を選択して抗生物質を含む培地に移し、それぞれのコロニーを切りとってLB/2Xカルベニシリン培養液の384ウェルプレートに37℃で一晩培養した。

10

【0257】

細胞を溶解して、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech) 及びPfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用いて以下の手順でDNAをPCR増幅した。

ステップ1 94℃で3分間

ステップ2 94℃で15秒

ステップ3 60℃で1分間

ステップ4 72℃で2分間

ステップ5 ステップ2、3、及び4を29回繰り返す

ステップ6 72℃で5分間

ステップ7 4℃で保管。

20

上記したようにPICO GREEN試薬 (Molecular Probes) でDNAを定量化した。DNA回収率の悪いサンプルは、上記した条件で再び増幅した。サンプルを20%のジメチルサルホไซด์ (dimethylsulphoxide) (1:2, v/v) で希釈し、DYENAMIC DIRECTキット (Amersham Pharmacia Biotech) またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット (Applied Biosystems) を用いてシーケンシングした。

30

【0258】

同様に上述の手順で、SEQ ID NO: 24-46のヌクレオチド配列を利用し、この伸長のために設計したオリゴヌクレオチドと好適なゲノムライブラリを用いて5'調節配列を得た。

【0259】

7 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識化及び使用法

SEQ ID NO: 24-46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すが、より大きなcDNAフラグメントの場合でも基本的に同じ手順を用いる。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 µCiの[γ-³²P]アデノシン三リン酸 (Amersham, Chicago, IL) 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) とを組み合わせることでより標識する。標識されたオリゴヌクレオチドを、SEPHADEX G-25超精細排除デキストランビードカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。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、次のエンドヌクレアーゼ、Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba I 或いはPvu II (DuPont NEN) の1つを用いて切断したヒトゲノム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用いる。

40

【0260】

50

各切断物からのDNAを、0.7%アガロースゲル上で分画して、ナイロン製メンブラン(Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH)に転写する。ハイブリダイゼーションは40℃で16時間かけて行う。非特異的シグナルを取り除くため、例えば、最大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の条件の下、ブロットを順次室温にて洗浄する。ハイブリダイゼーションパターンをオートラジオグラフィー或いは別のイメージ化手段で視覚化して比較する。

【0261】

8 マイクロアレイ

マイクロアレイ上のアレイエレメントの連結または合成は、フォトリソグラフィ、ピエゾプリント(インクジェットプリンター、前出のBaldeschweiler等を参照)、機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生したものをを用いて達成することが可能である。上記各技術において基板は、均一な非多孔性の固体とするべきである(Schena(1999), 前出)。推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウエハがある。別法では、ドットブロット法またはスロットブロット法に類似のアレイを利用して、熱や紫外線、または化学的或いは機械的な結合手段で基板の表面にエレメントを配置して結合させることができる。通常のアレイは利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正な数のエレメントを含めることができる(Schena, M. 他(1995) Science 270:467-470、Shalon, D. 他(1996) Genome Res. 6:639-645、Marshall, A. and J. Hodgson(1998) Nat. Biotechnol. 16:27-31. を参照)。

【0262】

完全長cDNA、発現遺伝子配列断片(EST)、或いはそれらの断片やオリゴマーが、マイクロアレイのエレメントとなり得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片やオリゴマーを、LASERGENEソフトウェア(DNA STAR)などの当分野で周知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。このアレイエレメントを、生体サンプル中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせる。生体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結合する。ハイブリダイゼーションの後、生体サンプルからハイブリダイズしなかった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けるハイブリダイゼーションを検出する。別法では、レーザー脱離及び質量スペクトロメトリー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程度及び相対的存在量は、算定することができる。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。

【0263】

組織または細胞サンプルの調製

グアニジウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全RNAを単離し、オリゴ(dT)セルロース法を用いてポリ(A)⁺ RNAを精製する。各ポリ(A)⁺ RNAサンプルは、MMLV逆転写酵素、0.05 pg/μlのオリゴ(dT)プライマー(21mer)、1×第1鎖緩衝液、0.03単位/μlのRNアーゼインヒビター、500 μM dATP、500 μM dGTP、500 μM dTTP、40 μM dCTP、40 μM dCTP-Cy3(BDS)またはdCTP-Cy5(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて逆転写する。この逆転写反応は、GEMBRIGHTキット(Incyte)を用いて、200 ngのポリ(A)⁺ RNAを含む25 ml容量で行う。特異的なコントロールポリ(A)⁺ RNAは、in vitro転写により非コーディング酵母ゲノムDNAから合成する。370℃で2時間インキュベートした後、各反応サンプル(一方はCy3標識、他方はCy5標識)は、2.5 mlの0.5M 水酸化ナトリウムで処理し、850℃で20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを変性する。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つの反応サンプルを、1 ml のグリコーゲン (1 mg/ml)、60 ml の酢酸ナトリウム及び 300 ml の 100 % エタノールを用いてエタノール沈殿させる。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 μ l 5 $\times$ SSC/0.2 % SDS 中で再懸濁する。

【0264】

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 挿入断片を含むベクターを含有する細菌性細胞から増幅する。PCR 増幅は、cDNA 挿入断片に隣接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 μ g を超える最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅されたアレイエレメントは、SEPHACRYL-400 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製する。

10

【0265】

精製したアレイエレメントを、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大量の蒸留水での洗浄と、0.1 % の SDS 及びアセトン中で超音波による洗浄を行う。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、蒸留水中で広範囲にわたって洗浄し、95 % エタノール中の 0.05 % アミノプロピルシラン (Sigma) でコーティングする。コーティングしたスライドガラスは、110 $^{\circ}$ C の天火で硬化させる。

20

【0266】

米国特許第 5,807,522 号に記載されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。この特許に引用することを以って本明細書の一部とする。平均濃度が 100 ng/ μ l のアレイエレメント DNA 1 μ l 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。次にこの装置が、スライド毎に約 5 nl のアレイエレメントサンプルを分注する。

30

【0267】

マイクロアレイには、STRATALINKER UV クロスリンカー (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 回洗浄し、蒸留水で 3 回洗浄する。非特異的な結合部位は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) における 0.2 % カゼイン中で 60 $^{\circ}$ C で 30 分間マイクロアレイをインキュベートし、その後上述したように 0.2 % SDS 及び蒸留水で洗浄することによってブロックする。

【0268】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応液は、5 $\times$ SSC、0.2 % SDS ハイブリダイゼーション緩衝液に Cy 3 及び Cy 5 標識した cDNA 合成産物を各 0.2 μ g 含む 9 μ l のサンプル混合体を含めたものである。サンプル混合液を、65 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、マイクロアレイ表面上に一定量分注してから 1.8 cm² のカバーガラスで覆う。このアレイを、顕微鏡スライドより僅かに大きいキャビティを有する防水チャンバーに移す。チャンバーの角に 140 μ l の 5 $\times$ SSC を加えて、チャンバー内を湿度 100 % に保持する。このアレイを含むチャンバーを、60 $^{\circ}$ 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 $\times$ SSC, 0.1 % SDS) において 45 $^{\circ}$ C で 10 分間、第 2 洗浄緩衝液中 (0.1 $\times$ SSC) において 45 $^{\circ}$ C で 10 分間それぞれ 3 回洗浄し、その後乾燥させる。

40

【0269】

50

検出

レポーター標識されたハイブリダイゼーション複合体は、Cy 3を励起するための488 nm、及びCy 3を励起するための632 nmのスペクトル線を生成し得るInnova 70混合ガス10 Wレーザー(Coherent, Inc., Santa Clara CA)を備えた顕微鏡で検出する。20倍の顕微鏡対物レンズ(Nikon, Inc., Melville NY)を用いて、アレイ上に励起レーザー光を集中させる。このアレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御X-Yステージに置き、対物レンズを通してラスタスキャンする。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する。

【0270】

2つの異なるスキャンにおいて、混合ガスマルチラインレーザーは2つの蛍光体を連続的に励起する。放射された光は、波長に基づいて2つの蛍光体に対応する2つの光電子増倍管検出器(PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ)に分割される。アレイと光電子増倍管との間に配設された好適なフィルターを用いて信号をフィルタリングする。用いる蛍光体の最大発光は、Cy 3では565 nm、Cy 5では650 nmである。装置は両方の蛍光体からのスペクトルを同時に記録できるが、レーザー源に好適なフィルターを用いて、蛍光体1つにつき1回スキャンし、各アレイを通常2回スキャンする。

【0271】

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コントロール種により生成されるシグナル強度を用いて校正する。アレイ上の特定の位置には相補的DNA配列を含め、その位置におけるシグナルの強度がハイブリダイズする種の重量比1:100, 000に相関するようにする。異なる試料(例えば検査細胞及びコントロール細胞を代表する)からの2つのサンプルを、各々異なる蛍光体で標識し、他と異なって発現する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させる場合には、校正は2つの蛍光体を有する校正するcDNAのサンプルを標識して、ハイブリダイゼーション混合液に各々等量を加えて行う。

【0272】

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、リニア20色変換を用いてシグナル強度が青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までの擬似カラー範囲にマッピングされるイメージとして表示される。データはまた、定量的に分析される。2つの異なる蛍光体を同時に励起して測定する場合には、各蛍光体の発光スペクトルを用いて、先ずデータは蛍光体間の光学的漏話(重複発光スペクトルに起因する)に対して補正される。

【0273】

グリッドを蛍光シグナルイメージ上に重畳して、各スポットからのシグナルがグリッドの各エレメントに中央に位置するようにする。各エレメント内の蛍光シグナルを統合し、シグナルの平均強度に対応する数値を得る。シグナル分析に用いるソフトウェアは、GEM TOOLS遺伝子発現分析プログラム(Incyte)である。

【0274】9 相補的ポリヌクレオチド

VE TRP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VE TRPの発現を低下させるため即ち阻害するために用いられる。約15～約30個の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、より小さな或いはより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。Oligo 4.06ソフトウェア(National Biosciences)及びVE TRP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'配列から相補的な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

10

20

30

40

50

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VETRPをコードする転写物に結合するのを阻害する。

【0275】

10 VETRPの発現

VETRP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VETRPが発現するために、抗生物質耐性及びcDNAの転写レベルを高める誘導性のプロモーターを含む好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターには、lacオペレーター調節エレメントに関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定されるものではない。組換えベクターを、BL21 (DE3)などの好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピルβ-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発されるとVETRPを発現する。真核細胞でのVETRP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Autographica californica核多面性ウイルス(AcMNPV)を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子を、相同組換え或いは転移プラスミドの媒介を伴う細菌の媒介による遺伝子転移のどちらかによって、VETRP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、強いポリヘドリンプロモータ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。(例えば、Engelhard, E. K. 他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945. を参照)。

【0276】

殆どの発現系では、VETRP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。Schistosoma japonicumからの26キロダルトンの酵素GSTによって、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で固定されたグルタチオンで融合タンパク質の精製が可能となる(Amersham Pharmacia Biotech)。精製の後、GST部分を特定の操作部位でVETRPからタンパク質分解的に切断できる。アミノ酸8個のペプチドであるFLAGで、市販のモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体(Eastman Kodak)を用いた免疫親和性の精製が可能となる。6個の連続するヒスチジン残基のストレッチである6-Hisによって、金属キレート樹脂(QIAGEN)で精製が可能となる。タンパク質の発現及び精製の方法は、Ausubel (1995, 前出, ch 10, 16)に記載されている。これらの方法で精製したVETRPを直接用いて以下の実施例11及び15のアッセイを行うことができる。

【0277】

11 VETRPの活性の実証

VETRPの活性は、コートされた小胞体の含有物によって測定する。VETRPは、COS7やHeLa若しくはCHOのような哺乳動物細胞株をVETRPをコード化するベクターの真核細胞発現ベクターと共に形質転換することで発現可能である。真核細胞発現ベクターは市販されており、それらを細胞に導入する手法は当該者にはよく知られている。外来DNAを吸収し、発現した細胞の迅速な同定を可能にするために、β-ガラクトシダーゼのような数あるマーカー遺伝子のどれか一つを発現する少量の第2プラスミドを細胞の中に同時形質転換する。これらの細胞は、細胞株がVETRP及びβ-ガラクトシダーゼを発現し、蓄積し得る適切な状況下で形質転換した後に48〜72時間培養する。

【0278】

10

20

30

40

50

形質転換した細胞を集めて、細胞の溶解物の小胞体形成に対する分析をする。非加水分解性形態でのGTP、GTPγS、及びATP再生系をこの溶解物に加え、その混合物を37°Cで10分間培養する。これらの条件下では90%以上の小胞体がコートされたまま残る(Orcl, L. 他(1989) Cell 56:357-368)。輸送小胞体をゴルジ膜から塩遊離し、ショ糖濃度勾配がつくり、遠心分離し、そしてフラクションが集め、SDS-PAGEによって解析する。クラスリン若しくはCOPコートマーとのVETRPの共存が、小胞体形成中のVETRP活性を示す。小胞体形成中のVETRPの寄与は溶解物を、GTPγS付加物よりVETRPに優先的に特異的に働く抗体と一緒に培養することで確かめることができる。この抗体はVETRPと結合してその活動を妨げ、それによって小胞体の形成を妨げる。

10

【0279】

他の方法として、VETRP活性を小胞輸送経路の変更性能によって測定する。VETRPによって形質転換された細胞中の小胞体輸送を蛍光顕微鏡検査法を用いて検査する。トランスフェリンやマンノース6-リン酸受容体のような小胞体コートタンパク質若しくは代表的な小胞体輸送の基質に対して特異的に働く抗体は市販されている。ER、ゴルジ体、ペルオキシソーム、エンドソーム、リソソーム、及び形質膜のような様々な細胞のコンポーネントを検査する。対照細胞との比較により得られる、VETRPによって形質転換された細胞中の小胞体の数及び位置の交替がVETRP活性の特性である。

【0280】

1.2 機能のアッセイ

20

VETRPの機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでのVETRP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ニングする。このようなベクターには、pCMV SPORTTM (Life Technologies) 及びpCR 3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) が含まれ、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを含んでいる。5~10μgの組換えベクターを、例えば内皮由来か造血由来のヒト細胞株にリポソーム製剤或いは電気穿孔法によって一時的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1~2μgのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入された細胞と形質移入されていない細胞とを区別できる。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。このような標識タンパク質には、緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、及びCD64またはCD64-GFP融合タンパク質が含まれる。レーザー光学に基づいた技術を利用した自動流動細胞計測法(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。また、FCMで、先行した或いは同時の細胞死の現象を診断する蛍光分子の取り込みを検出して計量する。これらの現象には、プロピジウムヨウ化物でのDNAの染色によって計測される核DNA内容物の変化と、プロモデオキシウリジンの取り込み量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節と、特異的な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のタンパク質の発現の変化と、蛍光複合アネキシンVタンパク質の細胞表面への結合によって計測される原形質膜組成の変化とが含まれる。流動細胞計測法は、Ormerod, M. G. による(1994) Flow Cytometry Oxford, New York, NY. に記載されている。

30

40

【0281】

遺伝子発現におけるVETRPの影響は、VETRP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)の保存された領域と結合する。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か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, N

50

Y)。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。VETRP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。

【0282】

1.3 VETRPに特異的な抗体の作製

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

【0283】

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

【0284】

通常、約15残基の長さのオリゴペプチドを、Applied BiosystemsのABI 431Aペプチドシンセサイザー(PE Biosystems)を用いてfmoc法のケミストリにより合成し、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)を用いた反応によりKLH(Sigma-Aldrich, St. Louis MO)に結合させて、免疫原性を高める(例えば、前出のAusubel, 1995を参照)。フロイントの完全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抗VETRP活性を検査するには、ペプチドまたはVETRPを基板に結合し、1%BSAを用いてブロッキング処理し、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0285】

1.4 特異的な抗体を用いる天然VETRPの精製

天然VETRP或いは組換えVETRPを、VETRP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VETRP抗体とを共有結合させることにより形成する。結合の後、そのレジンを製造者の使用説明書に従ってブロッキング処理し洗浄する。

【0286】

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

【0287】

1.5 VETRPと相互作用する分子の同定

VETRPまたは生物学的に活性なその断片を、¹²⁵Iボルトンハンター試薬(例えば、Bolton A. E. 及びW. M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529を参照)で標識する。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VETRPと共にインキュベートし、洗浄して、標識したVETRP複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なVETRP濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したVETRPの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

【0288】

10

20

30

40

50

別法では、V E T R P と相互作用する分子を、F i e l d s , S . 及び O . S o n g (1 9 8 9 , N a t u r e 3 4 0 : 2 4 5 - 2 4 6) に記載の酵母 2 - ハイブリッドシステム (y e a s t t w o - h y b r i d s y s t e m) や M A T C H M A K E R システム (C l o n t e c h) 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。

【0289】

V E T R P はまた、ハイスループット型の酵母 2 ハイブリッドシステムを使用する P A T H C A L L I N G プロセス (C u r a G e n C o r p . , N e w H a v e n C T) に用いて、遺伝子の 2 つの大きなライブラリによってコードされるタンパク質間の全ての相互作用を決定することができる (N a n d a b a l a n , K . 他 (2 0 0 0) 米国特許第 6 , 0 5 7 , 1 0 1 号) 。 10

【0290】

当業者は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく本発明の記載した方法及びシステムの種々の改変を行うことができるであろう。特定の好適実施例に基づいて本発明を説明したが、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、分子生物学或いは関連する分野の専門家には明らかな、本明細書に記載の本発明の実施例の様々な改変は、特許請求の範囲に含まれる。

【0291】

(表の簡単な説明)

表 1 は、V E T R P をコードする完全長の配列を作り出すために用いた、ポリペプチド配列及びヌクレオチド配列の配列番号 (S E Q I D N O) 、クローン識別番号、c D N A ライブラリ、及び c D N A 断片を示す。 20

【0292】

表 2 は、潜在モチーフ及び相同配列を含む各ポリペプチド配列の特徴、並びに V E T R P の解析に用いた方法、アルゴリズム、及び検索可能なデータベースを示す。

【0293】

表 3 は、各核酸配列の選択された断片と、ノーザン分析によって決定された各核酸配列の組織特異的発現パターンと、これらの組織に関連した疾患、異常症及び症状と、各 D N A がクローニングされたベクターとを示す。

【0294】

表 4 は、V E T R P をコードする c D N A クローンを単離した c D N A ライブラリの作製に用いた組織を示す。 30

【0295】

表 5 は、本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドの分析に用いたツール、プログラム、及びアルゴリズム、並びにその説明、引用文献、閾値パラメーターを示す。

【表 1】

表1-1

ポリペプチド SEQ ID NO:	スクレオサド SEQ ID NO:	クローン ID	ライブラリ	断片
1	24	381039	HYPONOB01	381039H1 (HYPONOB01), 1558030F6 (BLADTUT04), 1653756H1 (PROSTUT08), 2327916X32C1 (COLNNOT11), 2327916X57C1 (COLNNOT11), 2503308H1 (CONUTUT01), 2649725F6 (KIDNFET01), 3105456F6 (HEAQNOT05), 3278946H1 (STOMFET02)
2	25	383249	HYPONOB01	383249H1 (HYPONOB01), 4310090T6 (BRAUNOT01), SXEC01838V1, SXEC00070V1, SCOA04368V1, SXEC00956V1
3	26	618769	PGANNOT01	618769H1 (PGANNOT01), 618769G6 (PGANNOT01), 897423R1 (BRSTNOT05), 897423T1 (BRSTNOT05), 2225425T6 (SEMNNOT01), 3026516F6 (HEARFET02), 3031626H2 (TYMNOT05)
4	27	1234837	LUNGFET03	763436R1 (BRAITUT02), 1234837H1 (LUNGFET03), 1237053F6 (LUNGFET03), 1721325F6 (BLADNOT06), 2751788R7 (THP1AZS08), 8777187
5	28	1607223	LUNGNOT15	1250975F6 (LUNGFET03), 1270831F1 (TESTTUT02), 1399306F1 (BRAITUT08), 1607223H1 (LUNGNOT15), 1684804F6 (PROSNOT15), 1803848F6 (SINTNOT13), 2814466T6 (OVARNOT10), 3274147F6 (PROSBPT06), 3289542F6 (BONRFET01), SCFA04890V1
6	29	1621554	BRAITUT13	795816F1 (OVARNOT03), 795816R1 (OVARNOT03), 855789R1 (NGANNOT01), 1357564T6 (LUNGNOT09), 1621554H1 (BRAITUT13), 2081463H1 (UTRSNOT08), 2474413F6 (SMCANOT01), 2812794F6 (OVARNOT10), 3296847H1 (TLXJINT01), 4642794H1 (PROSINT03)
7	30	1751553	LIVRUT01	816693R6 (OVARNOT01), 816693X311D1 (OVARNOT01), 816693X313D1 (OVARNOT01), 1678292F6 (STOMFET01), 1678292T6 (STOMFET01), 1751553H1 (LIVRUT01), 1981902R6 (LUNGFUT03), 1981902T6 (LUNGFUT03), 3050018H1 (LUNGNOT25), 4419520T6 (LIVRUT02), 5208961H1 (BRAFNOT02), 82823700
8	31	1832403	BRAINNO1	025882F1 (SPINFET01), 1255756F2 (MENITUT03), 1832403H1 (BRAINNO1), 2305321R6 (NGANNOT01)

10

20

30

40

表1-2

ポリペプチド SEQ ID NO:	ヌクレオチド SEQ ID NO:	クローン ID	ライブラリ	断片
9	32	1971747	UCMCL5T01	285815F1 (EOSIHE202), 936208R1 (CEKVN0T01), 1510143H1 (LUNGNOT14), 1673683F6 (BLADNOT05), 1912830F6 (LEUKNOT02), 1971747F6 (UCMCL5T01), 1971747H1 (UCMCL5T01), 2264823R6 (UTRSNOT02), 2858746F6 (SININOT03), 3108785F6 (BRSTTUT15), 3391023H1 (LUNGUT17), 3736985F6 (SMCCN0S01), SEVA02967V1, SEVA04682V1, SBVA04527V1, g3882214
10	33	2285348	BRAIN0N01	228256F1 (FAMCNOT01), 453676H1 (TLYMNOT02), 857831R1 (NGANNOT01), 1350071F1 (LATRTTUT02), 1558538F1 (SPLNNOT04), 2170558F6 (ENDCNOT03), 2285348R1 (BRAIN0N01), 2291739T6 (BRAIN0N01), 2418450F6 (ENH3AZT01), 2717843F6 (THYRN0T09), 3404595F6 (ESOCNOT03), 3427632F6 (BRSTN0H01)
11	34	2374186	ISLTN0T01	1309077F1 (COLNPT02), 1526217F1 (UCMCL5T01), 2374186H1 (ISLTN0T01), 3581348F6 (293TF3T01), 3581348T6 (293TF3T01), SCGA06229V1, SCGA12945V1, SCGA02017V1, SCGA13028V1
12	35	2476232	SMCAN0T01	1394147T1 (THYRN0T03), 1709170F6 (PROSN0T16), 2476232F6 (SMCAN0T01), 2476232H1 (SMCAN0T01), 2733026T6 (OVARUT04), 3589738H1 (293TF5T01), 4638417T6 (XYEPTXT01), 5027954H1 (COLCDIT01)
13	36	2503986	CONUTUT01	449043X14 (TLYMNOT02), 632170R6 (KIDNNOT05), 1450259F1 (PENITUT01), 1798335F6 (COLNNOT27), 2503986H1 (CONUTUT01), 2872984H1 (THYRN0T10), 3004241T6 (TLYMNOT06), 3027284T6 (HEARPT02), SBFA03755F1, SBFA04352F1, SBFA04597F1, SBFA00555F1, SBFA01887F1
14	37	2596566	OVARUT02	349546R6 (LVENNOT01), 840332R1 (PROSTUT05), 133340F6 (COLNNOT13), 1628086F6 (COLNPT01), 3293723F6 (TLYNINT01), 4008413H1 (ENDCNOT04), 4818893H1 (PROSTUT17), 2596566H2 (OVARUT02)

10

20

30

40

表1-3

ポリペプチド SEQ ID NO:	スクレオチド SEQ ID NO:	クローン ID	ライブラリ	断片
15	38	2685253	LUNGNOT23	680657R6 (UTRSNOT2), 736092R1 (TONGNOT01), 1486268T6 (CORPNOT2), 2445454T6 (PHEPINOT03), 2685253H1 (LUNGNOT23), 3731545H1 (SMCCNON03), 4020957H1 (BRAXNOT02), 4741584H1 (THYMNOR02), SZAT00201V1, SZAT01557V1, SZAT01529V1, SZAT00077V1, SZAT01181V1, SZAT01587V1, SZAT00683V1, SZAT00014V1, SZAT00017V1, 2685254H1 (LUNGNOT23), 2762252H1 (BRSTNOT12), 2766358F6 (BRSTNOT12), 2766358T6 (BRSTNOT12), 4364345H1 (SKIRNOT01), 93560562
16	39	2762252	BRSTNOT12	2685254H1 (LUNGNOT23), 2762252H1 (BRSTNOT12), 2766358F6 (BRSTNOT12), 2766358T6 (BRSTNOT12), 4364345H1 (SKIRNOT01), 93560562
17	40	3452009	UTRSNON03	3149588T6 (ADRENON04), 3452009H1 (UTRSNON03), SBHA03400F1, SBHA02544F1, SBHA03511F1
18	41	4644780	PROSTMT03	1494403R6 (PROSNON01), 1818377F6 (PROSNOT20), 3362284H1 (PROSBT02), 3364760T6 (PROSBT02), 4643280H1 (PROSTMT03), 4644736H1 (PROSTMT03), 4815885H1 (PROSTMT03), 5423826H1 (PROSTMT07), 5424290H1 (PROSTMT07)
19	42	4946103	SINTNOT25	1482075H1 (CORPNOT2), 1729337F6 (BRSTTUT08), 1729337X14C1 (BRSTTUT08), 1729337X16C1 (BRSTTUT08), 1730230X11C1 (BRSTTUT08), 1899544F6 (BLADTUT06), 2290603R6 (BRAINON01), 3042988H1 (HEAANOT01), 4946103H1 (SINTNOT25), SBAA00190F1, SBAA03996F1
20	43	5562355	BRSTDIT01	1909929F6 (CONNTUT01), 4027671H1 (BRAINOT23), 5091054F6 (UTRSTMR01), 5512655H1 (BRADDIR01), 5562355H1 (BRSTDIT01), g1625519
21	44	5678824	BRAENOT02	320465F1 (BOSIHET02), 506242X23R1 (TWLR3DT02), 1255854F2 (MENITUT03), 1351588F6 (LATRTUT02), 2051796F6 (LIVRFET02), 3421889H1 (UCMCNOT04), 5678824H1 (BRAENOT02), SCAA06386V1, SCAA02158V1, SBVA05287U1, SCAA04949V1

10

20

30

40

表1-4

ポリペプチド SEQ ID NO:	ヌクレオチド SEQ ID NO:	クローン ID	ライブラリ	断片
22	45	5870962	COLTDIT04	1415307F6 (BRAINT012), 1504159F6 (BRAINT07), 1692553T6 (COLNNT023), 1868556T6 (SKINBT01), 2911311H1 (KIDNTUT15), 2912463F6 (KIDNTUT15), 2926162T6 (TYMNNT04), 5121545H1 (SMCBUNT01), 5812063H1 (KIDCTWT02), 5870962H1 (COLTDIT04), 6094909H1 (THP1TXX03)
23	46	2818605		2818605F6 (ERSTNNT14), 4904212T6 (TYMNNT08), 1495645T6 (PROSNNT01)

10

20

30

40

表2-1

ポリ- ペプチド SEQ ID NO	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 (signature) 配列, ドメイン及びモチーフ	相同配列	分析方法及び データベース
1	481	S222 T56 T90 T92 S168 S313 S436 S217 S442	N433	ADPリボシル化因子 のための推定GTP酵素 活性化タンパク質(ArFGAP); C30-G153 HIV REV相互作用 タンパク質; N44-P80, V83-N104, N43-W144 GATA-型ジンクフィンガー ドメイン; N44-E93	g3135319 ヌクレオリン (ヒト) Mikoshiba K 他(1998) Chem Phys Lipids 98:59-67; Salcni A E 他(1997) Genes Dev. 11:2239-2249; Glockner G 他(1998) Genome Res. 8: 1060-1073	Motifs BLAST-GENBANK BLIMPS_PRINTS BLAST_DOMO HMMER_PFBM BLIMPS_PRODOR
2	195	S40 S110 S144		ポドカリキシン様 タンパク質; M1-T195 P24タンパク質; M1-T195	g1890141 神経オルガネラ 輸送タンパク質 P24 (ハシカネズミ) Kadota Y 他(1997) Brain Res. Mol. Brain Res. 46:265-273	Motifs BLAST-GENBANK BLAST_PRODOR

10

20

30

40

表2-2

ポリ- ペプチド SEQ ID NO	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 (signature) 配列, ドメイン及びモチーフ	相同配列	分析方法及び データベース
3	313	T66 T76 S150 T212 S251 T256 S277 T80 S130 T155	N8	タンパク質キナーゼ C O2 ドメイン: L26-T115, L185-T273 タンパク質キナーゼ C O2 ドメイン: I13-Q69 C2ドメインモチーフ: L54-E79 G11-T128	#5926736 グラニコリン- a (ハツカネズミ) Wang, J.他(1999) J. Biol. Chem. 274: 28542- 28548	Motifs BLAST-GENBANK HMMER_Pfam PROFILES-SCAN BLIMPS_Pfam BLAST_DOMO
4	201	S11 T14 S82 T94 S119 T149		SNF7 核内転写 調節タンパク質 モチーフ: N3-E166	#3873551 コイルドコイルタンパク質 (酵母)	Motifs BLAST-GENBANK BLAST_PRODOM
5	566	S112 S171 S195 S250 S282 S345 T381 T443 S503 T542 T547 S26 S35 S139 T377 S433 Y47	N213 N387	γ-アダプチングラスリン アセンブリタンパク質 コンプレックス: S407-W563 γ-アダプチンモチーフ: M331-F541	#561444 ハツカネズミと関係ある γアダプチン (ヒト) Nagase, T. 他(1995) DNA Res. 2:167-174	Motifs BLAST-GENBANK BLAST_PRODOM BLAST_DOMO
6	270	S192 S34 T91 S131 T146 T266 T18 T50 S187 S246		ソーティングネキシン 10 (ヒト) Kurten, R.他(1996) Science 272:1008-1010	#4889260 ソーティングネキシン 10 (ヒト) Kurten, R.他(1996) Science 272:1008-1010	Motifs BLAST-GENBANK

10

20

30

40

表2-3

ポリ- ペプチド SEQ ID NO	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(signature)配列, ドメイン及びモチーフ	相同配列	分析方法及び データベース
7	490	S205 T320 T407 S94 S106 S156 S174 S218 S235 S255 S279 T320 S332 S397 S430 T18 S50 S102 S141 T162 S182 S200 S201 S208 S263 T304 T315 S327 S445	N22 N38 N180 N209 N234	C2ドメイン 1368-1456	g2724126 シテプトタグミンVII (ヒト) Cooper P.R.他(1998) Genomics 49: 419-429	Motifs BLAST-GENBANK HMMER_FFAM
8	136	T20 S50 T20 T117 Y81 Y129	N110		g2206090 スナップインSNARE-関連 シナプス伝達タンパク質 (ハツカネズミ) Icardi J.M.他(1998) Nat. Neurosci. 2: 119-124	Motifs BLAST-GENBANK

表2-4

ポリ- ペプチド SEQ ID NO	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコ シ化部位	シグネチャ (signature) 配列, ドメイン及びモチーフ	相同配列	分析方法及び データベース
9	1104	T269 T816 T26 S27 T32 S4 S12 S123 S132 T182 S288 S342 S427 S453 S470 S506 T566 S626 T637 T752 T773 T826 S918 S933 S950 T959 S963 S101 T116 S123 S469 S686 S758 T769 T789 S831 S997 T1022 S1027 S1058	N212 N273 N1062	膜貫通モチーフ: Y69-R82 ATP-GTP結合部位: G667-S674 C2プロファイル: L649-K735 I331-K417, L988-Q1077, L800-S877, L480-T558 C2ドメイン: V670-L682 E694-I707, L1014-E1039 L716-D724, Gタンパク質-結合 受容体: S881-L897 C2ドメイン: G973-D1097	g4193489 GLUT4 小胞体タンパク質 (トプネズミ) Hashiranoto M (1998) Adv. Exp. Med. Biol. 441: 47-61. Morris N.J. 他 (1999) Biochim. Biophys. Acta 1431: 525-530	Motifs BLAST-GENBANK HMMER HMMER_Pfam BLIMPS_PRINTS BLAST_DOMO BLIMPS_Pfam
10	411	S15 S19 S29 S49 T84 S135 T209 T322 S387 T406 S19 S75 T117 T128 T322	N27 N126 N237		g3560143 推定空胞性タンパク質 ソーティング 関連タンパク質 (酵母)	Motifs BLAST-GENBANK
11	201	S28 S141 S183 T44 Y171			g4689262 ソーティングネキシン 11 (ヒト)	Motifs BLAST-GENBANK

10

20

30

40

表2-5

ポリ- ペプチド (SF0 ID NO)	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコ シレ化部位	シグネチャ(signature)配列、 ドメイン及びモチーフ	相同配列	分析方法及び データベース
12	476	S61 S6 T44 S74 S156 S207 T245 T306 T330 T432 S6 T162 T245 S323	N43 N192 N305 N345 N385 N418		g3483017 TOMI-様 タンパク質 (ヒト) Seroussi E.他(1999) Genomics 57: 380-388	Motifs BLAST-GENEBANK
13	1220	T1108 S81 T194 S233 S269 T434 S440 S465 T467 S527 S584 T674 S716 T1121 T1122 S1133 S66 S190 S211 T613 S799 S986 T1104 T1108 T1139 S1147 Y495 Y154 Y182	N40 N143 N562 N1181 N1197	WEBIタンパク質 輸送タンパク質: M1-M229	g41044321 小胞体関連 タンパク質 (トブネズミ)	Motifs BLAST-GENEBANK BLIMPS_PRODOR
14	222	T58 S93 T103 Y154 Y182	N197	フレクストリン 相同ドメイン: A2-T109	g6013425 エペクチン-2 (ハツカネズミ) Krappe R.他(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 4633-4638	Motifs BLAST-GENEBANK HMMER_PFBM

表2-6

ポリ- ペプチド SF0 ID NO	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 (signature) 配列, ドメイン及びモチーフ	相同配列	分析方法及び データベース
15	924	S431 S14 S145 T178 T211 T330 T349 S387 S435 S525 T563 T574 T594 T651 T675 S691 S698 S751 S889 T25 T77 S89 T118 S128 T231 T239 S269 S426 T440 T554 S631 S674 S876 Y534	N164 N174 N177 N411 N475	ATP-GTP結合部位: A309-T316 エキソシストコンプレックス コンポーネント: N494-S918	g2827158 rsec5 エキソシスト コンプレックスサブユニット (ドメイン) Kee.Y 他 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 14438-14443	Motifs BLAST-GENBANK BLAST_PRODOM
16	435	T48 T63 S239 S241 T256 S261 S308 S313 S370 S390 T409 T426 T44 S86 T137 T164 S317 S325 T398 Y230	N254 N404 N407 N418		g3560561 PAM COOH-末端 相互作用タンパク質 (ドメイン) Chen.L 他 (1998) J. Biol. Chem. 273: 33524-33532	Motifs BLAST-GENBANK

10

20

30

40

表2-7

ポリ- ペプチド SEQ ID NO	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 (signature) 配列, ドメイン及びモチーフ	相同配列	分析方法及び データベース
17	321	T72 S130 S168 S226 S253 S280 S104 T264	N41 N262	空胞性ソナーチン- タンパク質: L17-P152	g3319953 TOM1 (ヒト) Seroussi E 他(1999) Genomics 57: 380-388	Motifs BLAST-GENBANK BLAST_PRODOM
18	499	S89 S140 T207 S209 S223 T259 S267 S456 S463 S38 S72 T264 S351 T481	N75 N461	シグナルペプチド: M1-T25 レクチン前駆体: S38-P235 管腔ドメイン: P9-D215	g606828 ar-Golジマンノース 特異レクチン (ヒト) Arar G 他(1995) J Biol Chem 270: 3551-3553	Motifs BLAST-GENBANK BLAST_PRODOM BLAST_DOMO HMMER
19	879	T14 S104 T150 S183 S236 S237 S244 S271 T436 S476 S484 S486 T494 S505 T533 S559 T708 S731 S834 T864 T44 S58 S210 S297 S382 S440 S449 T627 S649 S705 Y403 Y687 Y785 Y814	N131 N146 N482 N703		g2078441 酵母 S. Cerevisiae 細胞内タンパク質 輸送タンパク質類似 (線虫) Wilson R 他(1994) Nature 368: 32-38	Motifs BLAST-GENBANK

10

20

30

40

表2-8

ポリ- ペプチド SEQ ID NO	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 (signature) 配列, ドメイン及びモチーフ	相同配列	分析方法及び データベース
20	298	T36 S77 S84 T126 S201 S270	N57 N158	NSF吸着タンパク質 シグネチャ: R37-K66, A100-F117, E129-E146, N162-Y185, M193-C212, P233-E253, K264-K284 NSF吸着 タンパク質: K19-D294 可溶性吸着 タンパク質SNAP: M1-E292	s3929617 α SNAP(血小板 SNARE- 関連タンパク質) (ヒト) Lemons P P 他(1997) Blood 80: 1490-1500	Motifs BLAST-GENEANK BLIMPS PRINTS BLAST_PRODOR BLAST_DOMO
21	941	S293 S478 T941 T50 S101 T147 S217 T299 T325 T359 S468 S478 S579 T625 S707 S718 S827 S849 S851 S853 S923 S54 S217 S306 S467 S656 T800 S813 T918 S937 Y532 Y737	N435 N763 N892	ATP/GTP結合部位: A193-T200 ジクアインガ-C3HC4: C822-C860, K815-C860 PHDフィンガー: H835-S849 ATP-結合空胞性 生物発生タンパク質: L146-D466	s666102 空胞性生物発生タンパク質 END(PEP6) タンパク質 (出芽酵母) Woolford C.(1990) Genetics 125: 739-752	Motifs BLAST-GENEANK EMMER_PPFAM BLIMPS_PPFAM BLAST_PRODOR BLAST_DOMO

10

20

30

40

表2-9

ポリ- ペプチド SEQ ID NO	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(signature)配列, ドメイン及びモチーフ	相同配列	分析方法及び データベース
22	336	T87 S130 T161 S43 T192 T267 T294 S301 T302 T318 T113 T125 T226 S227 T288	N117 N246	C2ドメイン: L47-E136, V196-R283, S34-V80 C2ドメインシグネチャ: K63-L75, K92-K105, L137-D145 C2ドメイン: L28-L137	g5926736 グラニューフィリン-a (ハソカネズミ) Wang, J. Biol. Chem. 274: 28542-28548	Motifs BLAST-GENEANK HMMER_PFBM BLIMPS_PRINTS BLAST_DOMO PROFLESCAN
23	163	T11 T54 S145 T155 S86	N125	アンギリン反復: K64-R96, E97-V129, F130-K162	g6624055 アンギリンモチーフ類似 (ヒト) Sulston, J.E. と Waterston, R. (1998) Genome Res. 8: 1097-1108	MOTIFS HMMER_PFBM

表3-1

ヌクレオチド SEQ ID NO	選択された断片	発現組織 (割合)	疾患または病態 (割合)	ベクター
24	1-292 686-1285 1715-1983	胃腸 神経 心血管 生殖	癌 炎症 細胞増殖 (0.417) (0.208) (0.167)	PELUESCRIPT
25	1302-1559	神経	癌 炎症 外傷 (0.250) (0.250) (0.167)	PELUESCRIPT
26	1-386 1034-1179	生殖 筋骨格	癌 炎症 細胞増殖 (0.615) (0.154) (0.077)	PSPORT1
27	1-1124	生殖 心血管 神経	癌 細胞増殖 炎症 (0.404) (0.298) (0.234)	PINCY
28	1-839 1697-2291	生殖 胃腸 神経	癌 炎症 細胞増殖 (0.540) (0.207) (0.138)	PINCY
29	1-1509	生殖 神経 内分泌 胃腸	癌 細胞増殖 炎症 (0.447) (0.191) (0.191)	PINCY
30	659-1352 1976-2599	生殖 心血管 胃腸	癌 炎症 外傷 (0.576) (0.212) (0.121)	PINCY
31	1-415	生殖 神経 胃腸	癌 細胞増殖 炎症 (0.500) (0.182) (0.182)	PSPORT1
32	1-578 1020-3418	生殖 造血/免疫 神経	癌 炎症 細胞増殖 (0.401) (0.310) (0.176)	PELUESCRIPT

10

20

30

40

表3-2

ヌクレオチド SEQ ID NO	選択された断片	発現組織 (割合)	疾患または病態 (割合)	ベクター
33	696-916	生殖 (0.255)	癌 (0.510)	PSPORT1
	1980-2046	心血管 (0.157)	炎症 (0.196)	
	2794-3343	神経 (0.137)	外傷 (0.157)	
34	473-730	神経 (0.278)	癌 (0.417)	P1N1Y
	1404-1496	造血/免疫 (0.208)	炎症 (0.347)	
		胃腸 (0.125)	細胞増殖 (0.153)	
35	1-42	生殖 (0.341)	癌 (0.636)	P1N1Y
	1247-1482	胃腸 (0.205)	細胞増殖 (0.114)	
		泌尿器 (0.114)	炎症 (0.114)	
36	1-948	生殖 (0.231)	癌 (0.467)	P1N1Y
	1687-1972	神経 (0.166)	炎症 (0.226)	
	2448-2534	造血/免疫 (0.126)	細胞増殖 (0.196)	
37	2800-2960			P1N1Y
	3035-3074			
	1-38	造血/免疫 (0.222)	炎症 (0.370)	
38	1-71	神経 (0.204)	癌 (0.352)	P1N1Y
	565-625	生殖 (0.250)	細胞増殖 (0.259)	
	1142-2946	神経 (0.235)	癌 (0.368)	
39	3445-3899	胃腸 (0.132)	炎症 (0.265)	P1N1Y
	1-33		細胞増殖 (0.162)	
	601-723	心血管 (0.250)	癌 (0.250)	
40	993-1319	皮膚 (0.250)	炎症 (0.250)	P1N1Y
	1467-1551	生殖 (0.250)	外傷 (0.250)	
	1-72	泌尿器 (0.250)		
40	651-1014	生殖 (0.267)	癌 (0.333)	P1N1Y
	1066-1088	胃腸 (0.200)	炎症 (0.267)	
		造血/免疫 (0.133)	外傷 (0.200)	
		神経 (0.133)		
		泌尿器 (0.133)		

表3-3

スクレオナード SEQ ID NO	選択された断片	発現組織 (割合)	疾患または病態 (割合)	ペクター
41	1-1367	生殖 (0.75)	癌 (0.75) 外傷 (0.167)	PINCY
42	1-569 1069-2802	神経 (0.193) 生殖 (0.193) 胃腸 (0.169)	癌 (0.422) 細胞増殖 (0.253) 炎症 (0.229)	PINCY
43		神経 (0.600) 筋骨格 (0.300) 生殖 (0.100)	癌 (0.600) 神経 (0.200) 外傷 (0.100)	PINCY
44	1-600	造血/免疫 (0.192) 生殖 (0.192) 神経 (0.179)	癌 (0.410) 炎症 (0.295) 細胞増殖 (0.167)	PINCY
45	1-1363	生殖 (0.298) 胃腸 (0.234) 神経 (0.149)	癌 (0.532) 炎症 (0.234) 細胞増殖 (0.149)	PINCY
46	1-448 388-985 529-1034	胸部 (0.149) リンパ球 (0.149) 前立腺 (0.149)	癌 (0.149) 炎症 (0.149) 細胞増殖 (0.149)	

10

20

30

40

ヌクレオチド SEQ ID NO:	ライブラリ	ライブラリの説明
24	HYPON0B01	ライブラリは、16～75歳の白人男女ドナー51人の視床下部から単離したRNA(Clontech社の#6579-2)を用いて作製した。
25	HYPON0B01	ライブラリは、16～75歳の白人男女ドナー51人の視床下部から単離したRNA(Clontech社の#6579-2)を用いて作製した。
26	PGANN0T01	ライブラリは、46歳の白人男性の腹腔内領域から採取したパラガングリオン腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には良性のパラガングリオーマであり、莢膜に浸透しないグレード2の腎細胞癌、明細胞型に関連する。この腫瘍に対し外科的縁は陰性であった。
27	LUNGFET03	ライブラリは、妊娠20週目に死亡した白人の女胎児から採取された肺組織から単離したRNAを用いて作製した。
28	LUNGNO1T15	ライブラリは、69歳の白人男性から採取した肺組織から単離したRNAを用いて作製した。関連腫瘍組織は、病理学的には残存性の浸潤性扁平上皮癌を示していた。患者の既往症には、急性心筋梗塞、前立腺肥大症、および悪性皮膚新生物があった。家族歴には、脳血管疾患、1型糖尿病、急性心筋梗塞、アテローム性冠動脈疾患があった。
29	BRA1TUT13	ライブラリは、大脳随膜病変切除の際に68歳の白人女性の左前頭葉より摘出した脳腫瘍組織より単離したRNAを用いて作成された。病理学的には、左前頭葉の髄膜腫を示した。
30	LIVRTUT01	ライブラリは、51歳白人女性から採取した肺腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、直腸癌と一致する転移性腺癌を示していた。家族歴には、肝臓の悪性新生物が含まれる。
31	BRAINON01	ライブラリは、あるライブラリからの独立したクローン4.88×10 ⁶ 個から作製され規準化された。RNAは、26歳の白人男性から採取した脳組織から作製した。関連した腫瘍組織は病理学的には、右前頭頂の乏星状細胞腫 (oligoastrocytoma) を示した。

【表 18】

【表 19】

ヌクレオチド SEQ ID NO:	ライブラリ	ライブラリの説明
32	UCMCL5T01	ライブラリは、12名の臍帯血から得られた単核細胞から単離された RNA を用いて作製した。RNA をブールされたライセートから単離する前に細胞を 12 日間 IL-5 と共に培養した。
33	BRAIN0N01	ライブラリは、あるライブラリからの独立したクロン 4.88 × 10 ⁶ 個から作製され規準化された。RNA は、26歳の白人男性から採取した脳組織から作った。関連した腫瘍組織は病理学的には、右前頭頂の乏星状細胞腫 (oligoastrocytoma) を示した。
34	ISLTN0T01	ライブラリは、プールされた脾臓の島細胞の収集物から単離された RNA を用いて作製された。
35	SMCAN0T01	ライブラリは、心臓移植中の男性の外植心臓に由来する大動脈平滑筋細胞株から単離した RNA を用いて作製した。
36	CONUT0T01	ライブラリは、61歳の女性から完全腹式子宮切除及び所属リンパ節切除を伴う両側卵巣摘出の際に得た S 字腸間膜腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学的には、2つの部位の S 字腸間膜に存在する転移性の悪性ミューラー混合腫瘍を示していた。
37	OVART0T02	ライブラリは、51歳白人女性の診査開腹及び腹式全子宮摘出、卵巣摘出、随伴性虫垂切除の際に採取した卵巣腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学的には粘液性嚢胞腫瘍を示していた。家族歴には、アテローム硬化性冠動脈疾患及び良性高血圧、乳癌、子宮癌が含まれていた。
38	LUNG0N0T23	ライブラリは、58歳の白人男性から採取した左葉肺組織から単離した RNA を用いて作製した。関連腫瘍組織は、病理学的には転移性のグレード (4 中の) 3 骨肉腫を示していた。患者の病歴には、軟部組織癌、肺の 2 次癌、前立腺癌及び出血を伴う急性十二指腸潰瘍が含まれる。家族歴には、前立腺癌、乳癌及び急性白血病が含まれる。

ヌクレオチド SEQ ID NO:	ライブラリ	ライブラリの説明
39	BRSTN0T12	ライブラリは、32歳の白人女性から両側整復乳房形成の際に採取した病変乳房組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、非増殖性線維囊胞症を示していた。家族歴には、良性高血圧症及びアテローム硬化性冠動脈疾患が含まれる。
40	UTRSN0N03	標準化されたライブラリは、子宮ライブラリ6、 4×10^6 個の独立クローンから作製した。RNAは、拡大及び掻爬を伴う腔式子宮切開術の際に41歳の白人女性より取り除いた子宮筋層組織より単離した。関連した病変は、子宮の平滑筋腫を示した。患者の病歴には腹壁ヘルニア及び良性の卵巣新生物があった。正規化及びハイブリダイゼーションの条件は Soares ら (PNAS (1994) 91:9228) に従った。
41	PROSTM0T03	ライブラリは、68歳の白人男性から根治的前立腺切除術及び局所的リンパ節切除の際に採取した前立腺組織から単離したRNAを用いて作製した。関連腫瘍組織は、腺癌を示した。患者は前立腺特異性抗原 (PSA) 及び硬結を伴っていた。患者の病歴は、高コレステロール血症、腎臓結石、不特定アレルギー、及びアトピー性皮膚炎を含む。家族歴には、大腸癌が含まれる。
42	SINTN0T25	ライブラリは、頭部への銃創によって死亡した13歳の白人男児から採取した小腸組織から単離したRNAを用いて作製した。家族歴には、糖尿病が含まれる。
43	BRSTD1T01	ライブラリは、48歳の白人女性から採取した病変乳房組織から単離したRNAを用いて作製した。関連腫瘍組織は、分泌管内癌を示した。患者は乳房の悪性新生物及び乳房の不特定な妊娠徴候を伴っていた。患者の病歴は、僧帽弁障害及び胃部分の不特定な病状を含む。家族歴は、乳房の悪性新生物と高脂血症、大腸の悪性新生物及び不整脈、及び大腸の悪性新生物を含んでいる。
44	BRAEN0T02	ライブラリは、35歳の白人男性の脳より採取された後壁皮膚組織より単離したRNAを用いて作製した。

10

20

30

40

表 4 - 4

ヌクレオチド SEQ ID NO:	ライブラリ	ライブラリの説明
45	COLTDIT04	ライブラリは、16歳の白人男性から部分的結腸切除、一時的な回腸フィステル形成術及び結腸鏡検査の際に採取した病変横行結腸組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、家族性多発性結腸ポリープの硬化中の全縁結腸粘液を含む低グレードの形成異常を伴った無数の(100より多くの)腺腫様ポリープを示していた。肛門粘膜は家族性多発性結腸ポリープの硬化中の低グレードの形成以上を伴う10もの腺腫様ポリープを示した。患者は、腹痛及び膨満を伴っていた。家族歴には、父親に良性の大腸腫瘍が；兄弟に良性の大腸腫瘍が；及び祖母に良性高血圧、脳血管障害、乳癌、子宮癌、及びII型糖尿病が含まれる。

10

20

30

40

【表 2 1】

表 5 - 1

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター閾値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して不定の塩基をマスクするプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	Fast Data Finder は、アミノ酸または核酸配列の比較及び注釈付け (annotation) に有用である。	Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致50%
ABI AutoAssembler	核酸配列を構築するプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool は、アミノ酸及び核酸配列の配列類似性検索に有用であり、blastp 及び blastn、blastx、tblastn、tblastx の5つのファンクションがある。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.	ESTs : 確率値=1.0E-8 以下 完全長配列 : 確率値=1.0E-10 以下
FASTA	Pearson 及び Lipman アルゴリズムは、問合わせの配列と同種の配列群との類似性を検索する。FASTA は、fasta 及び tfasta、fastx、tfastx、ssearch の少なくとも5つのファンクションを含む。	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183: 63-98; Smith, T.F. and M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	ESTs : fasta E 値=1.0E-6 構築された ESTs : fasta 同一性=95%以上、一致長さ=200 塩基以上、fastx E 値=1.0E-8 以下 完全長配列 : fastx スコア=100 以上
BLIMPS	Blocks IMPROVED Searcher は、BLOCKS 及び PRINTS、DOMO、PRODOM、PFAM データベースにおける配列に対して、ある配列の一致性を調べ、遺伝子ファミリー及び配列相同性、構造的フィングアープリメント領域を探索する。	Henikoff, S and J.G. Henikoff, Nucl. Acid Res., 19:6565-72, 1991. J.C. Henikoff and S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; Artwood, T.K. 他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37: 417-424.	確率値=1.0E-3 以下
HMMER	PFAM などの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問合せ配列を検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他 (1994) J. Mol. Biol., 235:1501-1531; Sonhammer, E.L.L. 他 (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他 (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	PFAM ヒット : 確率値=1.0E-3 以下 シングルナルベプチドヒット : スコア=0 以上

10

20

30

40

【表 2 2】

表 5-2

表 5-2

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター閾値
ProfileScan	Prosite で定義された配列パターンと一致するタンパク質配列における構造及び配列のモチーフを検索するアルゴリズム。	Gribkov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribkov, 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221	標準化された質のスコア≧特定の Prosite モチーフに対する GCG 指定 "HIGH" 値 通常、スコア=1.4-2.1
Phred	高い感度及び確率で自動配列決定機のトレースを調べる塩基読出しアルゴリズムである。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的なインプリメンテーションに基づく SWAT や CrossMatch を含む Phils Revised Assembly プログラムであって、配列相同性の検索及び DNA 配列の構築に有用である。	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; Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120 以上 一致長さ=56 以上
Consed	Phrap で構築したものの表示及び編集をするためのグラフィックツールである。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキャンして分泌シグナルベプチドの存在を調べる重み付けマトリクス解析プログラムである。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. and S. Audic (1997) CABIOS 12: 431-439.	スコア=3.5 以上
TMAP	蛋白配列での膜貫通セグメントの描写及び配向の決定のための、加重マトリクスを用いたプログラムである。	Persson, B. and P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. and P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	蛋白配列での膜貫通セグメントの描写及び配向の決定のための、隠された Markov モデル(HMM)を用いたプログラムである。	Sonnhammer, E.L. 他 (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow et 他, es., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, pp. 175-182.	
Motifs	Prosite で定義された配列と一致したパターンについてアミノ酸配列を検索するプログラムである。	Bairoch 他, (1997) Nucleic Acid Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 June 2001 (28.06.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/46256 A2(51) International Patent Classification: **C07K 14/47**

(21) International Application Number: PCT/US00/34919

(22) International Filing Date:
21 December 2000 (21.12.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/172,968 21 December 1999 (21.12.1999) US
60/172,966 23 December 1999 (23.12.1999) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier applications:
US 60/172,968 (CIP)
Filed on 21 December 1999 (21.12.1999)
US 60/172,066 (CIP)
Filed on 23 December 1999 (23.12.1999)(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): **TANG, Y.**, Tom
[CN/US]: 4230 Ranwick Court, San Jose, CA 95118 (US),
YUE, Henry [US/US]: 826 Leve Avenue, Sunnyvale,
CA 94087 (US), **BANDMAN, Olga** [US/US]: 360 Anna
Avenue, Mountain View, CA 94043 (US), **HILLMAN,
Jennifer, L.** [US/US]: 230 Monrow Drive #17, Mountain
View, CA 94040 (US), **BAUGHN, Mariah, R.** [US/US]:
14244 Santiago Road, San Leandro, CA 94577 (US), **LIU,****Dyung, Anna, M.** [US/US]: 233 Coy Drive, San Jose, CA
95123 (US), **AZIMZAI, Yalda** [US/US]: 5518 Boulder
Canyon Drive, Castro Valley, CA 94552 (US), **YANG,
Junming** [CN/US]: 7125 Bark Lane, San Jose, CA 95129
(US), **BLRPOHJ, Neil** [US/US]: 105 Widdowall Circle,
Durham, CT 06822 (US), **AU-YOUNG, Janice** [US/US]:
233 Golden Eagle Lane, Dublin, CA 94005 (US),
REDDY, Ranga [IN/US]: 1233 W. McKinley Avenue #5,
Sunnyvale, CA 94086 (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, CL, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR,
HN, 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, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

Without international search report and to be republished
upon receipt of that report.For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette

WO 01/46256 A2

(54) Title: **VEHICLE TRAFFICKING PROTEINS**

(57) Abstract: The invention provides human vesicle trafficking proteins (VETRP) and polynucleotides which identify and encode VETRP. 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 expression of VETRP.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

VESICLE TRAFFICKING PROTEINS

TECHNICAL FIELD

This invention relates to nucleic acid and amino acid sequences of vesicle trafficking proteins and to the use of these sequences in the diagnosis, treatment, and prevention of vesicle trafficking disorders, autoimmune/inflammatory disorders, and cancer, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of vesicle trafficking proteins.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

Eukaryotic cells are bound by a lipid bilayer membrane and subdivided into functionally distinct, membrane-bound compartments. The membranes maintain the essential differences between the cytosol, the extracellular environment, and the luminal space of each intracellular organelle. As lipid membranes are highly impermeable to most polar molecules, transport of essential nutrients, metabolic waste products, cell signaling molecules, macromolecules, and proteins across lipid

membranes and between organelles must be mediated by a variety of transport-associated molecules. Integral membrane proteins, secreted proteins, and proteins destined for the lumen of organelles are synthesized within the endoplasmic reticulum (ER), delivered to the Golgi complex for post-translational processing and sorting, and then transported to specific intracellular and extracellular destinations. Material is internalized from the extracellular environment by endocytosis, a process essential for transmission of neuronal, metabolic, and proliferative signals; uptake of many essential nutrients; and defense against invading organisms. This intracellular and extracellular movement of protein molecules is termed vesicle trafficking. Trafficking is accomplished by the packaging of protein molecules into specialized vesicles which bud from the donor organelle membrane and fuse to the target membrane (Rothman, J.E and F.T. Wieland (1996) *Science* 272:227-234).

The transport of proteins across the ER membrane involves a process that is similar in bacteria, yeast, and mammals (Gorlich, D. et al. (1992) *Cell* 71: 489-503). In mammalian systems, transport is initiated by the action of a cytoplasmic signal recognition particle (SRP) which recognizes a signal sequence on a growing, nascent polypeptide and binds the polypeptide and its ribosome complex to the ER membrane through an SRP receptor located on the ER membrane. The signal peptide is cleaved and the ribosome complex, together with the attached polypeptide, becomes membrane bound. The polypeptide is subsequently translocated across the ER membrane and into a vesicle (Blobel, G. and B. Dobberstein (1975) *J. Cell Biol.* 67:852-862).

Proteins implicated in the translocation of polypeptides across the ER membrane in yeast

WO 01/46256

PCT/US00/34919

include SEC61p, SEC62p, and SEC63p. Mutations in the genes encoding these proteins lead to defects in the translocation process. SEC61 may be of particular importance since certain mutations in the gene for this protein inhibit the translocation of many proteins (Gorlich, *supra*).

Mammalian homologs of yeast SEC61 (mSEC61) have been identified in dog and rat (Gorlich, *supra*). Mammalian SEC61 is also structurally similar to SHCYP, the bacterial cytoplasmic membrane translocation protein. mSEC61 is found in tight association with membrane-bound ribosomes. This association is induced by membrane-targeting of nascent polypeptide chains and is weakened by dissociation of the ribosomes into their constituent subunits. mSEC61 is postulated to be a component of a putative protein-conducting channel, located in the ER membrane, to which nascent polypeptides are transferred following the completion of translation by ribosomes (Gorlich, *supra*).

Several steps in the transit of material along the secretory and endocytic pathways requires the formation of transport vesicles. Specifically, vesicles form at the transitional endoplasmic reticulum (tER), the rim of Golgi cisternae, the face of the Trans-Golgi Network (TGN), the plasma membrane (PM), and tubular extensions of the endosomes. Vesicle formation occurs when a region of membrane buds off from the donor organelle. The membrane-bound vesicle contains proteins to be transported and is surrounded by a proteinaceous coat, the components of which are recruited from the cytosol. Vesicle formation begins with the budding of a vesicle out of a donor organelle. The initial budding and coating processes are controlled by a cytosolic ras-like GTP-binding protein, ADP-ribosylating factor (Arf), and adapter proteins (AP). Different isoforms of both Arf and AP are involved at different sites of budding. For example, Arfs 1, 3, and 5 are required for Golgi budding, Arf4 for endosomal budding, and Arf6 for plasma membrane budding. Two different classes of coat protein have also been identified. Clathrin coats form on vesicles derived from the TGN and PM, whereas coatamer (COP) coats form on vesicles derived from the ER and Golgi (Mellman, I. (1996) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12:575-625).

Vesicle formation begins when an adapter protein (AP) interacts with cargo proteins within the donor membrane and recruits clathrin to the bud site. APs are heterotetrameric complexes composed of two large chains (a, g, d, or c, and b), a medium chain (m), and a small chain (s). Clathrin binds to APs via the carboxy-terminal appendage domain of the b-adaptin subunit (Le Bourgne, R. and B. Hoflack (1998) Curr. Opin. Cell. Biol. 10:499-503). AP-1 functions in protein sorting from the TGN and endosomes to compartments of the endosomal/lysosomal system. AP-2 functions in clathrin-mediated endocytosis at the plasma membrane, while AP-3 is associated with endosomes and/or the TGN and recruits integral membrane proteins for transport to lysosomes and lysosome-related organelles. The recently isolated AP-4 complex localizes to the TGN or a neighboring compartment and may play a role in sorting events thought to take place in post-Golgi

WO 01/46256

PCT/US00/34919

compartments (Dell'Angelica, E.C. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:7278-7285). Cytosolic GTP-bound Arf is also incorporated into the vesicle as it forms. Another GTP-binding protein, dynamin, forms a ring complex around the neck of the forming vesicle and provides the mechanochemical force required to release the vesicle from the donor membrane. The coated vesicle complex is then

5 transported through the cytosol. During the transport process, Arf-bound GTP is hydrolyzed to GDP and the coat dissociates from the transport vesicle (West, M.A. et al. (1997) *J. Cell Biol.* 138:1239-1254).

Coat protein (COP) coats form on the ER and Golgi. COP coats can further be distinguished as COPI, involved in retrograde traffic through the Golgi to the ER, and COPII, involved in

10 anterograde traffic from the ER to the Golgi. The COP coat consists of two major components, a GTP-binding protein (Arf or Sar) and coat protomer (coatamer). Coatamer is an equimolar complex of seven proteins, termed alpha-, beta-, beta'-, gamma-, delta-, epsilon- and zeta-COP. The coatamer complex binds to dilysine motifs contained on the cytoplasmic tails of integral membrane proteins. These include the dilysine-containing retrieval motif of membrane proteins of the ER and

15 dibasic/diphenylalanine motifs of members of the p24 family. The p24 family of type I membrane proteins represent the major membrane proteins of COPI vesicles (Harter, C. and F.T. Wieland (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11649-11654).

Vesicles can undergo homotypic or heterotypic fusion. Molecules required for appropriate targeting and fusion of vesicles include proteins in the vesicle membrane, the target membrane, and

20 proteins recruited from the cytosol. During budding of the vesicle from the donor compartment, an integral membrane protein, VAMP (vesicle-associated membrane protein) is incorporated into the vesicle. Soon after the vesicle uncoats, a cytosolic prenylated GTP-binding protein, Rab, is inserted into the vesicle membrane. The amino acid sequence of Rab proteins reveals conserved GTP-binding domains characteristic of Ras superfamily members. In the vesicle membrane, GTP-bound Rab

25 interacts with VAMP. Once the vesicle reaches the target membrane, a GTPase activating protein (GAP) in the target membrane converts the Rab protein to the GDP-bound form. A cytosolic protein, guanine-nucleotide dissociation inhibitor (GDI) then removes GDP-bound Rab from the vesicle membrane. Several Rab isoforms have been identified and appear to associate with specific

30 compartments within the cell. For example, Rabs 4, 5, and 11 are associated with the early endosome, whereas Rabs 7 and 9 associate with the late endosome. These differences may provide selectivity in the association between vesicles and their target membranes (Novick, P. and M. Zerial (1997) *Cur. Opin. Cell Biol.* 9:496-504).

Docking of the transport vesicle with the target membrane involves the formation of a complex between the vesicle SNAP receptor (v-SNARE), target membrane (t-) SNAREs, and certain

35 other membrane and cytosolic proteins. Many of these other proteins have been identified although

WO 01/46256

PCT/US00/34919

their exact functions in the docking complex remain uncertain (Tellam, J.T. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:5857-5863; Hata, Y. and T.C. Sudhof (1995) *J. Biol. Chem.* 270:13022-13028). N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) and soluble NSF-attachment protein (α -SNAP and β -SNAP) are two such proteins that are conserved from yeast to man and function in most intracellular membrane fusion reactions. Sec1 represents a family of yeast proteins that function at many different stages in the secretory pathway including membrane fusion. Recently, mammalian homologs of Sec1, called Munc-18 proteins, have been identified (Katagiri, H. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:4963-4966; Hata et al. *supra*).

The SNARE complex involves three SNARE molecules, one in the vesicular membrane and two in the target membrane. Together they form a rod-shaped complex of four α -helical coiled-coils. The membrane anchoring domains of all three SNAREs project from one end of the rod. This complex is similar to the rod-like structures formed by fusion proteins characteristic of the enveloped viruses, such as myxovirus, influenza, filovirus (Ebola), and the HIV and SIV retroviruses. (Skehel, J.J. and D.C. Wiley (1998) *Cell* 95:871-874). It has been proposed that the SNARE complex is sufficient for membrane fusion, suggesting that the proteins which associate with the complex provide regulation over the fusion event (Weber, T. et al. (1998) *Cell* 92:759-772). For example, in neurons, which exhibit regulated exocytosis, docked vesicles do not fuse with the presynaptic membrane until depolarization, which leads to an influx of calcium (Bennett, M.K. and R.H. Scheller (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63:63-100). Synaptotagmin, an integral membrane protein in the synaptic vesicle, associates with the t-SNARE syntaxin in the docking complex. Synaptotagmin binds calcium in a complex with negatively charged phospholipids, which allows the cytosolic SNAP protein to displace synaptotagmin from syntaxin and fusion to occur. Thus, synaptotagmin is a negative regulator of fusion in the neuron (Littleton, J.T. et al. (1993) *Cell* 74:1125-1134). The most abundant membrane protein of synaptic vesicles appears to be the glycoprotein synaptophysin, a 38 kDa protein with four transmembrane domains. Although the function of synaptophysin is not known, its calcium-binding ability, tyrosine phosphorylation, and widespread distribution in neural tissues suggest a potential role in neurosecretion (Bennett, *supra*).

The transport of proteins into and out of vesicles relies on interactions between cell membranes and a supporting membrane cytoskeleton consisting of spectrin and other proteins. A large family of related proteins called ankyrins participate in the transport process by binding to the membrane skeleton protein spectrin and to a protein in the cell membrane called band 3, a component of an anion channel in the cell membrane. Ankyrins therefore function as a critical link between the cytoskeleton and the cell membrane.

Originally found in association with erythroid cells, ankyrins are also found in other tissues as well (Birkenmeier, C.S. et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:9533-9540). Ankyrins are large proteins

WO 01/46256

PCT/US00/34919

(~1800 amino acids) containing an N-terminal, 89 kDa domain that binds the cell membrane proteins band 3 and tubulin, a central 62 kDa domain that binds the cytoskeletal proteins spectrin and vimentin, and a C-terminal, 55 kDa regulatory domain that functions as a modifier of the binding activities of the other two domains. Individual genes for ankyrin are able to produce multiple ankyrin isoforms by various insertions and deletions. These isoforms are of nearly identical size but may have different functions. In addition, smaller transcripts are produced which are missing large regions of the coding sequences from the N-terminal (band 3 binding), and central (spectrin binding) domains. The existence of such a large family of ankyrin proteins and the observation that more than one type of ankyrin may be expressed in the same cell type suggests that ankyrins may have more specialized functions than simply binding the membrane skeleton to the plasma membrane (Birkenmeier, *supra*).

In humans, two isoforms of ankyrin are expressed, alternatively, in developing erythroids and mature erythroids, respectively (Lambert, S. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1730-1734). A deficiency in erythroid spectrin and ankyrin has been associated with the hemolytic anemia, hereditary spherocytosis (Cootner, T.L. et al. (1988) *New Engl. J. Med.* 318:230-234).

Correct trafficking of proteins is of particular importance for the proper function of epithelial cells, which are polarized into distinct apical and basolateral domains containing different cell membrane components such as lipids and membrane-associated proteins. Certain proteins are flexible and may be sorted to the basolateral or apical side depending upon cell type or growth conditions. For example, the kidney anion exchanger (kAE1) can be retargeted from the apical to the basolateral domain if cells are plated at higher density. The protein kanadaplin was isolated as a protein which binds to the cytoplasmic domain of kAE1. It also colocalizes with kAE1 in vesicles, but not in the membrane, suggesting that kanadaplin's function is to guide kAE1-containing vesicles to the basolateral target membrane (Chen, J. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:1038-1043).

Vesicle trafficking is crucial in the process of neurotransmission. Synaptic vesicles carry neurotransmitter molecules from the cytoplasm of a neuron to the synapse. Rab3's are a family of GTP-binding proteins located on synaptic vesicles. The RIM family of proteins are thought to be effectors for Rab3's (Wang, Y. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:20033-20044). Rabphilin-3 is a synaptic vesicle protein. Granuphilins are proteins with homology to rabphilins, and may have a unique role in exocytosis (Wang, J. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:28542-28548).

The etiology of numerous human diseases and disorders can be attributed to defects in the trafficking of proteins to organelles or the cell surface. Defects in the trafficking of membrane-bound receptors and ion channels are associated with cystic fibrosis (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; CFTR), glucose-galactose malabsorption syndrome (Na⁺/glucose cotransporter), hypercholesterolemia (low-density lipoprotein (LDL) receptor), and forms of diabetes

WO 01/46256

PCT/US00/34919

mellitus (insulin receptor). Abnormal hormonal secretion is linked to disorders including diabetes insipidus (vasopressin), hyper- and hypoglycemia (insulin, glucagon), Grave's disease and goiter (thyroid hormone), and Cushing's and Addison's diseases (adrenocorticotrophic hormone; ACTH).

Cancer cells secrete excessive amounts of hormones or other biologically active peptides.

- 5 Disorders related to excessive secretion of biologically active peptides by tumor cells include: fasting hypoglycemia due to increased insulin secretion from insulinoma-islet cell tumors; hypertension due to increased epinephrine and norepinephrine secreted from pheochromocytomas of the adrenal medulla and sympathetic paraganglia; and carcinoid syndrome, which includes abdominal cramps, diarrhea, and valvular heart disease, caused by excessive amounts of vasoactive substances
- 10 (serotonin, bradykinin, histamine, prostaglandins, and polypeptide hormones) secreted from intestinal tumors. Ectopic synthesis and secretion of biologically active peptides (peptides not expected from a tumor) includes ACTH and vasopressin in lung and pancreatic cancers; parathyroid hormone in lung and bladder cancers; calcitonin in lung and breast cancers; and thyroid-stimulating hormone in medullary thyroid carcinoma.

- 15 Various human pathogens alter host cell protein trafficking pathways to their own advantage. For example, the HIV protein Nef downregulates cell-surface expression of CD4 molecules by accelerating their endocytosis through clathrin coated pits. This function of Nef is important for the spread of HIV from the infected cell (Harris, M. (1999) *Curr. Biol.* 9:R449-R461). A recently identified human protein, Nef-associated factor 1 (Naf1), a protein with four extended coiled-coil
- 20 domains, has been found to associate with Nef. Overexpression of Naf1 increased cell surface expression of CD4, an effect which could be suppressed by Nef (Fukushi, M. et al. (1999) *FEBS Lett.* 442:83-88).

- The discovery of new vesicle trafficking proteins and the polynucleotides encoding them satisfies a need in the art by providing new compositions which are useful in the diagnosis,
- 25 prevention, and treatment of vesicle trafficking disorders, autoimmune/inflammatory disorders, and cancer, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of vesicle trafficking proteins.

SUMMARY OF THE INVENTION

- 30 The invention features purified polypeptides, vesicle trafficking proteins, referred to collectively as "VETRP" and individually as "VETRP-1," "VETRP-2," "VETRP-3," "VETRP-4," "VETRP-5," "VETRP-6," "VETRP-7," "VETRP-8," "VETRP-9," "VETRP-10," "VETRP-11," "VETRP-12," "VETRP-13," "VETRP-14," "VETRP-15," "VETRP-16," "VETRP-17," "VETRP-18," "VETRP-19," "VETRP-20," "VETRP-21," "VETRP-22," and "VETRP-23." In one aspect, the
- 35 invention provides an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the

WO 01/46256

PCT/US00/34919

group consisting of a) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, c) a biologically active fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, and d) an immunogenic fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23. In one alternative, the invention provides an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1-23.

The invention further provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of a) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, c) a biologically active fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, and d) an immunogenic fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23. In one alternative, the polynucleotide encodes a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23. In another alternative, the polynucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46.

Additionally, the invention provides a recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a polynucleotide encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of a) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, c) a biologically active fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, and d) an immunogenic fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23. In one alternative, the invention provides a cell transformed with the recombinant polynucleotide. In another alternative, the invention provides a transgenic organism comprising the recombinant polynucleotide.

The invention also provides a method for producing a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of a) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, c) a biologically active fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, and d) an immunogenic fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23. The method comprises a) culturing a cell under conditions suitable for expression of the polypeptide, wherein said cell is transformed with a recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a polynucleotide encoding the

WO 01/46256

PCT/US00/34919

polypeptide, and b) recovering the polypeptide so expressed.

Additionally, the invention provides an isolated antibody which specifically binds to a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of a) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, c) a biologically active fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, and d) an immunogenic fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23.

The invention further provides an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of a) a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46, b) a naturally occurring polynucleotide sequence having at least 70% sequence identity to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46, c) a polynucleotide sequence complementary to a), d) a polynucleotide sequence complementary to 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 comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of a) a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46, b) a naturally occurring polynucleotide sequence having at least 70% sequence identity to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46, c) a polynucleotide sequence complementary to a), d) a polynucleotide sequence complementary to b), and e) an RNA equivalent of a)-d). The method comprises a) hybridizing the sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides comprising a sequence complementary to said target polynucleotide in the sample, and which probe specifically hybridizes to said target polynucleotide, under conditions whereby a hybridization complex is formed between said probe and said target polynucleotide or fragments thereof, and b) detecting the presence or absence of said hybridization complex, and optionally, if present, the amount thereof. In one alternative, the probe comprises at least 60 contiguous nucleotides.

The invention further provides a method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of a) a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46, b) a naturally occurring polynucleotide sequence having at least 70% sequence identity to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46, c) a polynucleotide sequence complementary to a), d) a polynucleotide sequence complementary to b), and e) an RNA equivalent of a)-d). The method comprises a) amplifying said

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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
 5 polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of a) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, c) a biologically active fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, and d) an immunogenic fragment of an amino
 10 acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, and a pharmaceutically acceptable excipient. In one embodiment, the composition comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23. The invention additionally provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional VETRP, 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 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of a) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, c) a biologically active fragment of an amino
 20 acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, and d) an immunogenic fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23. The method comprises a) exposing a sample comprising the polypeptide to a compound, and b) detecting agonist activity in the sample. In one alternative, the invention provides a composition comprising an agonist compound identified by the method and a pharmaceutically acceptable excipient. In another
 25 alternative, the invention provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional VETRP, 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 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting
 30 of a) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, c) a biologically active fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, and d) an immunogenic fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23. The

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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 VETRP, 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 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of a) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, c) a biologically active fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, and d) an immunogenic fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23. 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 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of a) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, c) a biologically active fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, and d) an immunogenic fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23. The method comprises a) combining the polypeptide with at least one test compound under conditions permissive for the activity of the polypeptide, b) assessing the activity of the polypeptide in the presence of the test compound, and c) comparing the activity of the polypeptide in the presence of the test compound with the activity of the polypeptide in the absence of the test compound, wherein a change in the activity of the polypeptide in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of the polypeptide.

The invention further provides a method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a target polynucleotide, wherein said target polynucleotide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46, the method comprising a) exposing a sample comprising the target polynucleotide to a compound, and b) detecting altered expression of the target polynucleotide.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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 comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of i) a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46, ii) a naturally occurring polynucleotide sequence having at least 70% sequence identity to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46, iii) a polynucleotide sequence complementary to i), iv) a polynucleotide sequence complementary to 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 comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of i) a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46, ii) a naturally occurring polynucleotide sequence having at least 70% sequence identity to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46, iii) a polynucleotide sequence complementary to i), iv) a polynucleotide sequence complementary to ii), and v) an RNA equivalent of i)-iv). Alternatively, the target polynucleotide comprises a fragment of a polynucleotide sequence selected from the group consisting of i)-v) above; c) quantifying the amount of hybridization complex; and d) comparing the amount of hybridization complex in the treated biological sample with the amount of hybridization complex in an untreated biological sample, wherein a difference in the amount of hybridization complex in the treated biological sample is indicative of toxicity of the test compound.

BRIEF DESCRIPTION OF THE TABLES

Table 1 shows polypeptide and nucleotide sequence identification numbers (SEQ ID NOs), clone identification numbers (clone IDs), cDNA libraries, and cDNA fragments used to assemble full-length sequences encoding VETRP.

Table 2 shows features of each polypeptide sequence, including potential motifs, homologous sequences, and methods, algorithms, and searchable databases used for analysis of VETRP.

Table 3 shows selected fragments of each nucleic acid sequence; the tissue-specific expression patterns of each nucleic acid sequence as determined by northern analysis; diseases, disorders, or conditions associated with these tissues; and the vector into which each cDNA was cloned.

Table 4 describes the tissues used to construct the cDNA libraries from which cDNA clones encoding VETRP were isolated.

Table 5 shows the tools, programs, and algorithms used to analyze the polynucleotides and

WO 01/46256

PCT/US00/34919

polypeptides of the invention, along with applicable descriptions, references, and threshold parameters.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 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.

10 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.

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

DEFINITIONS

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

An "allelic variant" is an alternative form of the gene encoding VETRP. Allelic variants may result from at least one mutation in the nucleic acid sequence and may result in altered mRNAs or in polypeptides whose structure or function may or may not be altered. A gene may have none, one, or many allelic variants of its naturally occurring form. Common mutational changes which give rise to
35 allelic variants are generally ascribed to natural deletions, additions, or substitutions of nucleotides.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Each of these types of changes may occur alone, or in combination with the others, one or more times in a given sequence.

"Altered" nucleic acid sequences encoding VETRP include those sequences with deletions, insertions, or substitutions of different nucleotides, resulting in a polypeptide the same as VETRP or a polypeptide with at least one functional characteristic of VETRP. Included within this definition are polymorphisms which may or may not be readily detectable using a particular oligonucleotide probe of the polynucleotide encoding VETRP, and improper or unexpected hybridization to allelic variants, with a locus other than the normal chromosomal locus for the polynucleotide sequence encoding VETRP. 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 VETRP. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues, as long as the biological or immunological activity of VETRP is retained. For example, negatively charged amino acids may include aspartic acid and glutamic acid, and positively charged amino acids may include lysine and arginine. Amino acids with uncharged polar side chains having similar hydrophilicity values may include: asparagine and glutamine; and serine and threonine. Amino acids with uncharged side chains having similar hydrophobicity 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 VETRP. Antagonists may include proteins such as antibodies, nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of VETRP either by directly interacting with VETRP or by acting on components of the biological pathway in which VETRP 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 VETRP polypeptides can be prepared using intact polypeptides or using fragments containing small peptides of interest as the immunizing antigen. The polypeptide or

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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

5 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

15 phosphorothioates, methylphosphonates, or benzylphosphonates; oligonucleotides having modified sugar groups such as 2'-methoxyethyl sugars or 2'-methoxyethoxy sugars; or oligonucleotides having modified bases such as 5-methyl cytosine, 2'-deoxyuracil, or 7-deaza-2'-deoxyguanosine. Antisense molecules may be produced by any method including chemical synthesis or transcription. Once introduced into a cell, the complementary antisense molecule base-pairs with a naturally occurring

20 nucleic acid sequence produced by the cell to form duplexes which block either transcription or translation. The designation "negative" or "minus" can refer to the antisense strand, and the designation "positive" or "plus" can refer to the sense strand of a reference DNA molecule.

The term "biologically active" refers to a protein having structural, regulatory, or biochemical functions of a naturally occurring molecule. Likewise, "immunologically active" or "immunogenic" refers to the capability of the natural, recombinant, or synthetic VETRP, or of any oligopeptide

25 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,

30 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 VETRP or fragments of VETRP may

35 be employed as hybridization probes. The probes may be stored in freeze-dried form and may be

WO 01/46256

PCT/US00/34919

associated with a stabilizing agent such as a carbohydrate. In hybridizations, the probe may be deployed in an aqueous solution containing salts (e.g., NaCl), detergents (e.g., sodium dodecyl sulfate; SDS), and other components (e.g., Denhardt's solution, dry milk, salmon sperm DNA, etc.).

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

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

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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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 sequence 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.

A "fragment" is a unique portion of VETRP or the polynucleotide encoding VETRP 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:24-46 comprises a region of unique polynucleotide sequence that specifically identifies SEQ ID NO:24-46, for example, as distinct from any other sequence in the genome from which the fragment was obtained. A fragment of SEQ ID NO:24-46 is useful, for example, in hybridization and amplification technologies and in analogous methods that distinguish SEQ ID NO:24-46 from related polynucleotide sequences. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:24-46 and the region of SEQ ID NO:24-46 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:1-23 is encoded by a fragment of SEQ ID NO:24-46. A fragment of SEQ ID NO:1-23 comprises a region of unique amino acid sequence that specifically identifies SEQ ID NO:1-23. For example, a fragment of SEQ ID NO:1-23 is useful as an immunogenic peptide for the development of antibodies that specifically recognize SEQ ID NO:1-23. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:1-23 and the region of SEQ ID NO:1-23 to which the fragment corresponds are routinely determinable by one of ordinary skill in the art based on the intended

WO 01/46256

PCT/US00/34919

purpose for the fragment.

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

5 "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
10 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
15 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
20 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
25 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. The BLAST software suite includes various sequence analysis programs including "blastn," that is used to align a known polynucleotide sequence with other polynucleotide sequences from a variety of databases. Also available is a tool called "BLAST 2 Sequences" that is used for direct pairwise comparison of two nucleotide sequences. "BLAST 2 Sequences" can be accessed and used interactively at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>.
30 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

35 *Reward for match: 1*

WO 01/46256

PCT/US00/34919

*Penalty for mismatch: -2**Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties**Gap x drop-off: 50**Expect: 10*5 *Word Size: 11**Filter: on*

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

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

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

Percent identity between polypeptide sequences may be determined using the default parameters of the CLUSTAL V algorithm as incorporated into the MEGALIGN version 3.12c 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

30 CLUSTAL V as the "percent similarity" between aligned polypeptide sequence pairs. Alternatively the NCBI BLAST software suite may be used. For example, for a pairwise comparison of two polypeptide sequences, one may use the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.12 (Apr-21-2000) with blastp set at default parameters. Such default parameters may be, for example:

35 *Matrix: BLOSUM62*

WO 01/46256

PCT/US00/34919

*Open Gap: 11 and Extension Gap: 1 penalties**Gap x drop-off: 50**Expect: 10**Word Size: 3*5 *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.

10 "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.

15 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. Permissive annealing conditions occur, for example, at 68°C in the presence of about 6 x SSC, about 30 1% (w/v) SDS, and about 100 µg/ml sheared, denatured salmon sperm DNA.

Generally, stringency of hybridization is expressed, in part, with reference to the temperature under which the wash step is carried out. Such wash temperatures are typically selected to be about 5°C to 20°C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The T_m is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence hybridizes to a perfectly matched probe. An equation for calculating T_m and

WO 01/46256

PCT/US00/34919

conditions for nucleic acid hybridization are well known and can be found in Sambrook, J. et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY; specifically see volume 2, chapter 9.

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

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

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

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

An "immunogenic fragment" is a polypeptide or oligopeptide fragment of VETRP 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 VETRP which is useful in any of the antibody production methods disclosed herein or known in the art.

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

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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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

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

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

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

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

"Probe" refers to nucleic acid sequences encoding VETRP, their complements, or fragments thereof, which are used to detect identical, allelic or related nucleic acid sequences. Probes are isolated oligonucleotides or polynucleotides attached to a detectable label or reporter molecule. Typical labels include radioactive isotopes, ligands, chemiluminescent agents, and enzymes.

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

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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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

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

A "recombinant nucleic acid" is a sequence that is not naturally occurring or has a sequence that is made by an artificial combination of two or more otherwise separated segments of sequence. This artificial combination is often accomplished by chemical synthesis or, more commonly, by the artificial manipulation of isolated segments of nucleic acids, e.g., by genetic engineering techniques such as those described in Sambrook, *supra*. The term recombinant includes nucleic acids that have

WO 01/46256

PCT/US00/34919

been altered solely by addition, substitution, or deletion of a portion of the nucleic acid. Frequently, a recombinant nucleic acid may include a nucleic acid sequence operably linked to a promoter sequence. Such a recombinant nucleic acid may be part of a vector that is used, for example, to transform a cell.

5 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.

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

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

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

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

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

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

35 A "substitution" refers to the replacement of one or more amino acid residues or nucleotides

WO 01/46256

PCT/US00/34919

by different amino acid residues or nucleotides, respectively.

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

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

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

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

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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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

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

THE INVENTION

The invention is based on the discovery of new human vesicle trafficking proteins (VETRP), the polynucleotides encoding VETRP, and the use of these compositions for the diagnosis, treatment, or prevention of vesicle trafficking disorders, autoimmune/inflammatory disorders, and cancer.

Table 1 lists the Incyte clones used to assemble full length nucleotide sequences encoding VETRP. Columns 1 and 2 show the sequence identification numbers (SEQ ID NOs) of the polypeptide and nucleotide sequences, respectively. Column 3 shows the clone IDs of the Incyte clones in which nucleic acids encoding each VETRP were identified, and column 4 shows the cDNA libraries from which these clones were isolated. Column 5 shows Incyte clones and their corresponding cDNA libraries. Clones for which cDNA libraries are not indicated were derived from pooled cDNA libraries. In some cases, GenBank sequence identifiers are also shown in column 5. The Incyte clones and GenBank cDNA sequences, where indicated, in column 5 were used to assemble the consensus nucleotide sequence of each VETRP and are useful as fragments in hybridization technologies.

The columns of Table 2 show various properties of each of the polypeptides of the invention: column 1 references the SEQ ID NO; column 2 shows the number of amino acid residues in each polypeptide; column 3 shows potential phosphorylation sites; column 4 shows potential glycosylation sites; column 5 shows the amino acid residues comprising signature sequences and motifs; column 6

WO 01/46256

PCT/US00/34919

shows homologous sequences as identified by BLAST analysis along with relevant citations, all of which are expressly incorporated by reference herein in their entirety; and column 7 shows analytical methods and in some cases, searchable databases to which the analytical methods were applied. The methods of column 7 were used to characterize each polypeptide through sequence homology and protein motifs.

The columns of Table 3 show the tissue-specificity and diseases, disorders, or conditions associated with nucleotide sequences encoding VETRP. The first column of Table 3 lists the nucleotide SEQ ID NOs. Column 2 lists fragments of the nucleotide sequences of column 1. These fragments are useful, for example, in hybridization or amplification technologies to identify SEQ ID NO:24-46 and to distinguish between SEQ ID NO:24-46 and related polynucleotide sequences. The polypeptides encoded by these fragments are useful, for example, as immunogenic peptides. Column 3 lists tissue categories which express VETRP as a fraction of total tissues expressing VETRP. Column 4 lists diseases, disorders, or conditions associated with those tissues expressing VETRP as a fraction of total tissues expressing VETRP. Column 5 lists the vectors used to subclone each cDNA library. Of particular note is the expression of SEQ ID NO:25 in nervous tissue. SEQ ID NO:41 is noted for its expression in both cancer and reproductive tissue, and SEQ ID NO:43 is expressed in cancer and nervous tissue.

The columns of Table 4 show descriptions of the tissues used to construct the cDNA libraries from which cDNA clones encoding VETRP were isolated. Column 1 references the nucleotide SEQ ID NOs, column 2 shows the cDNA libraries from which these clones were isolated, and column 3 shows the tissue origins and other descriptive information relevant to the cDNA libraries in column 2.

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

SEQ ID NO:31 maps to chromosome 12 within the interval from 70.60 to 76.50 centiMorgans, and to chromosome 1 within the interval from 159.60 to 164.10 centiMorgans. SEQ ID NO:36 maps to chromosome 3 within the interval from 129.00 to 131.80 centiMorgans, and to chromosome 4 within the interval from 86.00 to 91.90 centiMorgans. SEQ ID NO:38 maps to chromosome 6 within the interval from the p-terminus to 27.10 centiMorgans. SEQ ID NO:42 maps to chromosome 2 within the interval from 233.10 to 236.10 centiMorgans. SEQ ID NO:44 maps to chromosome 5 within the interval from 61.10 to 69.60 centiMorgans, to chromosome 11 within the interval from 117.90 to 123.50 centiMorgans, and to chromosome 17 within the interval from 99.30 to 103.70 centiMorgans.

The invention also encompasses polynucleotides which encode VETRP. In a particular

WO 01/46256

PCT/US00/34919

embodiment, the invention encompasses a polynucleotide sequence comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46, which encodes VETRP. The polynucleotide sequences of SEQ ID NO:24-46, 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 VETRP. 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 VETRP. A particular aspect of the invention encompasses a variant of a polynucleotide sequence comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46 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:24-46. Any one of the polynucleotide variants described above can encode an amino acid sequence which contains at least one functional or structural characteristic of VETRP.

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

Although nucleotide sequences which encode VETRP and its variants are generally capable of hybridizing to the nucleotide sequence of the naturally occurring VETRP under appropriately selected conditions of stringency, it may be advantageous to produce nucleotide sequences encoding VETRP or its derivatives possessing a substantially different codon usage, e.g., inclusion of non-naturally occurring codons. Codons may be selected to increase the rate at which expression of the peptide occurs in a particular prokaryotic or eukaryotic host in accordance with the frequency with which particular codons are utilized by the host. Other reasons for substantially altering the nucleotide sequence encoding VETRP 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 VETRP and VETRP derivatives, or fragments thereof, entirely by synthetic chemistry. After production, the synthetic sequence may be inserted into any of the many available expression vectors and cell

WO 01/46256

PCT/US00/34919

systems using reagents well known in the art. Moreover, synthetic chemistry may be used to introduce mutations into a sequence encoding VETRP or any fragment thereof.

Also encompassed by the invention are polynucleotide sequences that are capable of hybridizing to the claimed polynucleotide sequences, and, in particular, to those shown in SEQ ID NO:24-46 and fragments thereof under various conditions of stringency. (See, e.g., Wahl, G.M. and S.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407; Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511.) Hybridization conditions, including annealing and wash conditions, are described in "Definitions."

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

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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

of unknown sequence before performing PCR. Other methods which may be used to retrieve unknown sequences are known in the art. (See, e.g., Parker, J.D. et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:3055-3060). Additionally, one may use PCR, nested primers, and PROMOTERFINDER libraries (Clontech, Palo Alto CA) to walk genomic DNA. This procedure avoids the need to screen libraries and is useful in finding intron/exon junctions. For all PCR-based methods, primers may be designed using commercially available software, such as OLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences, Plymouth MN) or another appropriate program, to be about 22 to 30 nucleotides in length, to have a GC content of about 50% or more, and to anneal to the template at temperatures of about 68°C to 72°C.

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

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

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

The nucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter VETRP-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.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

The nucleotides of the present invention may be subjected to DNA shuffling techniques such as MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; described in U.S. Patent Number 5,837,458; Chang, C.-C. et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; and Cramer, A. et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319) to alter or
 5 improve the biological properties of VETRP, such as its biological or enzymatic activity or its ability to bind to other molecules or compounds. DNA shuffling is a process by which a library of gene variants is produced using PCR-mediated recombination of gene fragments. The library is then subjected to selection or screening procedures that identify those gene variants with the desired properties. These preferred variants may then be pooled and further subjected to recursive rounds of
 10 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
 15 maximizing the genetic diversity of multiple naturally occurring genes in a directed and controllable manner.

In another embodiment, sequences encoding VETRP may be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art. (See, e.g., Cantabers, M.H. et al. (1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:215-223; Horn, T. et al. (1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:225-232.) Alternatively,
 20 VETRP itself or a fragment thereof may be synthesized using chemical methods. For example, peptide synthesis can be performed using various solution-phase or solid-phase techniques. (See, e.g., Creighton, T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, W.H. Freeman, New York NY, pp. 55-60; and Roberge, I.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
 25 sequence of VETRP, or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined with sequences from other proteins, or any part thereof, to produce a variant polypeptide or a polypeptide having a sequence of a naturally occurring polypeptide.

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

In order to express a biologically active VETRP, the nucleotide sequences encoding VETRP 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
 35 sequence in a suitable host. These elements include regulatory sequences, such as enhancers,

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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

Methods which are well known to those skilled in the art may be used to construct expression vectors containing sequences encoding VETRP 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 VETRP. 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; Bitter, G.A. et al. (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544; Scorer, C.A. et al. (1994) *BioTechnology* 12:181-184; Engelhard, E.K. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3224-3227; Saadig, V. et al. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7:1937-1945; Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311; Coruzzi, G. et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie, R. et al. (1984) *Science* 224:838-843; Winter, J. et al. (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105; 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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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. Sornia (1997) *Nature* 389:239-242.)

5 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 VETRP. For example, routine cloning, subcloning, and propagation of polynucleotide sequences encoding VETRP can be achieved using a multifunctional *E. coli* vector such as PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) or PSPORI

10 plasmid (Life Technologies). Ligation of sequences encoding VETRP 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.)

15 When large quantities of VETRP are needed, e.g. for the production of antibodies, vectors which direct high level expression of VETRP may be used. For example, vectors containing the strong, inducible T5 or T7 bacteriophage promoter may be used.

Yeast expression systems may be used for production of VETRP. A number of vectors containing constitutive or inducible promoters, such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH

20 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, *supra*; and Scorer, *supra*.)

Plant systems may also be used for expression of VETRP. Transcription of sequences

25 encoding VETRP may be driven 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, *supra*; Broglie, *supra*; and Winter, *supra*.) These constructs can be introduced into plant cells by direct DNA transformation or pathogen-mediated

30 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 VETRP may be ligated into an adenovirus transcription/translation complex consisting of the late promoter and tripartite leader

35 sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome may be used to obtain

WO 01/46256

PCT/US00/34919

infective virus which expresses VETRP in host cells. (See, e.g., Logan, J. and T. Shank (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659.) In addition, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, may be used to increase expression in mammalian host cells. SV40 or EBV-based vectors may also be used for high-level protein expression.

5 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.)

10 For long term production of recombinant proteins in mammalian systems, stable expression of VETRP in cell lines is preferred. For example, sequences encoding VETRP 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
15 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
20 include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase and adenine phosphoribosyltransferase genes, for use in *tk* and *apv* 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*
25 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
30 (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
35 also present, the presence and expression of the gene may need to be confirmed. For example, if the

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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

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

Immunological methods for detecting and measuring the expression of VETRP 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 VETRP is preferred, but a competitive binding assay may be employed. These and other assays are well known in the art. (See, e.g., Hampton, R. et al. (1990) *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St. Paul MN, Sect. IV; Coligan, J.E. et al. (1997) *Current Protocols in Immunology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY; and Pound, J.D. (1998) *Immunoechemical Protocols*, Humana Press, Totowa NJ.)

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

Host cells transformed with nucleotide sequences encoding VETRP may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The protein produced by a transformed cell may be secreted or retained intracellularly depending on the sequence

WO 01/46256

PCT/US00/34919

and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides which encode VETRP may be designed to contain signal sequences which direct secretion of VETRP through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

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

In another embodiment of the invention, natural, modified, or recombinant nucleic acid sequences encoding VETRP may be ligated to a heterologous sequence resulting in translation of a
 15 fusion protein in any of the aforementioned host systems. For example, a chimeric VETRP protein containing a heterologous moiety that can be recognized by a commercially available antibody may facilitate the screening of peptide libraries for inhibitors of VETRP activity. Heterologous protein and peptide moieties may also facilitate purification of fusion proteins using commercially available affinity matrices. Such moieties include, but are not limited to, glutathione S-transferase (GST),
 20 maltose binding protein (MBP), thioredoxin (Trx), calmodulin binding peptide (CBP), 6-His, FLAG, c-myc, and hemagglutinin (HA). GST, MBP, Trx, CBP, and 6-His enable purification of their cognate fusion proteins on immobilized glutathione, maltose, phenylarsine oxide, calmodulin, and metal-chelate resins, respectively. FLAG, c-myc, and hemagglutinin (HA) enable immunoaffinity purification of fusion proteins using commercially available monoclonal and polyclonal antibodies
 25 that specifically recognize these epitope tags. A fusion protein may also be engineered to contain a proteolytic cleavage site located between the VETRP encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that VETRP may be cleaved away from the heterologous moiety following purification. Methods for fusion protein expression and purification are discussed in Ausubel (1995, *supra*, ch. 10). A variety of commercially available kits may also be used to facilitate expression and purification of
 30 fusion proteins.

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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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

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

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

20 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.

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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

In another embodiment, polynucleotides encoding VETRIP or their mammalian homologs may be "knocked out" in an animal model system using homologous recombination in embryonic stem (ES) cells. Such techniques are well known in the art and are useful for the generation of animal models of human disease. (See, e.g., U.S. Patent No. 5,175,383 and U.S. Patent No. 5,767,337.) For example, mouse ES cells, such as the mouse 129/SvJ cell line, are derived from the early mouse embryo and grown in culture. The ES cells are transformed with a vector containing the gene of interest disrupted by a marker gene, e.g., the neomycin phosphotransferase gene (neo; Capocchi, 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 (Marti, 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 VETRIP 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 VETRIP 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 VETRIP 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 VETRIP, e.g., by secreting VETRIP in its milk, may also serve as a convenient source of that protein (Janec, J. et al. (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4:55-74).

THERAPEUTICS

Chemical and structural similarity, e.g., in the context of sequences and motifs, exists between regions of VETRIP and vesicle trafficking proteins. In addition, the expression of VETRIP is closely associated with reproductive tissue, nervous tissue, cancer and inflammation/trauma.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Therefore, VETRP appears to play a role in vesicle trafficking disorders, autoimmune/inflammatory disorders, and cancer. In the treatment of disorders associated with increased VETRP expression or activity, it is desirable to decrease the expression or activity of VETRP. In the treatment of disorders associated with decreased VETRP expression or activity, it is desirable to increase the expression or activity of VETRP.

Therefore, in one embodiment, VETRP 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 VETRP. Examples of such disorders include, but are not limited to, a vesicle trafficking disorder, such as cystic fibrosis, glucose-galactose malabsorption syndrome, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, diabetes insipidus, hyper- and hypoglycemia, Grave's disease, goiter, Cushing's disease, and Addison's disease; gastrointestinal disorders including ulcerative colitis, gastric and duodenal ulcers; other conditions associated with abnormal vesicle trafficking, including acquired immunodeficiency syndrome (AIDS); allergies including hay fever, asthma, and urticaria (hives); autoimmune hemolytic anemia; proliferative glomerulonephritis; inflammatory bowel disease; multiple sclerosis; myasthenia gravis; rheumatoid and osteoarthritis; scleroderma; Chediak-Higashi and Sjögren's syndromes; systemic lupus erythematosus; toxic shock syndrome; traumatic tissue damage; and viral, bacterial, fungal, helminthic, and protozoal infections; 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, 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, myocardial or pericardial inflammation, osteoarthritis, osteoporosis, pancreatitis, polymyositis, psoriasis, Reiter's syndrome, rheumatoid arthritis, scleroderma, Sjögren's syndrome, systemic anaphylaxis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, thrombocytopenic purpura, ulcerative colitis, uveitis, Werner syndrome, complications of cancer, hemodialysis, and extracorporeal circulation, viral, bacterial, fungal, parasitic, protozoal, and helminthic infections, and trauma; and 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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

uterus.

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

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

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

In a further embodiment, an antagonist of VETRP may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with increased expression or activity of VETRP. Examples of such disorders include, but are not limited to, those vesicle trafficking disorders,

15 autoimmune/inflammatory disorders, and cancer described above. In one aspect, an antibody which specifically binds VETRP 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 VETRP.

In an additional embodiment, a vector expressing the complement of the polynucleotide encoding VETRP may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with
20 increased expression or activity of VETRP 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
25 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 VETRP may be produced using methods which are generally known in the art. In particular, purified VETRP may be used to produce antibodies or to screen libraries of
30 pharmaceutical agents to identify those which specifically bind VETRP. Antibodies to VETRP 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.

35 For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice, humans,

WO 01/46256

PCT/US00/34919

and others may be immunized by injection with VETRP 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
 5 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 VETRP 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
 10 fragments are identical to a portion of the amino acid sequence of the natural protein. Short stretches of VETRP amino acids may be fused with those of another protein, such as KLH, and antibodies to the chimeric molecule may be produced.

Monoclonal antibodies to VETRP 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
 15 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.* 6:109-120.)

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," such as the
 20 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 VETRP-specific single
 25 chain antibodies. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, may be generated by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries. (See, e.g., Burton, D.R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10134-10137.)

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

Antibody fragments which contain specific binding sites for VETRP 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
 35 the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and

WO 01/46256

PCT/US00/34919

easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity. (See, e.g., Huse, W.D. et al. (1989) Science 246:1275-1281.)

Various immunoassays may be used for screening to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or monoclonal antibodies with established specificities are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between VETRP and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering VETRP 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 VETRP. Affinity is expressed as an association constant, K_a , which is defined as the molar concentration of VETRP-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 VETRP epitopes, represents the average affinity, or avidity, of the antibodies for VETRP. The K_a determined for a preparation of monoclonal antibodies, which are monospecific for a particular VETRP 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 VETRP-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 immunoprecipitation and similar procedures which ultimately require dissociation of VETRP, 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 VETRP-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 VETRP, 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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

encoding VETRP. 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 VETRP. (See, e.g., Agrawal, S., ed. (1996) Antisense Therapeutics, Humana Press Inc., Totawa NJ.)

5 In therapeutic use, any gene delivery system suitable for introduction of the antisense sequences into appropriate target cells can be used. Antisense sequences can be delivered intracellularly in the form of an expression plasmid which, upon transcription, produces a sequence complementary to at least a portion of the cellular sequence encoding the target protein. (See, e.g., Slater, J.E. et al. (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475; and Scanlon, K.J. et al. (1995) 9(13):1288-1296.) Antisense sequences can also be introduced intracellularly through the use of viral 10 vectors, such as retrovirus and adeno-associated virus vectors. (See, e.g., Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271; Ausubel, supra; Uckert, W. and W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347.) Other gene delivery mechanisms include liposome-derived systems, artificial viral envelopes, and other systems known in the art. (See, e.g., Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225; Boado, R.I. et al. (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315; and Morris, M.C. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 15 25(14):2730-2736.)

In another embodiment of the invention, polynucleotides encoding VETRP 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- 20 linked inheritance (Cavazzana-Calvo, M. et al. (2000) *Science* 288:669-672), severe combined immunodeficiency syndrome associated with an inherited adenosine deaminase (ADA) deficiency (Blaise, 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), thalassemias, familial 25 hypercholesterolemia, and hemophilia resulting from Factor VIII or Factor IX deficiencies (Crystal, R.G. (1995) *Science* 270:404-410; Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 389:239-242)), (ii) express a conditionally lethal gene product (e.g., in the case of cancers which result from unregulated cell proliferation), or (iii) express a protein which affords protection against intracellular parasites (e.g., against human retroviruses, such as human immunodeficiency virus (HIV) (Baltimore, D. 30 (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 VETRP expression or regulation causes disease, the expression of VETRP from an appropriate population of transduced cells may alleviate the clinical manifestations 35 caused by the genetic deficiency.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

In a further embodiment of the invention, diseases or disorders caused by deficiencies in VETRP are treated by constructing mammalian expression vectors encoding VETRP and introducing these vectors by mechanical means into VETRP-deficient cells. Mechanical transfer technologies for use with cells *in vivo* or *ex vitro* include (i) direct DNA microinjection into individual cells, (ii) ballistic gold particle delivery, (iii) liposome-mediated transfection, (iv) receptor-mediated gene transfer, and (v) the use of DNA transposons (Morgan, R.A. and W.F. Anderson (1993) *Annu. Rev. Biochem.* 62:191-217; Ivics, Z. (1997) *Cell* 91:501-510; Boulay, J.-L. and H. R  capon (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:445-450).

Expression vectors that may be effective for the expression of VETRP include, but are not limited to, the pCDNA 3.1, EPITAG, PRCCMV2, PREP, PVAX vectors (Invitrogen, Carlsbad CA), FCMV-SCRIPT, PCMV-TAG, PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA), and PTET-OFF, PTET-ON, PTRE2, PTRE2-LUC, PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA). VETRP 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 PND; Invitrogen); the FK506/rapamycin inducible promoter; or the RU486/mifepristone inducible promoter (Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, *supra*), or (iii) a tissue-specific promoter or the native promoter of the endogenous gene encoding VETRP 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, R. 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 VETRP expression are treated by constructing a retrovirus vector consisting of (i) the polynucleotide encoding VETRP 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.*

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Natl. Acad. Sci. USA 92:6733-6737), incorporated by reference herein. The vector is propagated in an appropriate vector producing cell line (VPCL) that expresses an envelope gene with a tropism for receptors on the target cells or a promiscuous envelope protein such as VSVg (Armentano, D. et al. (1987) J. Virol. 61:1647-1650; Bender, M.A. et al. (1987) J. Virol. 61:1639-1646; Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806; Dull, T. et al. (1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zufferey, R. et al. (1998) J. Virol. 72:9873-9880). U.S. Patent Number 5,910,434 to Rigg ("Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant") discloses a method for obtaining retrovirus packaging cell lines and is hereby incorporated by reference. Propagation of retrovirus vectors, transduction of a population of cells (e.g., CD4⁺ T-cells), and the return of transduced cells to a patient are procedures well known to persons skilled in the art of gene therapy and have been well documented (Ranga, U. et al. (1997) J. Virol. 71:7020-7029; Bauer, G. et al. (1997) Blood 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716; Ranga, U. et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1201-1206; Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290).

In the alternative, an adenovirus-based gene therapy delivery system is used to deliver polynucleotides encoding VETRP to cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of VETRP. The construction and packaging of adenovirus-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. Replication defective adenovirus vectors have proven to be versatile for importing genes encoding immunoregulatory proteins into intact islets in the pancreas (Csete, M.B. 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 Antinuzzi, P.A. et al. (1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544; and Verma, I.M. and N. Souza (1997) Nature 389:239-242, both incorporated by reference herein.

In another alternative, a herpes-based, gene therapy delivery system is used to deliver polynucleotides encoding VETRP to target cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of VETRP. The use of herpes simplex virus (HSV)-based vectors may be especially valuable for introducing VETRP to cells of the central nervous system, for which HSV has a tropism. The construction and packaging of herpes-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. A replication-competent herpes simplex virus (HSV) type 1-based vector has been used to deliver a reporter gene to the eyes of primates (Liu, X. et al. (1999) Exp. Eye Res. 69:385-395). The construction of a HSV-1 virus vector has also been disclosed in detail in U.S. Patent Number 5,804,413 to DeLuca ("Herpes simplex virus strains for gene transfer"), which is hereby incorporated by reference. U.S. Patent Number 5,804,413 teaches the use of recombinant HSV d92 which consists of a genome containing at least one exogenous gene to be transferred to a

WO 01/46256

PCT/US00/34919

cell under the control of the appropriate promoter for purposes including human gene therapy. Also taught by this patent are the construction and use of recombinant HSV strains deleted for ICP4, ICP27 and ICP22. For HSV vectors, see also Goins, W.F. et al. (1999) J. Virol. 73:519-532 and Xu, H. et al. (1994) Dev. Biol. 163:152-161, hereby incorporated by reference. The manipulation of cloned
 5 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
 10 deliver polynucleotides encoding VETRP 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,
 15 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 VETRP into the alphavirus genome in place of the capsid-coding region results in the production of a large number of VETRP-coding RNAs and the synthesis of high levels of VETRP in vector transduced cells. While alphavirus infection is typically associated with cell lysis within a few days, the ability to establish a
 20 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 VETRP 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
 25 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,
 30 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.J. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing, Mt. Kisco NY, pp. 163-
 35 177.) A complementary sequence or antisense molecule may also be designed to block translation of

WO 01/46256

PCT/US00/34919

mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes.

Ribozymes, enzymatic RNA molecules, may also be used to catalyze the specific cleavage of RNA. The mechanism of ribozyme action involves sequence-specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. For example, 5 engineered hammerhead motif ribozyme molecules may specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of sequences encoding VETRP.

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, 10 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 15 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 VETRP. 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 20 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 25 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.

30 An additional embodiment of the invention encompasses a method for screening for a compound which is effective in altering expression of a polynucleotide encoding VETRP. 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- 35 macromolecular chemical entities which are capable of interacting with specific polynucleotide

WO 01/46256

PCT/US00/34919

sequences. Effective compounds may alter polynucleotide expression by acting as either inhibitors or promoters of polynucleotide expression. Thus, in the treatment of disorders associated with increased VETRP expression or activity, a compound which specifically inhibits expression of the polynucleotide encoding VETRP may be therapeutically useful, and in the treatment of disorders associated with decreased VETRP expression or activity, a compound which specifically promotes expression of the polynucleotide encoding VETRP may be therapeutically useful.

At least one, and up to a plurality, of test compounds may be screened for effectiveness in altering expression of a specific polynucleotide. A test compound may be obtained by any method commonly known in the art, including chemical modification of a compound known to be effective in altering polynucleotide expression; selection from an existing, commercially-available or proprietary library of naturally-occurring or non-natural chemical compounds; rational design of a compound based on chemical and/or structural properties of the target polynucleotide; and selection from a library of chemical compounds created combinatorially or randomly. A sample comprising a polynucleotide encoding VETRP is exposed to at least one test compound thus obtained. The sample may comprise, for example, an intact or permeabilized cell, or an *in vitro* cell-free or reconstituted biochemical system. Alterations in the expression of a polynucleotide encoding VETRP 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 VETRP. The amount of hybridization may be quantified, thus forming the basis for a comparison of the expression of the polynucleotide both with and without exposure to one or more test compounds. Detection of a change in the expression of a polynucleotide exposed to a test compound indicates that the test compound is effective in altering the expression of the polynucleotide. A screen for a compound effective in altering expression of a specific polynucleotide can be carried out, for example, using a *Schizosaccharomyces pombe* gene expression system (Adkins, D. et al. (1999) U.S. Patent No. 5,932,435; Arndt, G.M. et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28:E15) or a human cell line such as HeLa cell (Clarke, M.L. et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:8-13). A particular embodiment of the present invention involves screening a combinatorial library of oligonucleotides (such as deoxyribonucleotides, ribonucleotides, peptide nucleic acids, and modified oligonucleotides) for antisense activity against a specific polynucleotide sequence (Bruce, T.W. et al. (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 01/46256

PCT/US00/34919

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 VETRP, antibodies to VETRP, and mimetics, agonists, antagonists, or inhibitors of VETRP.

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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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

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

Normal dosage amounts may vary from about 0.1 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 VETRP may be used for the diagnosis of disorders characterized by expression of VETRP, or in assays to monitor patients being treated with VETRP or agonists, antagonists, or inhibitors of VETRP. Antibodies useful for diagnostic purposes may be prepared in the same manner as described above for therapeutics.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Diagnostic assays for VETRP include methods which utilize the antibody and a label to detect VETRP 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 VETRP, including ELISAs, RIAs, and FACS, are known in the art and provide a basis for diagnosing altered or abnormal levels of VETRP expression. Normal or standard values for VETRP expression are established by combining body fluids or cell extracts taken from normal mammalian subjects, for example, human subjects, with antibody to VETRP under conditions suitable for complex formation. The amount of standard complex formation may be quantitated by various methods, such as photometric means. Quantities of VETRP 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 VETRP 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 VETRP may be correlated with disease. The diagnostic assay may be used to determine absence, presence, and excess expression of VETRP, and to monitor regulation of VETRP levels during therapeutic intervention.

In one aspect, hybridization with PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding VETRP or closely related molecules may be used to identify nucleic acid sequences which encode VETRP. 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 VETRP, 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 VETRP 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:24-46 or from genomic sequences including promoters, enhancers, and introns of the VETRP gene.

Means for producing specific hybridization probes for DNAs encoding VETRP include the cloning of polynucleotide sequences encoding VETRP or VETRP 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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

polymerases and the appropriate labeled nucleotides. Hybridization probes may be labeled by a variety of reporter groups, for example, by radionuclides such as ³²P or ³⁵S, or by enzymatic labels, such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems, and the like.

Polynucleotide sequences encoding VETRP may be used for the diagnosis of disorders

- 5 associated with expression of VETRP. Examples of such disorders include, but are not limited to, a vesicle trafficking disorder, such as cystic fibrosis, glucose-galactose malabsorption syndrome, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, diabetes insipidus, hyper- and hypoglycemia, Grave's disease, goiter, Cushing's disease, and Addison's disease; gastrointestinal disorders including ulcerative colitis, gastric and duodenal ulcers; other conditions associated with abnormal vesicle
- 10 trafficking, including acquired immunodeficiency syndrome (AIDS); allergies including hay fever, asthma, and urticaria (hives); autoimmune hemolytic anemia; proliferative glomerulonephritis; inflammatory bowel disease; multiple sclerosis; myasthenia gravis; rheumatoid and osteoarthritis; scleroderma; Chediak-Higashi and Sjogren's syndromes; systemic lupus erythematosus; toxic shock syndrome; traumatic tissue damage; and viral, bacterial, fungal, helminthic, and protozoal infections;
- 15 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, cholecystitis, contact dermatitis, Crohn's disease, atopic dermatitis, dermatomyositis, diabetes
- 20 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 pericardial inflammation, osteoarthritis, osteoporosis, pancreatitis, polymyositis, psoriasis, Reiter's syndrome, rheumatoid arthritis, scleroderma, Sjogren's syndrome,
- 25 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; and a cancer, such as, adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, melanoma, myeloma, sarcoma, teratocarcinoma, and, in particular, cancers of the adrenal gland, bladder, bone, bone marrow, brain,
- 30 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. The polynucleotide sequences encoding VETRP 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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

altered VETRP expression. Such qualitative or quantitative methods are well known in the art.

In a particular aspect, the nucleotide sequences encoding VETRP may be useful in assays that detect the presence of associated disorders, particularly those mentioned above. The nucleotide sequences encoding VETRP 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 VETRP in the sample indicates the presence of the associated disorder. Such assays may also be used to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regimen in animal studies, in clinical trials, or to monitor the treatment of an individual patient.

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

Once the presence of a disorder is established and a treatment protocol is initiated, hybridization assays may be repeated on a regular basis to determine if the level of expression in the patient begins to approximate that which is observed in the normal subject. The results obtained from successive assays may be used to show the efficacy of treatment over a period ranging from several days to months.

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

Additional diagnostic uses for oligonucleotides designed from the sequences encoding VETRP may involve the use of PCR. These oligomers may be chemically synthesized, generated enzymatically, or produced *in vitro*. Oligomers will preferably contain a fragment of a polynucleotide encoding VETRP, or a fragment of a polynucleotide complementary to the polynucleotide encoding

WO 01/46256

PCT/US00/34919

VETRP, and will be employed under optimized conditions for identification of a specific gene or condition. Oligomers may also be employed under less stringent conditions for detection or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

In a particular aspect, oligonucleotide primers derived from the polynucleotide sequences encoding VETRP may be used to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs). SNPs are substitutions, insertions and deletions that are a frequent cause of inherited or acquired genetic disease in humans. Methods of SNP detection include, but are not limited to, single-stranded conformation polymorphism (SSCP) and fluorescent SSCP (fSSCP) methods. In SSCP, oligonucleotide primers derived from the polynucleotide sequences encoding VETRP 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 VETRP 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; Duplax, 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 in Seilhamer, J.J. et al., "Comparative Gene Transcript Analysis," U.S. Patent No. 5,840,484, incorporated herein by reference. 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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

monitor progression/regression of disease as a function of gene expression, and to develop and monitor the activities of therapeutic agents in the treatment of disease. In particular, this information may be used to develop a pharmacogenomic profile of a patient in order to select the most appropriate and effective treatment regimen for that patient. For example, therapeutic agents which are highly effective and display the fewest side effects may be selected for a patient based on his/her pharmacogenomic profile.

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

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

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

Transcript images which profile the expression of the polynucleotides of the present invention may also be used in conjunction with *in vitro* model systems and preclinical evaluation of pharmaceuticals, as well as toxicological testing of industrial and naturally-occurring environmental compounds. All compounds induce characteristic gene expression patterns, frequently termed molecular fingerprints or toxicant signatures, which are indicative of mechanisms of action and toxicity (Nuwaysir, E.F. et al. (1999) Mol. Carcinog. 24:153-159; Steiner, S. and N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471, expressly incorporated by reference herein). If a test compound has a signature similar to that of a compound with known toxicity, it is likely to share those toxic properties. These fingerprints or signatures are most useful and refined when they contain expression information from a large number of genes and gene families. Ideally, a genome-wide measurement of expression provides the highest quality signature. Even genes whose expression is not altered by any tested compounds are important as well, as the levels of expression of these genes

WO 01/46256

PCT/US00/34919

are used to normalize the rest of the expression data. The normalization procedure is useful for comparison of expression data after treatment with different compounds. While the assignment of gene function to elements of a toxicant signature aids in interpretation of toxicity mechanisms, knowledge of gene function is not necessary for the statistical matching of signatures which leads to prediction of toxicity. (See, for example, Press Release 00-02 from the National Institute of Environmental Health Sciences, released February 29, 2000, available at <http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm>.) Therefore, it is important and desirable in toxicological screening using toxicant signatures to include all expressed gene sequences.

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

Another particular embodiment relates to the use of the polypeptide sequences of the present invention to analyze the proteome of a tissue or cell type. The term proteome refers to the global pattern of protein expression in a particular tissue or cell type. Each protein component of a proteome can be subjected individually to further analysis. Proteome expression patterns, or profiles, are analyzed by quantifying the number of expressed proteins and their relative abundance under given conditions and at a given time. A profile of a cell's proteome may thus be generated by separating and analyzing the polypeptides of a particular tissue or cell type. In one embodiment, the separation is achieved using two-dimensional gel electrophoresis, in which proteins from a sample are separated by isoelectric focusing in the first dimension, and then according to molecular weight by sodium dodecyl sulfate slab gel electrophoresis in the second dimension (Steiner and Anderson, supra). The proteins are visualized in the gel as discrete and uniquely positioned spots, typically by staining the gel with an agent such as Coomassie Blue or silver or fluorescent stains. The optical density of each protein spot is generally proportional to the level of the protein in the sample. The optical densities of equivalently positioned protein spots from different samples, for example, from biological samples either treated or untreated with a test compound or therapeutic agent, are compared to identify any changes in protein spot density related to the treatment. The proteins in the spots are partially sequenced using, for example, standard methods employing chemical or enzymatic cleavage followed by mass spectrometry. The identity of the protein in a spot may be determined by comparing its partial sequence, preferably of at least 5 contiguous amino acid residues, to the polypeptide sequences of the present invention. In some cases, further sequence data may be

WO 01/46256

PCT/US00/34919

obtained for definitive protein identification.

A proteomic profile may also be generated using antibodies specific for VETRP to quantify the levels of VETRP 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; Mendoza, L.G. et al. (1999) *Biotechniques* 27:778-788). Detection may be performed by a variety of methods known in the art, for example, by reacting the proteins in the sample with a thiol- or amino-reactive fluorescent compound and detecting the amount of fluorescence bound at each array element.

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

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

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

Microarrays may be prepared, used, and analyzed using methods known in the art. (See, e.g., Brennan, T.M. et al. (1995) U.S. Patent No. 5,474,796; Schena, M. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10614-10619; Baldeschweiler et al. (1995) PCT application WO95/251116; Shalon, D. et al.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

(1995) PCT application WO95/35505; Heller, R.A. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155; and Heller, M.J. et al. (1997) U.S. Patent No. 5,605,662.) Various types of microarrays are well known and thoroughly described in DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, ed. (1999) Oxford University Press, London, hereby expressly incorporated by reference.

5 In another embodiment of the invention, nucleic acid sequences encoding VETRP 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

10 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.

15 (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, e.g., Lauder, E.S. and D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357.)

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) may be correlated with other physical and genetic

20 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 VETRP 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.

25 *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

30 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

35 translocation, inversion, etc., among normal, carrier, or affected individuals.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

In another embodiment of the invention, VETRP, 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 VETRP 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 VETRP, or fragments thereof,
10 and washed. Bound VETRP is then detected by methods well known in the art. Purified VETRP 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 VETRP specifically compete with a test compound for binding VETRP. In this manner, antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with VETRP.

In additional embodiments, the nucleotide sequences which encode VETRP 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 preferred specific
25 embodiments are, therefore, to be construed as merely illustrative, and not limitative of the remainder of the disclosure in any way whatsoever.

The disclosures of all patents, applications, and publications mentioned above and below, in particular U.S. Ser. No. 60/172,968 and U.S. Ser. No. 60/172,066 are hereby expressly incorporated by reference.

30 EXAMPLES

I. Construction of cDNA Libraries

RNA was purchased from Clontech or isolated from tissues described in Table 4. Some tissues were homogenized and lysed in guanidinium isothiocyanate, while others were homogenized and lysed in phenol or in a suitable mixture of denaturants, such as TRIzol (Life Technologies), a
35 monophasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate. The resulting lysates were centrifuged

WO 01/46256

PCT/US00/34919

over CsCl cushions or extracted with chloroform. RNA was precipitated from the lysates with either isopropanol or sodium acetate and ethanol, or by other routine methods.

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

In some cases, Stratagene was provided with RNA and constructed the corresponding cDNA libraries. Otherwise, cDNA was synthesized and cDNA libraries were constructed with the UNIZAP vector system (Stratagene) or SUPERScript plasmid system (Life Technologies), using the recommended procedures or similar methods known in the art. (See, e.g., Ausubel, 1997, *supra*, units 5.1-6.6.) Reverse transcription was initiated using oligo d(T) or random primers. Synthetic oligonucleotide adapters were ligated to double stranded cDNA, and the cDNA was digested with the appropriate restriction enzyme or enzymes. For most libraries, the cDNA was size-selected (300-1000 bp) using SEPHACRYL S1000, SEPHAROSE CL2B, or SEPHAROSE CL4B column chromatography (Amersham Pharmacia Biotech) or preparative agarose gel electrophoresis. cDNAs were ligated into compatible restriction enzyme sites of the polylinker of a suitable plasmid, e.g., PBLUESCRIPT plasmid (Stratagene), PSPORT1 plasmid (Life Technologies), pcDNA2.1 plasmid (Invitrogen, Carlsbad CA), or pNCY plasmid (Incyte Genomics, Palo Alto CA). Recombinant plasmids were transformed into competent *E. coli* cells including XL1-Blue, XL1-BlueMRF, or SOLR from Stratagene or DH5 α , DH10B, or ElectroMAX DH10B from Life Technologies.

II. Isolation of cDNA Clones

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

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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

scanner (LabSystems Oy, Helsinki, Finland).

III. Sequencing and Analysis

Inocyte 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 VI.

The polynucleotide sequences derived from cDNA sequencing were assembled and analyzed using a combination of software programs which utilize algorithms well known to those skilled in the art. Table 5 summarizes the tools, programs, and algorithms used and provides applicable descriptions, references, and threshold parameters. The first column of Table 5 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, the greater the homology between two sequences). Sequences were analyzed using MACDNASIS PRO software (Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA) and LASERGENE software (DNASTAR). Polynucleotide and polypeptide sequence alignments were generated using the 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.

The polynucleotide sequences were validated by removing vector, linker, and polyA sequences and by masking ambiguous bases, using algorithms and programs based on BLAST, dynamic programming, and dinucleotide nearest neighbor analysis. The sequences 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 PFAM to acquire

WO 01/46256

PCT/US00/34919

annotation using programs based on BLAST, FASTA, and BLIMPS. The sequences were assembled into full length polynucleotide sequences using programs based on Phred, Phrap, and Consed, and 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 amino acid sequences, and these full length sequences were subsequently analyzed by querying against databases such as the GenBank databases (described above), SwissProt, BLOCKS, PRINTS, DDMO, PRODOM, Prosite, 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, e.g., Eddy, S.R. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:361-365.)

The programs described above for the assembly and analysis of full length polynucleotide and amino acid sequences were also used to identify polynucleotide sequence fragments from SEQ ID NO:24-46. Fragments from about 20 to about 4000 nucleotides which are useful in hybridization and amplification technologies were described in The Invention section above.

IV. Analysis of Polynucleotide Expression

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

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

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

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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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.

5 The results of northern analyses are reported as a percentage distribution of libraries in which the transcript encoding VETRP occurred. Analysis involved the categorization of cDNA libraries by organ/tissue and disease. The organ/tissue categories included cardiovascular, dermatologic, developmental, endocrine, gastrointestinal, hematopoietic/immune, musculoskeletal, nervous, reproductive, and urologic. The disease/condition categories included cancer, inflammation, trauma, cell proliferation, neurological, and pooled. For each category, the number of libraries expressing the
10 sequence of interest was counted and divided by the total number of libraries across all categories. Percentage values of tissue-specific and disease- or condition-specific expression are reported in Table 3.

V. Chromosomal Mapping of ABBR Encoding Polynucleotides

15 The cDNA sequences which were used to assemble SEQ ID NO:24-46 were compared with sequences from the Incyte LIFESEQ database and public domain databases using BLAST and other implementations of the Smith-Waterman algorithm. Sequences from these databases that matched SEQ ID NO:24-46 were assembled into clusters of contiguous and overlapping sequences using assembly algorithms such as Phrap (Table 5). Radiation hybrid and genetic mapping data available
20 from public resources such as the Stanford Human Genome Center (SHGC), Whitehead Institute for Genome Research (WIGR), and Génethon 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.

The genetic map locations of SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID
25 NO:42, and SEQ ID NO:44 are described in The Invention as ranges, or intervals, of human chromosomes. More than one map location is reported for SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, and SEQ ID NO:44, indicating that previously mapped sequences having similarity, but not complete identity, to SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, and SEQ ID NO:44 were assembled into their respective clusters. The map position of an interval, in centiMorgans, is measured relative to the terminus of the
30 chromosome's p-arm. (The centiMorgan (cM) is a unit of measurement based on recombination frequencies between chromosomal markers. On average, 1 cM is roughly equivalent to 1 megabase (Mb) of DNA in humans, although this can vary widely due to hot and cold spots of recombination.) The cM distances are based on genetic markers mapped by Génethon which provide boundaries for radiation hybrid markers whose sequences were included in each of the clusters. Human genomic
35 maps and other resources available to the public, such as the NCBI "GeneMap'99" World Wide Web

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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.

VI. Extension of VETRP Encoding Polynucleotides

The full length nucleic acid sequences of SEQ ID NO:24-46 were 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, 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 Mg²⁺, (NH₄)₂SO₄, and β-mercaptoethanol, Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech), ELONGASE enzyme (Life Technologies), and Pfu DNA polymerase (Stratagene), with the following parameters for primer pair PCLA and PCLB: Step 1: 94°C, 3 min; Step 2: 94°C, 15 sec; Step 3: 60°C, 1 min; Step 4: 68°C, 2 min; Step 5: Steps 2, 3, and 4 repeated 20 times; Step 6: 68°C, 5 min; Step 7: storage at 4°C. In the alternative, the parameters for primer pair T7 and SK+ were as follows: Step 1: 94°C, 3 min; Step 2: 94°C, 15 sec; Step 3: 57°C, 1 min; Step 4: 68°C, 2 min; Step 5: Steps 2, 3, and 4 repeated 20 times; Step 6: 68°C, 5 min; Step 7: storage at 4°C.

The concentration of DNA in each well was determined by dispensing 100 μl PICOGREEN quantitation reagent (0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR) dissolved in 1X TE and 0.5 μl of undiluted PCR product into each well of an opaque fluorimeter plate (Corning Costar, Acton MA), allowing the DNA to bind to the reagent. The plate was scanned in a Fluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) to measure the fluorescence of the sample and to quantify the concentration of DNA. A 5 μl to 10 μl aliquot of the reaction mixture was analyzed by electrophoresis on a 1 % agarose mini-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%)

WO 01/46256

PCT/US00/34919

agarose gels, fragments were excised, and agar digested with Agar ACl₃ (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, the polynucleotide sequences of SEQ ID NO:24-46 are used to obtain 5' regulatory sequences using the procedure above, along with oligonucleotides designed for such extension, and an appropriate genomic library.

VII. Labeling and Use of Individual Hybridization Probes

Hybridization probes derived from SEQ ID NO:24-46 are employed to screen cDNAs, genomic DNAs, or mRNAs. Although the labeling of oligonucleotides, consisting of about 20 base pairs, is specifically described, essentially the same procedure is used with larger nucleotide fragments. Oligonucleotides are designed using state-of-the-art software such as OLIGO 4.06 software (National Biosciences) and labeled by combining 50 pmol of each oligomer, 250 µCi of [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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

compared.

VIII. 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
5 aforementioned technologies should be uniform and solid with a non-porous surface (Schna (1999), *supra*). Suggested substrates include silicon, silica, glass slides, glass chips, and silicon wafers. Alternatively, a procedure analogous to a dot or slot blot may also be used to arrange and link elements to the surface of a substrate using thermal, UV, chemical, or mechanical bonding
10 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., Schna, M. et al. (1995) *Science* 270:467-470; Shalon, D. et al. (1996) *Genome Res.* 6:639-645; Marshall, A. and J. Hodgson (1998) *Nat. Biotechnol.* 16:27-31.)

Full length cDNAs, Expressed Sequence Tags (ESTs), or fragments or oligomers thereof may
15 comprise the elements of the microarray. Fragments or oligomers suitable for hybridization can be selected using software well known in the art such as LASERGENE software (DNASTAR). The array elements are hybridized with polynucleotides in a biological sample. The polynucleotides in the biological sample are conjugated to a fluorescent label or other molecular tag for ease of detection. After hybridization, nonhybridized nucleotides from the biological sample are removed, and a
20 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.

25 Tissue or Cell Sample Preparation

Total RNA is isolated from tissue samples using the guanidinium thiocyanate method and poly(A)⁺ RNA is purified using the oligo-(dT) cellulose method. Each poly(A)⁺ RNA sample is reverse transcribed using MMLV reverse-transcriptase, 0.05 pg/μl oligo-(dT) primer (21mer), 1X first strand buffer, 0.03 units/μl RNase inhibitor, 500 μM dATP, 500 μM dGTP, 500 μM dTTP, 40
30 μM dCTP, 40 μM dCTP-Cy3 (BDS) or dCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech). The reverse transcription reaction is performed in a 25 ml volume containing 200 ng poly(A)⁺ RNA with GEMBRIGHT kits (Incyte). Specific control poly(A)⁺ RNAs are synthesized by *in vitro* transcription from non-coding yeast genomic DNA. After incubation at 37 °C for 2 hr, each reaction sample (one with Cy3 and another with Cy5 labeling) is treated with 2.5 ml of 0.5M sodium hydroxide and
35 incubated for 20 minutes at 85 °C to stop the reaction and degrade the RNA. Samples are purified

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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

5 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

10 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

15 washes between and after treatments. Glass slides are etched in 4% hydrofluoric acid (VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA), washed extensively in distilled water, and coated with 0.05% aminopropyl silane (Sigma) in 95% ethanol. Coated slides are cured in a 110°C oven.

Array elements are applied to the coated glass substrate using a procedure described in US

20 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.

25 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

30 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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

incubated for about 6.5 hours at 60°C. The arrays are washed for 10 min at 45°C in a first wash buffer (1X SSC, 0.1% SDS), three times for 10 minutes each at 45°C in a second wash buffer (0.1X SSC), and dried.

Detection

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

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

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

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

A grid is superimposed over the fluorescence signal image such that the signal from each

WO 01/46256

PCT/US00/34919

spot is contored 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).

IX. Complementary Polynucleotides

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

X. Expression of VETRP

Expression and purification of VETRP is achieved using bacterial or virus-based expression systems. For expression of VETRP in bacteria, cDNA is subcloned into an appropriate vector containing an antibiotic resistance gene and an inducible promoter that directs high levels of cDNA transcription. Examples of such promoters include, but are not limited to, the *trp-lac* (*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 VETRP upon induction with isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Expression of VETRP in eukaryotic cells is achieved by infecting insect or mammalian cell lines with recombinant *Autographica californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV), commonly known as baculovirus. The nonessential polyhedrin gene of baculovirus is replaced with cDNA encoding VETRP 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, VETRP 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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

immobilized glutathione under conditions that maintain protein activity and antigenicity (Amersham Pharmacia Biotech). Following purification, the GST moiety can be proteolytically cleaved from VETRP at specifically engineered sites. FLAG, an 8-amino acid peptide, enables immunaffinity 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 VETRP obtained by these methods can be used directly in the assays shown in Examples XI and XV.

XI. Demonstration of VETRP Activity

VETRP activity is measured by its inclusion in coated vesicles. VETRP can be expressed by transforming a mammalian cell line such as COS7, HeLa, or CHO with an eukaryotic expression vector encoding VETRP. Eukaryotic expression vectors are commercially available, and the techniques to introduce them into cells are well known to those skilled in the art. A small amount of a second plasmid, which expresses any one of a number of marker genes, such as β -galactosidase, is co-transformed into the cells in order to allow rapid identification of those cells which have taken up and expressed the foreign DNA. The cells are incubated for 48-72 hours after transformation under conditions appropriate for the cell line to allow expression and accumulation of VETRP and β -galactosidase.

Transformed cells are collected and cell lysates are assayed for vesicle formation. A non-hydrolyzable form of GTP, GTP γ S, and an ATP regenerating system are added to the lysate and the mixture is incubated at 37 °C for 10 minutes. Under these conditions, over 90% of the vesicles remain coated (Orci, L. et al (1989) Cell 56:357-368). Transport vesicles are salt-released from the Golgi membranes, loaded under a sucrose gradient, centrifuged, and fractions are collected and analyzed by SDS-PAGE. Co-localization of VETRP with clathrin or COP coatamer is indicative of VETRP activity in vesicle formation. The contribution of VETRP in vesicle formation can be confirmed by incubating lysates with antibodies specific for VETRP prior to GTP γ S addition. The antibody will bind to VETRP and interfere with its activity, thus preventing vesicle formation.

In the alternative, VETRP activity is measured by its ability to alter vesicle trafficking pathways. Vesicle trafficking in cells transformed with VETRP is examined using fluorescence microscopy. Antibodies specific for vesicle coat proteins or typical vesicle trafficking substrates such as transferrin or the mannose-6-phosphate receptor are commercially available. Various cellular components such as ER, Golgi bodies, peroxisomes, endosomes, lysosomes, and the plasmalemma are examined. Alterations in the numbers and locations of vesicles in cells transformed with VETRP as compared to control cells are characteristic of VETRP activity.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

XII. Functional Assays

VETRP function is assessed by expressing the sequences encoding VETRP 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 plasmid (Life Technologies) and pCR3.1 plasmid (Invitrogen), 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 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 VETRP on gene expression can be assessed using highly purified populations of cells transfected with sequences encoding VETRP 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 VETRP and other genes of interest can be analyzed by northern analysis or microarray techniques.

XIII. Production of VETRP Specific Antibodies

VETRP 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 VETRP amino acid sequence is analyzed using LASERGENE software

WO 01/46256

PCT/US00/34919

(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.)

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

XIV. Purification of Naturally Occurring VETRP Using Specific Antibodies

- Naturally occurring or recombinant VETRP is substantially purified by immunoaffinity
 15 chromatography using antibodies specific for VETRP. An immunoaffinity column is constructed by covalently coupling anti-VETRP 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 VETRP are passed over the immunoaffinity column, and the column is
 20 washed under conditions that allow the preferential absorbance of VETRP (e.g., high ionic strength buffers in the presence of detergent). The column is eluted under conditions that disrupt antibody/VETRP 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 VETRP is collected.

XV. Identification of Molecules Which Interact with VETRP

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

Alternatively, molecules interacting with VETRP 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).

- VETRP may also be used in the PATHCALLING process (CuraGen Corp., New Haven CT)
 35 which employs the yeast two-hybrid system in a high-throughput manner to determine all interactions

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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

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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 1

Polyptide Seq ID NO.	Nucleotide Seq ID NO.	Clone ID	Library	Fragments
1	24	381039	HYPOCHO1	381039H1 (HYPOCHO1), 1558030F6 (BLADTUT04), 1653755H1 (PROSTUT08), 2427916X2C1 (COLONOT1), 232916K57C1 (COLONOT11), 2503105H1 (CIBUTU01), 264972556 (KIDNEFT01), 3105456F6 (HEAROT05), 3278946H1 (SPINFE02)
2	25	383249	HYPOCHO1	383249H1 (HYPOCHO1), 4310090F6 (HEAROT01), 838C01838V1, 838C00170V1, 838A04368V1, 838C00956V1
3	25	618769	PCANCT01	618769H1 (PCANCT01), 518769F6 (PCANCT01), 897423H1 (PCANCT05), 897423H1 (PCANCT05), 22654586 (PCANCT01), 3026516F6 (HEAROT02), 301825H2 (PCANCT05)
4	27	1234827	LUNGFT03	783436H1 (BRALTUT02), 1234827H1 (LUNGFT03), 1237053F6 (LUNGFT03), 1721323F6 (BLADNOT06), 2751788V7 (HEP1A2S06), 977212V7
5	29	1607223	LUNGNOT15	1250975F6 (LUNGFE03), 1270831H1 (TESTTUT02), 1399306F1 (BRALTUT06), 1607223H1 (LUNGNOT15), 1684804F6 (PROGNOT15), 1803548F6 (SANTOT13), 2844466F6 (OVARGNOT10), 3274147F6 (PROSEPT06), 3289542F6 (HONREF01), SCFAC4890V1
6	29	1621554	BRALTUT13	795816F1 (OVARGNOT03), 795816H1 (OVARGNOT03), 855789H1 (NGANOT01), 1357564F6 (LUNGNOT09), 1621554H1 (BRALTUT13), 2081463H1 (UTERNOT08), 2474413F6 (SECANOT01), 2812794F6 (OVARGNOT10), 3296847H1 (TLYJING01), 4642798H1 (PROSTUT03)
7	30	1751553	LIVRTUT01	81669386 (OVARTUT01), 816693X311D1 (OVARTUT01), 816693X313D1 (OVARTUT01), 1676292F6 (SPCKPFT01), 1676292F6 (SPCKPFT01), 1751553H1 (LIVRTUT01), 1981902F6 (LUNGNOT03), 1981902F6 (LUNGNOT03), 3050010H1 (LUNGNOT25), 4419520T6 (LIVRTUT02), 5208961H1 (BRANCT02), 92823700
8	31	1832403	BRALNOT1	025882H1 (SELPFT01), 1255756F2 (MENITUT03), 1832403H1 (BRALNOT1), 2305321R6 (NGANOT01)

Table 1 (cont.)

[illegible]

Table 1 (cont.)

[illegible]

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 1 (cont.)

Polypeptide Seq. ID No.	Nucleotide Seq. ID No.	Clone ID	Library	Fragments
22	45	5870962	COLTDT04	14153076 (BRSMOT12), 15041596 (BRATUT07), 16925536 (COLANOT23), 18665566 (SRIBUT01), 29113111 (KIDNUT15), 29124636 (KIDNUT15), 29261626 (TYMANOT04), 51215451 (SNCBUT01), 58120631 (KIDCTMT02), 58709621 (COLTDT04), 60949091 (TRPATX03)
23	46	2818605		28186058 (BRSENOT14), 49042126 (TRVSENOT08), 14956456 (PROSNON01)

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 2

Poly-peptide SEQ ID No.	Amino Acid Residues	Potential Phosphoryla- tion Sites	Potential Glycosyla- tion Sites	Signature Sequences, Motifs and Domains	Homologous Sequence	Analytical Methods and Databases
1	481	S272 T56 T90 T92 S158 S313 S416 S417 S442	N433	Purative GTPase activating protein for RhoA binding domain RhoA (GrGAP): R330-G153 GTP-NEW interacting protein: N42-P80, V83-W104, N42-W144 GAP-type zinc finger domain: N41-P93	G1135319 nucleoside (Horse spleen) Mikoshiba Y. et al. (1998) Chem. Phys. Lipids 98:59-67 Saitoh A. F. et al. (1997) Cancer Res. 57:2239-2249 Gocher D. et al. (1998) Science Res. 8:1060-1073	Motifs BLAST-GENBANK BLAST-PRIMS BLAST-PROT HMMER-PRIM BLAST-PROTOK
2	195	S40 S110 S144		Podocalyxin-like protein: N1-T195 F24 protein: N1-T195	G189141 Neural organelle transport protein P24 (Mus musculus) Kadota, I. et al. (1997) Brain Res. Mol. Brain Res. 49:265-273	Motifs BLAST-GENBANK BLAST-PROTOK

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 2 cont.

Poly-peptide SPQ ID No.	Amino Acid Residues	Potential Phosphoryla- tion Sites	Potential Glycosyla- tion Sites	Signature Sequences, Motifs and Domains	Homologous Sequence	Analytical Methods and Databases
3	313	T65 T76 S150 T212 S251 T256 S277 T80 S130 T155	N2	Protein Kinase C C2 domain: L26-T115, T186-T273 Protein Kinase C C2 domain: T13-Q69 C2 domain motif: L54-E79 C2 domain: G11-T128	g5926736 granophilin-a (Mus musculus) Wang, J. et al. PROFILES-CAV BLINFS PFAM BLAST_XMO	Motifs BLAST-GENBANK SMART PFAM PROFILES-CAV BLINFS PFAM BLAST_XMO
4	201	S11 T74 S93 T94 S119 T149		SNF7 Nuclear transcription regulation protein motif: N3-E55	g3873551 coiled- coil protein (Schistosomacrony- es pombe)	Motifs BLAST-GENBANK BLAST_PRODOM BLAST_XMO
5	566	S112 S171 S195 S250 S282 S345 T381 T443 S503 T542 T547 S26 S35 S139 T377 S433 T47	N213 N387	Gamma-Adaptin Clathrin assembly protein complex: S407-MS63 Gamma adaptin motif: R331-P541	g961444 related to mouse gamma adaptin (Homo sapiens) Nagase, T. et al. [1995] DNA Res. 2: 167-174	Motifs BLAST-GENBANK BLAST_PRODOM BLAST_XMO
6	270	S192 S34 T51 S131 T146 T266 T18 T50 S187 S246			g4689260 sorting nexin 10 (Homo sapiens) Kurcen, R. et al. [1996] Science 272:1008-1010	Motifs BLAST-GENBANK

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 2 cont.

Poly-peptide SEQ ID No.	Amino Acid Residues	Potential Phosphoryla- tion Sites	Potential Glycosyla- tion Sites	Signature Sequences, Motifs and Domains	Homologous Sequence	Analytical Methods and Databases
7	490	S205 T320 T407 S94 S106 S156 S174 S218 S235 S255 S279 T320 S332 S397 S430 T418 S560 S102 S141 S162 S182 S200 S201 S248 S263 T304 T315 S327 S445	N22 N38 N180 N209 N234	C2 domain: L368-W456	g272412a synaptotagmin VII (Homo sapiens) Cooper P.R. et al. (1998) Genomics 49: 419-429	Motifs BLAST-GENBANK HMMER_Pfam
8	136	T20 S50 T20 T117 T01 T129	N110		G4206090 snapin SNARE-associated synaptic transmission protein (Mus musculus) Lardi, J.M. et al. (1995) Nat. Neurosci. 2:119- 124	Motifs BLAST-GENBANK

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 2 cont.

Poly-peptide SEQ ID No.	Amino Acid Residues	Potential Phosphoryla- tion Sites	Potential Glycosyla- tion Sites	Signature Sequences, Motifs and Domains	Homologous Sequence	Analytical Methods and Databases
9	1104	T269 T816 T225 S27 T32 S4 S12 S123 S132 T182 S288 S342 S427 S453 S470 S495 S566 S506 T566 S526 T637 T752 T773 S826 S850 S833 S850 S101 T116 S143 S469 S886 S738 T769 T789 S831 S997 T1022 S1027 S1058	N212 N273 N1042	Transmembrane motif: Y59-S92 ATP-GDP binding site: G667-S674 C2 profile: K419-K735, I331- K417 S877 S878-Q1077, L800- S877 L480-T556 C2 domain: V670-L682, E684- I707 D724 Q protein-coupled receptor: S881-L897 C2 domain: G973-D1097	C4193489 GIUF4 vesicle protein (Rattus norvegicus) Kobayashi, M. (1998) AGC. Exp. Mas. E101. 411:47-61; Morris, R.J. et al. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1431:525-530	Motifs BLAST-GENBANK HMMER_Pfam HMMER_Pfam BLAST-PROTEIN BLAST-PROTEIN BLAST-PROTEIN BLAST-PROTEIN
10	411	S15 S19 S29 S49 T84 S135 T209 T322 S387 T406 S19 S75 T117 T128 T322	N27 N126 N237		93560143 putative vacuolar protein sorting- associated protein (Schizosaccharomyces pombe)	Motifs BLAST-GENBANK
11	201	S28 S141 S183 T44 Y171			9469262 sorting nexin 11 (Homo sapiens)	Motifs BLAST-GENBANK

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 2 cont.

Poly-peptide SEQ ID NO.	Amino Acid Residues	Potential Phosphoryla- tion Sites	Potential Glycosyla- tion Sites	Signature Sequences, Motifs and Domains	Homologous Sequence	Analytical Methods and Databases
12	476	S61 S6 T44 S74 S156 S207 T245 T306 T330 T432 S6 T542 T245 S323	N43 N192 N305 N345 N385 N418		G3483017 TOM1-like protein (Homo sapiens) Sapassi E. et al. (1999) Genomics 57:330-358	Motifs BLAST-GENBANK
13	1220	T110 S91 T194 S233 S385 T434 S440 S455 T457 S527 S584 T574 S718 T1121 T1122 S1133 S66 S190 S211 T613 S799 S986 T1104 T1108 T1139 S1147 S495 T194 T182	N40 N143 N562 N1181 N1197	WEE1 protein transport protein: N1-W229	94104321 vesicula associated protein (Rattus norvegicus)	Motifs BLAST-GENBANK EMBL-EMBL
14	222	T58 S93 T103	N197	Pleckstrin homology domain: A2-T109	96011425 evectin-2 (Mus musculus) Kriegge R. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:4631-4638	Motifs BLAST-GENBANK EMBL-EMBL

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 2 cont.

Poly-peptide SEQ ID NO.	Amino Acid Residues	Potential Phosphoryla- tion Sites	Potential Glycosyla- tion Sites	Signature Sequences, Motifs and Domains	Homologous Sequence	Analytical Methods and Databases
15	924	S431 S14 S145 T178 T211 T330 T349 S387 S435 S525 T563 T574 T594 T651 T673 S691 S698 S751 S888 T25 T77 S82 T118 S128 T211 T239 S268 S436 T440 T554 S631 S674 S676 Y634	M164 M174 M177 M411 M475	ATP-GTP binding site: A109-T315 Exocyst complex component: N494-S918	G282T158 rsc6c exocyst complex subunit (Rattus norvegicus) Kee Y. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:14438-14443	Motifs BLAST-GENBANK BLAST-PRODB
16	435	T46 T63 S239 S441 T256 S461 S508 S513 S570 S550 T605 T426 T44 S86 T127 T164 S117 S123 T289 T230	N354 M404 M407 M418		S350561 P41 COOH-terminal interactor protein (Rattus norvegicus) Chen, J. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:33524-33532	Motifs BLAST-GENBANK

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 2 cont.

Poly-peptide SEQ ID NO:	Amino Acid Residues	Potential Phosphoryla- tion Sites	Potential Glycosyla- tion Sites	Signature Sequences, Motifs and Domains	Homologous Sequence	Analytical Methods and Databases
17	321	T72 S130 S168 S226 S253 S280 S304 T264	N41 N262	Vacuolar sorting- associated protein: T17-T152	G311953 TOM1 (Homo sapiens) Sarcoussi, E. et al. (1993) Genomics 57:350-358	Motifs BLAST-GENBANK BLAST-PRODOM
18	499	S58 S140 T207 S209 S233 T259 S267 S456 S463 S36 S72 T264 S351 T461	N75 N461	Signal peptide: M-T25 Lectin precursor: S39-T253 luminal domain: T9-T215	G50932P α-GalSI mannose- specific lectin (Homo sapiens) Akera, C. et al. (1995) X-Biol. Chem. 270:3351-3355	Motifs BLAST-GENBANK BLAST-PRODOM BLAST-DMO HAMMER
19	879	T14 S104 T150 S181 S236 S237 S244 S271 T336 S476 S484 S486 T494 S505 T533 S559 T708 S731 S834 T864 T14 S38 S210 S297 S362 S840 S449 T627 S649 S705 T403 T687 T785 T614	N131 N146 N482 N703		G2078661 similar to S. cerevisiae intracellular protein transport protein (Caenorhabditis elegans) Wilson, R. et al. (1994) Nature 368:32-38	Motifs BLAST-GENBANK

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 2 cont.

Poly-peptide SEQ ID NO:	Amino Acid Residues	Potential Phosphoryla- tion Sites	Potential Glycosyla- tion Sites	Signature Sequences, Motifs and Domains	Homologous Sequence	Analytical Methods and Databases
20	238	T36 S77 S84 T126 S201 S270	N57 N158	NSP attachment protein signature: R37-K56, A100-F117, R129-R146, M162- Y185 M193-C212, R233- E253 R264-K284 NSP attachment protein M19-B284 Soluble attachment protein SNF: M1-E293	G3925617 alpha SNAP (platelet SNARE- associated protein) (Homo sapiens) Lancos P.P. (1997) Blood 90:1490-1500	Motifs BLAST-GBANK BLIPS-PRIM BLIPS-PRIM BLAST-PRIM BLAST-PRIM BLAST-PRIM
21	941	S253 S478 T241 T350 S101 T447 S417 T239 T325 T353 S468 S478 S573 T625 S707 S718 S827 S849 S851 S853 S923 S54 S217 S206 S467 S656 T800 S813 T918 S937 Y532 Y737	M435 N763 N852	ATP/GTP binding site: A153-T200 Zinc finger C1HC4: C82-C860, K615-C860 PHD finger: R835-S849 ATP-binding vacuolar biogenesis protein: L146-D466	G565102 vacuolar biogenesis protein BNO1 (PEP5) protein (Saccharomyces cerevisiae) Woolford, C. (1990) Genetics 125:739- 752	Motifs BLAST-GBANK BLIPS-PRIM BLIPS-PRIM BLAST-PRIM BLAST-PRIM BLAST-PRIM

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 2 cont.

Poly-peptide SEQ ID No.	Amino Acid Residues	Potential Phosphoryla- tion Sites	Potential Glycosyla- tion Sites	Signature Sequences, Motifs and Domains	Homologous Sequence	Analytical Methods and Databases
22	336	T87 S130 T161 S43 W192 T267 T234 S201 T302 T318 T113 W123 T226 S227 T288	N117 N246	C2 domain: L47-K136, V196-Q283, S34-Y90 C2 domain signature: K63-L75, E92-K105, L137-D145 C2 domain: L28-L137	Q5926736 transphilin-a (Mus musculus) Wang J. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:28542- 28548	Motifs BLAST-GENE HMMER_PFM BLASTZ PRINTS BLAST_ZOMO PROFILESCAN
23	163	T11 T54 S145 T155 S66	N125	Ankyrin repeats: R64-R96, E97-Q129, F130-K162	Q6624055 similar to ankyrin motif (demo sapiens) Salomon J.E. and Watkinson R. (1998) Genome Res. 8:2097-2105	NOTES HMMER_PFM

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 3

Nucleotide SEQ ID NO:	Selected Fragments	Tissue Expression (Fraction of Total)	Disease or Condition (Fraction of Total)	Vector
24	1-292 686-1265 1715-1983	Gastrointestinal (0.350) Nervous (0.167) Cardiovascular (0.125) Reproductive (0.125) Nervous (1.000)	Cancer (0.417) Inflammation (0.203) Cell proliferation (0.167)	PBLUESCRIPT
25	1302-1559		Cancer (0.350) Inflammation (0.350) Trauma (0.167)	PBLUESCRIPT
26	1-386 1034-1179	Reproductive (0.538) Musculoskeletal (0.154)	Cancer (0.615) Inflammation (0.154)	PSPORT1
27	1-1124	Reproductive (0.285) Cardiovascular (0.149) Nervous (0.128)	Cell Proliferation (0.077) Cancer (0.404) Cell proliferation (0.298) Inflammation (0.234)	pINCY
28	1-839 1697-2291	Reproductive (0.276) Gastrointestinal (0.141) Nervous (0.149)	Cancer (0.540) Inflammation (0.207) Cell proliferation (0.138)	pINCY
29	1-1509	Reproductive (0.313) Nervous (0.170) Endocrine (0.128) Gastrointestinal (0.128)	Cancer (0.447) Cell proliferation (0.191) Inflammation (0.191)	pINCY
30	659-1352 1976-2599	Reproductive (0.485) Cardiovascular (0.121) Gastrointestinal (0.121)	Cancer (0.576) Inflammation (0.212) Trauma (0.121)	pINCY
31	1-415	Reproductive (0.273) Nervous (0.227) Gastrointestinal (0.159)	Cancer (0.500) Cell proliferation (0.162) Inflammation (0.162)	PSPORT1
32	1-578 1020-3418	Reproductive (0.254) Hematopoietic/Immune (0.178) Nervous (0.162)	Cancer (0.401) Inflammation (0.310) Cell proliferation (0.176)	PBLUESCRIPT

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 3 (cont.)

Nucleotide SEQ ID NO.	Selected Features	Tissue Expression (Fraction of Total)	Disease or Condition (Fraction of Total)	Vector
33	186-215	Reproductive (0.255)	Cancer (0.510)	pSP0K1
	196-206	Cardiovascular (0.157)	Inflammation (0.196)	
	279-323	Nervous (0.137)	Trauma (0.157)	
34	473-750	Nervous (0.276)	Cancer (0.417)	pUNCY
	1404-1496	Hematopoietic/Immune (0.208)	Inflammation (0.347)	
35	1-42	Gastrointestinal (0.125)	Cell proliferation (0.153)	pUNCY
	1247-1482	Reproductive (0.341)	Cancer (0.638)	
		Gastrointestinal (0.205)	Cell proliferation (0.114)	
36	1-948	Urologic (0.114)	Inflammation (0.114)	pUNCY
	1687-1972	Reproductive (0.231)	Cancer (0.467)	
	2448-2534	Nervous (0.166)	Inflammation (0.226)	
37	2800-2960	Hematopoietic/Immune (0.126)	Cell proliferation (0.156)	pUNCY
	3035-3074			
	1-38	Hematopoietic/Immune (0.222)	Inflammation (0.370)	
38	1-71	Nervous (0.204)	Cancer (0.352)	pUNCY
	565-625	Reproductive (0.304)	Cell proliferation (0.259)	
	1142-2946	Reproductive (0.250)	Cancer (0.368)	
39	3445-3899	Nervous (0.235)	Inflammation (0.265)	pUNCY
	1-33	Gastrointestinal (0.132)	Cell proliferation (0.162)	
	801-723	Cardiovascular (0.250)	Cancer (0.250)	
40	993-1319	Dermatologic (0.250)	Inflammation (0.250)	pUNCY
	1467-1551	Reproductive (0.280)	Trauma (0.250)	
	1-72	Urologic (0.250)	Cancer (0.333)	
	651-1014	Reproductive (0.267)	Inflammation (0.267)	pUNCY
	1066-1088	Gastrointestinal (0.200)	Trauma (0.200)	
		Hematopoietic/Immune (0.133)		
		Nervous (0.133)		
		Urologic (0.133)		

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 3 (cont.)

Nucleotide Seq. ID No.	Selected Promoter	Tissue Expression (Fraction of Total)	Disease or Condition (Fraction of Total)	Vector
41	1-1367	Reproductive (0.75)	Cancer (0.75) Trauma (0.167)	pINCY
42	1-569 1065-2802	Nervous (0.193) Reproductive (0.193) Gastrointestinal (0.169)	Cancer (0.422) Cell proliferation (0.253) Inflammation (0.229)	pINCY
43		Nervous (0.600) Musculoskeletal (0.300) Reproductive (0.100)	Cancer (0.600) Neurological (0.200) Trauma (0.100)	pINCY
44	1-600	Hematopoietic/immune (0.192) Reproductive (0.192) Nervous (0.179)	Cancer (0.410) Inflammation (0.295) Cell proliferation (0.167)	pINCY
45	1-1363	Reproductive (0.298) Gastrointestinal (0.234) Nervous (0.149)	Cancer (0.532) Inflammation (0.234) Cell proliferation (0.149)	pINCY
46	1-448 388-985 529-1034	Breast T-lymphocyte Prostate	Adenocarcinoma Ductal Type	

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 4

Nucleotide Seq. ID NO.	Library	Library Description
24	HYPOH0501	This library was constructed using RNA (Clontech, #6579-2) isolated from the hypothalamus tissues of 51 male and female Caucasian donors, 16 to 75 years old.
25	HYPOH0501	This library was constructed using RNA (Clontech, #6579-2) isolated from the hypothalamus tissues of 51 male and female Caucasian donors, 16 to 75 years old.
26	PGANH0701	This library was constructed using RNA isolated from paraneoplastic tumor tissue removed from the intra-abdominal region of a 46-year-old Caucasian male. Pathology indicated a benign paraneoplastic syndrome and was associated with renal cell carcinoma. Clear cell cysts, which did not metastasize the capsule.
27	LUNGEST03	This library was constructed using RNA isolated from lung tissue removed from a Caucasian female fetus, who died at 20 weeks' gestation.
28	LUNGH0715	This library was constructed using RNA isolated from lung tissue removed from a 49-year-old Caucasian male. Pathology for the associated tumor tissue indicated residual invasive squamous cell carcinoma. Patient history included acute myocardial infarction, prosthetic hyperplasia, and malignant skin neoplasm. Family history included cerebrovascular disease, type I diabetes, acute myocardial infarction, and arteriosclerotic coronary disease.
29	BRAINT0713	This library was constructed using RNA isolated from brain tumor tissue from the frontal lobe of a 68-year-old Caucasian male. Pathology indicated a meningioma in the frontal lobe.
30	LIVERF0701	This library was constructed using RNA isolated from liver tumor tissue removed from a 51-year-old Caucasian female. Pathology indicated metastatic adenocarcinoma consistent with colon cancer. Family history included malignant neoplasm of the liver.
31	BRAINH0701	This library was constructed and normalized from 4.68 million independent clones from a brain library. RNA was made from brain tissue from a 26-year-old Caucasian male. Pathology for the associated tumor tissue indicated oligoastrocytoma in the right fronto-parietal part of the brain.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 4 (cont.)

Nucleotide Seq. ID NO.	Library	Library Description
32	UCCL5401	This library was constructed using RNA isolated from mononuclear cells obtained from the umbilical cord blood of 12 individuals. The cells were cultured for 12 days with IL-5 before RNA was obtained from the pooled lysates.
33	EBAIN0001	This library was constructed and normalized from 4.88 million independent clones from a brain library. RNA was made from brain tissue from a 26-year-old Caucasian male. Pathology for the associated tumor tissue indicated oligoastrocytoma in the right fronto-parietal part of the brain.
34	YSLER0001	This library was constructed using RNA isolated from a pooled collection of platelet-platelet cells.
35	SMCR0001	This library was constructed using RNA isolated from an aortic smooth muscle cell line derived from the explanted heart of a male during a heart transplant.
36	COMUT0001	This library was constructed using RNA isolated from sigmoid mesentery tumor tissue obtained from a 61-year-old female during a total abdominal hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy with regional lymph node excision. Pathology indicated a metastatic malignant mixed müllerian tumor present in the sigmoid mesentery at two sites.
37	OVART0002	This library was constructed using RNA isolated from ovarian tumor tissue removed from a 51-year-old Caucasian female during an exploratory laparotomy, total abdominal hysterectomy, salpingo-oophorectomy. Pathology indicated mucinous cystadenoma. Family history included atherosclerotic coronary artery disease, benign hypertension, breast cancer, and uterine cancer.
38	LUNG00023	This library was constructed using RNA isolated from lung tissue from a 58-year-old Caucasian male. Pathology for the associated tumor tissue indicated metastatic grade 3 (of 4) osteosarcoma. Patient history included soft tissue cancer, secondary cancer of the lung, prostate cancer, and an acute cholelith ulcer with hemorrhage. Family history included prostate cancer, breast cancer, and acute leukemia.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 4 (cont.)

Nucleotide Seq. ID NO.	Library	Library Description
39	BRSTH012	This library was constructed using RNA isolated from diseased breast tissue removed from a 32-year-old Caucasian female during a bilateral reduction mammoplasty. Pathology indicated nonproliferative fibrocystic disease. Family history included benign hypertension and atherosclerotic coronary artery disease.
40	UTRSH003	This normalized library was constructed from 6.4 million independent clones from a uterus library. RNA was isolated from uterine myometrial tissue removed from a 41-year-old Caucasian female during a vaginal hysterectomy with dilation and curettage. Pathology for the associated tumor tissue indicated uterine leiomyoma. Patient history included uterine leiomyoma and a benign ovarian neoplasm. The normalization and hybridization conditions were adapted from Soares et al. [PNAS (1994) 91:2238].
41	PROSTH01	This library was constructed using RNA isolated from prostate tissue removed from a 68-year-old Caucasian male during a radical prostatectomy and regional lymph node excision. Pathology for the associated tumor indicated adenocarcinoma. The patient presented with elevated prostate specific antigen (PSA) and induration. Patient history included pure hypercholesterolemia, kidney calculus, an unspecified allergy, and atopic dermatitis. Family history included colon cancer.
42	SINTH025	This library was constructed using RNA isolated from small intestine tissue removed from a 13-year-old Caucasian male, who died from a gunshot wound to the head. Family history included diabetes.
43	BRSTD101	This library was constructed using RNA isolated from diseased breast tissue indicated intraductal cancer. The patient presented with a malignant neoplasm of the breast and unspecified breast symptoms. Patient history included mitral valve disorder and an unspecified disease of the shoulder region. Family history included malignant neoplasm of the breast and hyperlipidemia, malignant neoplasm of the colon and cardiac dysrhythmias, and malignant neoplasm of the colon.
44	BRBNO102	This library was constructed using RNA isolated from posterior parietal cortex tissue removed from the brain of a 35-year-old Caucasian male.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 4 (cont.)

Nucleotide Seq. ID NO.	Library	Library Description
45	COLADIT04	This library was constructed from diseased transverse colon tissue removed from a 16-year-old Caucasian male during partial colectomy, temporary ileostomy, and colonoscopy. Pathology indicated innumerable (greater than 100) adenomatous polyps with low-grade dysplasia involving the entire colonic mucosa in the setting of familial polyposis coli. The anal mucosa showed 10 adenomatous polyps with low-grade dysplasia in the setting of familial polyposis coli. The patient presented with abdominal pain and flatulence. Family history included benign colon neoplasm in the father; benign colon neoplasm in the sibling(s); and benign hypertension, cerebrovascular disease, breast cancer, uterine cancer, and Type II diabetes in the grandfather(s).

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 5

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; Paces Inc., Pasadena, CA.	Mismatch <5%
ABI ΔMcAAssembler	A program that assembles nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	A Basic Local Alignment Search Tool useful in sequence similarity search for amino acid and nucleic acid sequences. BLAST includes five functions: blastp, blastn, blastx, tblastn, and tblastx.	Altschul, S.F. et al. (1990) <i>J. Mol. Biol.</i> 215:403-410; Altschul, S.F. et al. (1997) <i>Nucleic Acids Res.</i> 25:3389-3402.	ESYs: Probability value= 1.0E-8 or less Full Length sequences: Probability value= 1.0E-10 or less
FASTA	A Pearson and Lipman algorithm that searches for similarity between a query sequence and a group of sequences of the same type. FASTA comprises at least five functions: fasta, fastx, fasty, and search.	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) <i>Methods Enzymol.</i> 183:63-98; and Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) <i>Adv. Appl. Math.</i> 2:482-489.	ESYs: fasta E value= 1.0E-6 Assembled ESYs: fasta identity= 95% or greater and Match length=200 bases or greater; fasta E value= 1.0E-8 or less Full Length sequences: fasta score=100 or greater
BLUMPS	A BLUMPS Improved Scanner that matches a sequence against those in BLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOM, and PFAM databases to search for gene families, sequence homology, and structural fingerprint regions.	Henikoff, S. and J.G. Henikoff (1991) <i>Nucleic Acids Res.</i> 19:6565-6572; Henikoff, J.G. and S. Henikoff (1996) <i>Methods Enzymol.</i> 266:88-105; and Atwood, T.K. et al. (1997) <i>J. Chem. Inf. Comput. Sci.</i> 37:417-424.	Probability value= 1.0E-3 or less
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) <i>J. Mol. Biol.</i> 232:1501-1511; Sonnhammer, E.L.L. et al. (1988) <i>Nucleic Acids Res.</i> 26:320-322; Durbin, R. et al. (1998) <i>Our World View, in a Nushell</i> , Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	PFAM hits: Probability value= 1.0E-3 or less Signal peptide hits: Score= 0 or greater

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Table 5 (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.	Gribkov, M. et al. (1988) CABIOS 4:61-66; Gribkov, M. et al. (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	Normalized quality scores:QCC specified "Hicup" value for that particular Prosite motif. Generally, score=1.4-2.1.
Phred	A base-calling algorithm that examines automated sequencer traces with high sensitivity and probability.	Boeing, B. et al. (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	A Phils Revised Assembly Program including SWAT and CrossMatch programs based on efficient implementation of the Smith-Waterman algorithm, used 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.	Scores 120 or greater; Match length= 56 or greater
Consed	A graphical tool for viewing and editing Phrap assemblies.	Gordon, D. et al. (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	A weight matrix analysis program that scans protein sequences for the presence of secretory signal peptides.	Nikolen, H. et al. (1997) Protein Engineering 10:149; Claverie, J.M. and S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	Score=3.5 or greater
TMAP	A program that uses weight matrices to delineate transmembrane segments on protein sequences and determine orientation.	Persson, B. and P. Agos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. and P. Agos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	A program that uses a hidden Markov model (HMM) to delineate transmembrane segments on protein sequences and determine orientation.	Sonnhammer, E.L. et al. (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow et al., eds., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, pp. 175-182.	
Motifs	A program that searches amino acid sequences for patterns that matched those defined in Prosite.	Bairoch, A. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Quinter Computer Group, Madison, WI.	

WO 01/46256

PCT/US00/34919

What is claimed is:

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
 - 5 a) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23,
 - b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23,
 - c) a biologically active fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23, and
 - 10 d) an immunogenic fragment of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23.
2. An isolated polypeptide of claim 1 selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23.
- 15 3. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 1.
4. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 2.
- 20 5. An isolated polynucleotide of claim 4 selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46.
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.
- 30 9. A method for producing a polypeptide of claim 1, the method comprising:
 - a) culturing a cell under conditions suitable for expression of the polypeptide, wherein said cell is transformed with a recombinant polynucleotide, and said recombinant polynucleotide comprises a promoter sequence operably linked to a polynucleotide encoding the polypeptide of claim 1, and

WO 01/46256

PCT/US00/34919

b) recovering the polypeptide so expressed.

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

5 11. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of:

- a) a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46,
- b) a naturally occurring polynucleotide sequence having at least 70% sequence identity to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24-46,
- 10 c) a polynucleotide sequence complementary to a),
- d) a polynucleotide sequence complementary to b), and
- e) an RNA equivalent of a)-d).

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

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

- a) hybridizing the sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides
- 20 comprising a sequence complementary to said target polynucleotide in the sample, and which probe specifically hybridizes to said target polynucleotide, under conditions whereby a hybridization complex is formed between said probe and said target polynucleotide or fragments thereof, and
- b) detecting the presence or absence of said hybridization complex, and, optionally, if present, the amount thereof.

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

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

- 30 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.

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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

17. A composition of claim 16, wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence
5 selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-23.

18. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional VETRP, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition of claim 16.
10

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

- a) exposing a sample comprising a polypeptide of claim 1 to a compound, and
- b) detecting agonist activity in the sample.

20. A composition comprising an agonist compound identified by a method of claim 19 and a pharmaceutically acceptable excipient.
15

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

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

- 25
- a) exposing a sample comprising a polypeptide of claim 1 to a compound, and
 - b) detecting antagonist activity in the sample.

23. A composition comprising an antagonist compound identified by a method of claim 22 and a pharmaceutically acceptable excipient.
30

24. A method for treating a disease or condition associated with overexpression of functional VETRP, 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 01/46256

PCT/US00/34919

1, said method comprising the steps of:

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

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

- a) combining the polypeptide of claim 1 with at least one test compound under conditions
- 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 for screening a compound for effectiveness in altering expression of a target polynucleotide, wherein said target polynucleotide comprises a sequence of claim 5, the method

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 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
- 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;
- c) quantifying the amount of hybridization complex; and

WO 01/46256

PCT/US00/34919

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 01/46256

PCT/US00/34919

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
 TANG, Y. Tom
 YUR, Henry
 SANDMAN, Olga
 HILLMAN, Jennifer
 BAUGHN, Mariah R.
 LU, Dying Anna M.
 AZIMZAI, Valga

<120> VESICLE TRAFFICKING PROTEINS

<130> PF-0756 PCT

<140> To Be Assigned

<141> Merewith

<150> 60/172,968; 60/172,066

<151> 1999-12-21; 1999-12-23

<160> 45

<170> PERL Program

<210> 1

<211> 481

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 381039CD1

<400> 1

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

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

260      265      270
Ser Ser Val Phe Gly Ser Leu Pro Pro Ala Gly Gln Ala Ser Phe
275      280      285
Gln Ala Gln Pro Thr Pro Ala Gly Ser Ser Gln Gly Thr Pro Phe
290      295      300
Gly Ala Thr Pro Leu Ala Pro Ala Ser Gln Pro Asn Ser Leu Ala
305      310      315
Asp Val Gly Ser Phe Leu Gly Pro Gly Val Pro Ala Ala Gly Val
320      325      330
Pro Ser Ser Leu Phe Gly Met Ala Gly Gln Val Pro Pro Leu Gln
335      340      345
Ser Val Thr Met Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser Thr Gly Leu Ala
350      355      360
Phe Gly Ala Phe Thr Asn Pro Phe Thr Ala Pro Ala Ala Gln Ser
365      370      375
Pro Leu Pro Ser Thr Asn Pro Phe Gln Pro Asn Gly Leu Ala Pro
380      385      390
Gly Pro Gly Phe Gly Met Ser Ser Ala Gly Pro Gly Phe Pro Gln
395      400      405
Ala Val Pro Pro Thr Gly Ala Phe Ala Ser Ser Phe Pro Ala Pro
410      415      420
Leu Phe Pro Pro Gln Thr Pro Leu Val Gln Gln Gln Asn Gly Ser
425      430      435
Ser Phe Gly Asp Leu Gly Ser Ala Lys Leu Gly Gln Arg Pro Leu
440      445      450
Ser Gln Pro Ala Gly Ile Ser Thr Asn Pro Phe Met Thr Gly Pro
455      460      465
Ser Ser Ser Pro Phe Ala Ser Lys Pro Pro Thr Thr Asn Pro Phe
470      475      480
Leu

```

```

<210> 2
<211> 195
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 383249CD1

```

```

<400> 2
Met Ser Ser Cys Ser Asn Val Cys Gly Ser Arg Gln Ala Gln Ala
1      5      10      15
Ala Ala Glu Gly Gly Tyr Gln Arg Tyr Gly Val Arg Ser Tyr Leu
20      25      30
His Gln Phe Tyr Glu Asp Cys Thr Ala Ser Ile Trp Glu Tyr Glu
35      40      45
Asp Asp Phe Gln Phe Gln Arg Ser Pro Asn Arg Trp Ser Ser Val
50      55      60
Phe Trp Lys Val Gly Leu Ile Ser Gly Thr Val Phe Val Ile Leu
65      70      75
Gly Leu Thr Val Leu Ala Val Gly Phe Leu Val Pro Pro Lys Ile
80      85      90
Glu Ala Phe Gly Glu Ala Asp Phe Val Val Val Asp Thr His Ala
95      100      105
Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Asp Met Tyr Lys Leu Ala Gly Ala
110      115      120
Val Leu Phe Cys Ile Gly Gly Thr Ser Met Ala Gly Cys Leu Leu
125      130      135
Met Ser Val Phe Val Lys Ser Tyr Ser Lys Glu Glu Lys Phe Leu
140      145      150
Gln Gln Lys Phe Lys Glu Arg Ile Ala Asp Ile Lys Ala His Thr
155      160      165
Gln Pro Val Thr Lys Ala Pro Gly Pro Gly Glu Thr Lys Ile Pro
170      175      180
Val Thr Leu Ser Arg Val Gln Asn Val Gln Pro Leu Leu Ala Thr

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

185

190

195

<210> 3
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Inocyte ID No: 618769CD1

<400> 3
 Met Gly Asn Phe Asp Asn Ala Asn Val Thr Gly Glu Ile Glu Phe
 1 5 10 15
 Ala Ile His Tyr Cys Phe Lys Thr His Ser Leu Glu Ile Cys Ile
 20 25 30
 Lys Ala Cys Lys Asn Leu Ala Tyr Gly Glu Glu Lys Lys Lys Lys
 35 40 45
 Cys Asn Pro Tyr Val Lys Thr Tyr Leu Leu Pro Asp Arg Ser Ser
 50 55 60
 Gln Gly Lys Arg Lys Thr Gly Val Gln Arg Asn Thr Val Asp Pro
 65 70 75
 Thr Phe Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Gln Val Ala Pro Ala Gln Leu
 80 85 90
 Val Thr Arg Gln Leu Gln Val Ser Val Trp His Leu Gly Thr Leu
 95 100 105
 Ala Arg Arg Val Phe Leu Gly Glu Val Ile Ile Pro Leu Ala Thr
 110 115 120
 Trp Asp Phe Glu Asp Ser Thr Thr Gln Ser Phe Arg Trp His Pro
 125 130 135
 Leu Arg Ala Lys Ala Glu Lys Tyr Glu Asp Ser Val Pro Gln Ser
 140 145 150
 Asn Gly Glu Leu Thr Val Arg Ala Lys Leu Val Leu Pro Ser Arg
 155 160 165
 Pro Arg Lys Leu Gln Glu Ala Gln Glu Gly Thr Asp Gln Pro Ser
 170 175 180
 Leu His Gly Gln Leu Cys Leu Val Val Leu Gly Ala Lys Asn Leu
 185 190 195
 Pro Val Arg Pro Asp Gly Thr Leu Asn Ser Phe Val Lys Gly Cys
 200 205 210
 Leu Thr Leu Pro Asp Gln Gln Lys Leu Arg Leu Lys Ser Pro Val
 215 220 225
 Leu Arg Lys Gln Ala Cys Pro Gln Trp Lys His Ser Phe Val Phe
 230 235 240
 Ser Gly Val Thr Pro Ala Gln Leu Arg Gln Ser Ser Leu Glu Leu
 245 250 255
 Thr Val Trp Asp Gln Ala Leu Phe Gly Met Asn Asp Arg Leu Leu
 260 265 270
 Gly Gly Thr Arg Leu Gly Ser Lys Gly Asp Thr Ala Val Gly Gly
 275 280 285
 Asp Ala Cys Ser Leu Ser Lys Leu Gln Trp Gln Lys Val Leu Ser
 290 295 300
 Ser Pro Asn Leu Trp Thr Asp Met Thr Leu Val Leu His
 305 310

<210> 4
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Inocyte ID No: 1234837CD1

<400> 4
 Met Gly Asn Leu Phe Gly Arg Lys Lys Gln Ser Arg Val Thr Glu

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

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

```

```

<210> 5
<211> 566
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Inocyte ID No: 1607223CD1

```

```

<400> 5
Met Lys Ser Cys Gly Lys Arg Phe His Asp Glu Val Gly Lys Phe
1           5           10           15
Arg Phe Leu Asn Glu Leu Ile Lys Val Val Ser Pro Lys Tyr Leu
20          25          30
Gly Ser Arg Thr Ser Glu Lys Val Lys Asn Lys Ile Leu Glu Leu
35          40          45
Leu Tyr Ser Trp Thr Val Gly Leu Pro Glu Glu Val Lys Ile Ala
50          55          60
Glu Ala Tyr Gln Met Leu Lys Lys Gln Gly Ile Val Lys Ser Asp
65          70          75
Pro Lys Leu Pro Asp Asp Thr Thr Phe Pro Leu Pro Pro Pro Arg
80          85          90
Pro Lys Asn Val Ile Phe Glu Asp Glu Glu Lys Ser Lys Met Leu
95          100         105
Ala Arg Leu Leu Lys Ser Ser His Pro Glu Asp Leu Arg Ala Ala
110         115         120
Asn Lys Leu Ile Lys Glu Met Val Gln Glu Asp Gln Lys Arg Met
125         130         135
Glu Lys Ile Ser Lys Arg Val Asn Ala Ile Glu Glu Val Asn Asn
140         145         150
Asn Val Lys Leu Leu Thr Glu Met Val Met Ser His Ser Gln Gly
155         160         165
Gly Ala Ala Ala Gly Ser Ser Glu Asp Leu Met Lys Glu Leu Tyr
170         175         180
Gln Arg Cys Glu Arg Met Arg Pro Thr Leu Phe Arg Leu Ala Ser
185         190         195
Asp Thr Glu Asp Asn Asp Glu Ala Leu Ala Glu Ile Leu Gln Ala
200         205         210
Asn Asp Asn Leu Thr Gln Val Ile Asn Leu Tyr Lys Gln Leu Val

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

215      220      225
Arg Gly Glu Glu Val Asn Gly Asp Ala Thr Ala Gly Ser Ile Pro
230      235      240
Gly Ser Thr Ser Ala Leu Leu Asp Leu Ser Gly Leu Asp Leu Pro
245      250      255
Pro Ala Gly Thr Thr Tyr Pro Ala Met Pro Thr Arg Pro Gly Glu
260      265      270
Gln Ala Ser Pro Glu Gln Pro Ser Ala Ser Val Ser Leu Leu Asp
275      280      285
Asp Glu Leu Met Ser Leu Gly Leu Ser Asp Pro Thr Pro Pro Ser
290      295      300
Gly Pro Ser Leu Asp Gly Thr Gly Trp Asn Ser Phe Gln Ser Ser
305      310      315
Asp Ala Thr Glu Pro Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gln Ala Pro Ser
320      325      330
Met Glu Ser Arg Pro Pro Ala Gln Thr Ser Leu Pro Ala Ser Ser
335      340      345
Gly Leu Asp Asp Asp Leu Leu Gly Lys Thr Leu Leu Gln Gln
350      355      360
Ser Leu Pro Pro Glu Ser Gln Gln Val Arg Trp Glu Lys Gln Gln
365      370      375
Pro Thr Pro Arg Leu Thr Leu Arg Asp Leu Gln Asn Lys Ser Ser
380      385      390
Ser Cys Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ala Thr Ser Leu Leu His Thr
395      400      405
Val Ser Pro Glu Pro Pro Arg Pro Pro Gln Gln Pro Val Pro Thr
410      415      420
Glu Leu Ser Leu Ala Ser Ile Thr Val Pro Leu Glu Ser Ile Lys
425      430      435
Pro Ser Asn Ile Leu Pro Val Thr Val Tyr Asp Gln His Gly Phe
440      445      450
Arg Ile Leu Phe His Phe Ala Arg Asp Pro Leu Pro Gly Arg Ser
455      460      465
Asp Val Leu Val Val Val Val Ser Met Leu Ser Thr Ala Pro Gln
470      475      480
Pro Ile Arg Asn Ile Val Phe Gln Ser Ala Val Pro Lys Val Met
485      490      495
Lys Val Lys Leu Gln Pro Pro Ser Gly Thr Glu Leu Pro Ala Phe
500      505      510
Asn Pro Ile Val His Pro Ser Ala Ile Thr Gln Val Leu Leu Leu
515      520      525
Ala Asn Pro Gln Lys Glu Lys Val Arg Leu Arg Tyr Lys Leu Thr
530      535      540
Phe Thr Met Gly Asp Gln Thr Tyr Asn Glu Met Gly Asp Val Asp
545      550      555
Gln Phe Pro Pro Pro Glu Thr Trp Gly Ser Leu
560      565

```

<210> 6

<211> 270

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Inocyte ID No: 1621554CD1

<400> 6

```

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

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

      45              70              75
Leu Val Pro Val Pro Glu Leu Pro Gly Lys Ser Thr Phe Phe Gly
      80              85              90
Thr Ser Asp Glu Phe Ile Glu Lys Arg Arg Gln Gly Leu Gln His
      95              100             105
Phe Leu Glu Lys Val Leu Gln Ser Val Val Leu Leu Ser Asp Ser
      110             115             120
Gln Leu His Leu Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ser Val Pro Glu Ile
      125             130             135
Glu Ala Cys Val Gln Gly Arg Ser Thr Met Thr Val Ser Asp Ala
      140             145             150
Ile Leu Arg Tyr Ala Met Ser Asn Cys Gly Trp Ala Gln Glu Glu
      155             160             165
Arg Gln Ser Ser Ser His Leu Ala Lys Gly Asp Gln Pro Lys Ser
      170             175             180
Cys Cys Phe Leu Pro Arg Ser Gly Arg Arg Ser Ser Pro Ser Pro
      185             190             195
Pro Pro Ser Glu Glu Lys Asp His Leu Glu Val Trp Ala Pro Val
      200             205             210
Val Asp Ser Glu Val Pro Ser Leu Glu Ser Pro Thr Leu Pro Pro
      215             220             225
Leu Ser Ser Pro Leu Cys Cys Asp Phe Gly Arg Pro Lys Glu Gly
      230             235             240
Thr Ser Thr Leu Gln Ser Val Arg Arg Ala Val Gly Gly Asp His
      245             250             255
Ala Val Pro Leu Asp Pro Gly Gln Leu Thr Thr Val Leu Glu Lys
      260             265             270

```

<210> 7
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1751553CD1

```

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

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

Ser Leu Asp Thr Ile Thr Leu Ser Gly Asp Glu Arg Asp Phe Gly
215 220 225
Arg Leu Asn Val Lys Leu Phe Tyr Asn Ser Ser Val Glu Gln Ile
230 235 240
Trp Ile Thr Val Leu Gln Cys Arg Asp Leu Ser Trp Pro Ser Ser
245 250 255
Tyr Gly Asp Thr Pro Thr Val Ser Ile Lys Gly Ile Leu Thr Leu
260 265 270
Pro Lys Pro Val His Phe Lys Ser Ser Ala Lys Glu Gly Ser Asn
275 280 285
Ala Ile Glu Phe Met Glu Thr Phe Val Phe Ala Ile Lys Leu Gln
290 295 300
Asn Leu Gln Thr Val Arg Leu Val Phe Lys Ile Gln Thr Gln Thr
305 310 315
Pro Arg Lys Lys Thr Ile Gly Glu Cys Ser Met Ser Leu Arg Thr
320 325 330
Leu Ser Thr Gln Glu Met Asp Tyr Ser Leu Asp Ile Thr Pro Pro
335 340 345
Ser Lys Ile Ser Val Cys His Ala Glu Leu Glu Leu Gly Thr Cys
350 355 360
Phe Gln Ala Val Asn Ser Arg Ile Gln Leu Gln Ile Leu Glu Ala
365 370 375
Arg Tyr Leu Pro Ser Ser Ser Thr Pro Leu Thr Leu Ser Phe Phe
380 385 390
Val Lys Val Gly Met Phe Ser Ser Gly Glu Leu Ile Tyr Lys Lys
395 400 405
Lys Thr Arg Leu Leu Lys Ala Ser Asn Gly Arg Val Lys Trp Gly
410 415 420
Glu Thr Met Ile Phe Pro Leu Ile Gln Ser Glu Lys Glu Ile Val
425 430 435
Phe Leu Ile Lys Leu Tyr Ser Arg Ser Ser Val Arg Arg Lys His
440 445 450
Phe Val Gly Gln Ile Trp Ile Ser Glu Asp Ser Asn Asn Ile Glu
455 460 465
Ala Val Asn Gln Trp Lys Glu Thr Val Ile Asn Pro Glu Lys Val
470 475 480
Val Ile Arg Trp His Lys Leu Asn Pro Ser
485 490

```

<210> 8

<211> 136

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Inocyte ID No: 1832403CD1

<400> 8

```

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

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Lys

<210> 9
 <211> 1104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <233> Incyte ID No: 1971747CD1

<400> 9
 Met Glu Arg Ser Pro Gly Glu Gly Pro Ser Pro Ser Pro Met Asp
 1 5 10 15
 Gln Pro Ser Ala Pro Ser Asp Pro Thr Asp Gln Pro Pro Ala Ala
 20 25 30
 His Ala Lys Pro Asp Pro Gly Ser Gly Gly Gln Pro Ala Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Ala Gly Glu Ala Leu Ala Val Leu Thr Ser Phe Gly Arg
 50 55 60
 Arg Leu Leu Val Leu Ile Pro Val Tyr Leu Ala Gly Ala Val Gly
 65 70 75
 Leu Ser Val Gly Phe Val Leu Phe Gly Leu Ala Leu Tyr Leu Gly
 80 85 90
 Trp Arg Arg Val Arg Asp Glu Lys Glu Arg Ser Leu Arg Ala Ala
 95 100 105
 Arg Gln Leu Leu Asp Asp Glu Glu Gln Leu Thr Ala Lys Thr Leu
 110 115 120
 Tyr Met Ser His Arg Glu Leu Pro Ala Trp Val Ser Phe Pro Asp
 125 130 135
 Val Glu Lys Ala Glu Trp Leu Asn Lys Ile Val Ala Gln Val Trp
 140 145 150
 Pro Phe Leu Gly Gln Tyr Met Glu Lys Leu Leu Ala Glu Thr Val
 155 160 165
 Ala Pro Ala Val Arg Gly Ser Asn Pro His Leu Gln Thr Phe Thr
 170 175 180
 Phe Thr Arg Val Glu Leu Gly Glu Lys Pro Leu Arg Ile Ile Gly
 185 190 195
 Val Lys Val His Pro Gly Gln Arg Lys Glu Gln Ile Leu Leu Asp
 200 205 210
 Leu Asn Ile Ser Tyr Val Gly Asp Val Gln Ile Asp Val Glu Val
 215 220 225
 Lys Lys Tyr Phe Cys Lys Ala Gly Val Lys Gly Met Gln Leu His
 230 235 240
 Gly Val Leu Arg Val Ile Leu Glu Pro Leu Ile Gly Asp Leu Pro
 245 250 255
 Phe Val Gly Ala Val Ser Met Phe Phe Ile Arg Arg Pro Thr Leu
 260 265 270
 Asp Ile Asn Trp Thr Gly Met Thr Asn Leu Leu Asp Ile Pro Gly
 275 280 285
 Leu Ser Ser Leu Ser Asp Thr Met Ile Met Asp Ser Ile Ala Ala
 290 295 300
 Phe Leu Val Leu Pro Asn Arg Leu Leu Val Pro Leu Val Pro Asp
 305 310 315
 Leu Gln Asp Val Ala Gln Leu Arg Ser Pro Leu Pro Arg Gly Ile
 320 325 330
 Ile Arg Ile His Leu Leu Ala Ala Arg Gly Leu Ser Ser Lys Asp
 335 340 345
 Lys Tyr Val Lys Gly Leu Ile Glu Gly Lys Ser Asp Pro Tyr Ala
 350 355 360
 Leu Val Arg Leu Gly Thr Gln Thr Phe Cys Ser Arg Val Ile Asp
 365 370 375
 Glu Glu Leu Asn Pro Gln Trp Gly Glu Thr Tyr Glu Val Met Val
 380 385 390
 His Glu Val Pro Gly Gln Glu Ile Glu Val Glu Val Phe Asp Lys
 395 400 405

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Asp Pro Asp Lys Asp Asp Phe Leu Gly Arg Met Lys Leu Asp Val
 410 415 420
 Gly Lys Val Leu Gln Ala Ser Val Leu Asp Asp Trp Phe Pro Leu
 425 430 435
 Gln Gly Gly Gln Gly Gln Val His Leu Arg Leu Glu Trp Leu Ser
 440 445 450
 Leu Leu Ser Asp Ala Glu Lys Leu Glu Gln Val Leu Gln Trp Asn
 455 460 465
 Trp Gly Val Ser Ser Arg Pro Asp Pro Ser Ala Ala Ile Leu
 470 475 480
 Val Val Tyr Leu Asp Arg Ala Gln Asp Leu Pro Leu Lys Lys Gly
 485 490 495
 Asn Lys Glu Pro Asn Pro Met Val Gln Leu Ser Ile Gln Asp Val
 500 505 510
 Thr Gln Glu Ser Lys Ala Val Tyr Ser Thr Asn Cys Pro Val Trp
 515 520 525
 Glu Glu Ala Phe Arg Phe Phe Leu Gln Asp Pro Gln Ser Gln Glu
 530 535 540
 Leu Asp Val Gln Val Lys Asp Asp Ser Arg Ala Leu Thr Leu Gly
 545 550 555
 Ala Leu Thr Leu Pro Leu Ala Arg Leu Leu Thr Ala Pro Glu Leu
 560 565 570
 Ile Leu Asp Gln Trp Phe Gln Leu Ser Ser Ser Gly Pro Asn Ser
 575 580 585
 Arg Leu Tyr Met Lys Leu Val Met Arg Ile Leu Tyr Leu Asp Ser
 590 595 600
 Ser Glu Ile Cys Phe Pro Thr Val Pro Gly Cys Pro Gly Ala Trp
 605 610 615
 Asp Val Asp Ser Glu Asn Pro Gln Arg Gly Ser Ser Val Asp Ala
 620 625 630
 Pro Pro Arg Pro Cys His Thr Thr Pro Asp Ser Gln Phe Gly Thr
 635 640 645
 Glu His Val Leu Arg Ile His Val Leu Glu Ala Gln Asp Leu Ile
 650 655 660
 Ala Lys Asp Arg Phe Leu Gly Gly Leu Val Lys Gly Lys Ser Asp
 665 670 675
 Pro Tyr Val Lys Leu Lys Leu Ala Gly Arg Ser Phe Arg Ser His
 680 685 690
 Val Val Arg Glu Asp Leu Asn Pro Arg Trp Asn Glu Val Phe Glu
 695 700 705
 Val Ile Val Thr Ser Val Pro Gly Gln Glu Leu Glu Val Glu Val
 710 715 720
 Phe Asp Lys Asp Leu Asp Lys Asp Asp Phe Leu Gly Arg Cys Lys
 725 730 735
 Val Arg Leu Thr Thr Val Leu Asn Ser Gly Phe Leu Asp Glu Trp
 740 745 750
 Leu Thr Leu Glu Asp Val Pro Ser Gly Arg Leu His Leu Arg Leu
 755 760 765
 Glu Arg Leu Thr Pro Arg Pro Thr Ala Ala Glu Leu Glu Glu Val
 770 775 780
 Leu Gln Val Asn Ser Leu Ile Gln Thr Gln Lys Ser Ala Glu Leu
 785 790 795
 Ala Ala Ala Leu Leu Ser Ile Tyr Met Glu Arg Ala Glu Asp Leu
 800 805 810
 Pro Leu Arg Lys Gly Thr Lys His Leu Ser Pro Tyr Ala Thr Leu
 815 820 825
 Thr Val Gly Asp Ser Ser His Lys Thr Lys Thr Ile Ser Gln Thr
 830 835 840
 Ser Ala Pro Val Trp Asp Glu Ser Ala Ser Phe Leu Ile Arg Lys
 845 850 855
 Pro His Thr Glu Ser Leu Glu Leu Gln Val Arg Gly Glu Gly Thr
 860 865 870
 Gly Val Leu Gly Ser Leu Ser Leu Pro Leu Ser Glu Leu Leu Val
 875 880 885
 Ala Asp Gln Leu Cys Leu Asp Arg Trp Phe Thr Leu Ser Ser Gly
 890 895 900
 Gln Gly Gln Val Leu Leu Arg Ala Gln Leu Gly Ile Leu Val Ser

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

905          910          915
Gln His Ser Gly Val Glu Ala His Ser His Ser Tyr Ser His Ser
920          925          930
Ser Ser Ser Leu Ser Glu Glu Pro Glu Leu Ser Gly Gly Pro Pro
935          940          945
His Ile Thr Ser Ser Ala Pro Glu Leu Arg Gln Arg Leu Thr His
950          955          960
Val Asp Ser Pro Leu Glu Ala Pro Ala Gly Pro Leu Gly Gln Val
965          970          975
Lys Leu Thr Leu Trp Tyr Tyr Ser Glu Gln Arg Lys Leu Val Ser
980          985          990
Ile Val His Gly Cys Arg Ser Leu Arg Gln Asn Gly Arg Asp Pro
995          1000          1005
Pro Asp Pro Tyr Val Ser Leu Leu Leu Leu Pro Asp Lys Asn Arg
1010          1015          1020
Gly Thr Lys Arg Arg Thr Ser Gln Lys Lys Arg Thr Leu Ser Pro
1025          1030          1035
Glu Phe Asn Glu Arg Phe Glu Trp Glu Leu Pro Leu Asp Glu Ala
1040          1045          1050
Gln Arg Arg Lys Leu Asp Val Ser Val Lys Ser Asn Ser Ser Phe
1055          1060          1065
Met Ser Arg Glu Arg Glu Leu Leu Gly Lys Val Gln Leu Asp Leu
1070          1075          1080
Ala Glu Thr Asp Leu Ser Gln Gly Val Ala Arg Trp Tyr Asp Leu
1085          1090          1095
Met Asp Asn Lys Asp Lys Gly Ser Ser
1100

<210> 10
<211> 411
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2285348CD1

<400> 10
Met Ala Asn Tyr Glu Ser Thr Glu Val Met Gly Asp Gly Glu Ser
1          5          10          15
Ala His Asp Ser Pro Arg Asp Glu Ala Leu Gln Asn Ile Ser Ala
20          25          30
Asp Asp Leu Pro Asp Ser Ala Ser Gln Ala Ala His Pro Gln Asp
35          40          45
Ser Ala Phe Ser Tyr Arg Asp Ala Lys Lys Lys Leu Arg Leu Ala
50          55          60
Leu Cys Ser Ala Asp Ser Val Ala Phe Pro Val Leu Thr His Ser
65          70          75
Thr Arg Asn Gly Leu Pro Asp His Thr Asp Pro Glu Asp Asn Glu
80          85          90
Ile Val Cys Phe Leu Lys Val Gln Ile Ala Glu Ala Ile Asn Leu
95          100          105
Gln Asp Lys Asn Leu Met Ala Gln Leu Gln Glu Thr Met Arg Cys
110          115          120
Val Cys Arg Phe Asp Asn Arg Thr Cys Arg Lys Leu Leu Ala Ser
125          130          135
Ile Ala Glu Asp Tyr Arg Lys Arg Ala Pro Tyr Ile Ala Tyr Leu
140          145          150
Thr Arg Cys Arg Gln Gly Leu Gln Thr Thr Gln Ala His Leu Glu
155          160          165
Arg Leu Leu Gln Arg Val Leu Arg Asp Lys Glu Val Ala Asn Arg
170          175          180
Tyr Phe Thr Thr Val Cys Val Arg Leu Leu Leu Glu Ser Lys Glu
185          190          195
Lys Lys Ile Arg Glu Phe Ile Gln Asp Phe Gln Lys Leu Thr Ala
200          205          210
Ala Asp Asp Lys Thr Ala Gln Val Glu Asp Phe Leu Gln Phe Leu

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

215      Tyr Gly Ala Met Ala Gln Asp Val Ile Trp Gln Asn Ala Ser Glu
230      Glu Gln Leu Gln Asp Ala Gln Leu Ala Ile Glu Arg Ser Val Met
245      Asn Arg Ile Phe Lys Leu Ala Phe Tyr Pro Asn Gln Asp Gly Asp
260      Ile Leu Arg Asp Gln Val Leu His Glu His Ile Gln Arg Leu Ser
275      Lys Val Val Thr Ala Asn His Arg Ala Leu Gln Ile Pro Glu Val
290      Tyr Leu Arg Glu Ala Pro Trp Pro Ser Ala Gln Ser Glu Ile Arg
305      Thr Ile Ser Ala Tyr Lys Thr Pro Arg Asp Lys Val Gln Cys Ile
320      Leu Arg Met Cys Ser Thr Ile Met Asn Leu Leu Ser Leu Ala Asn
335      Glu Asp Ser Val Pro Gly Ala Asp Asp Phe Val Pro Val Leu Val
350      Phe Val Leu Ile Lys Ala Asn Pro Pro Cys Leu Leu Ser Thr Val
365      Gln Tyr Ile Ser Ser Phe Tyr Ala Ser Cys Leu Ser Gly Glu Glu
380      Ser Tyr Trp Trp Met Gln Phe Thr Ala Ala Val Glu Phe Ile Lys
395      Thr Ile Asp Asp Arg Lys
410

```

```

<210> 11
<211> 201
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2374186CD1

```

```

<400> 11
Met Phe Pro Glu Gln Gln Lys Glu Glu Phe Val Ser Val Trp Val
1      5      10      15
Arg Asp Pro Arg Ile Gln Lys Glu Asp Phe Trp His Ser Tyr Ile
20     25     30
Asp Tyr Glu Ile Cys Ile His Thr Asn Ser Met Cys Phe Thr Met
35     40     45
Lys Thr Ser Cys Val Arg Arg Arg Tyr Arg Glu Phe Val Trp Leu
50     55     60
Arg Gln Arg Leu Gln Ser Asn Ala Leu Leu Val Gln Leu Pro Glu
65     70     75
Leu Pro Ser Lys Asn Leu Phe Phe Asn Met Asn Asn Arg Gln His
80     85     90
Val Asp Gln Arg Arg Gln Gly Leu Glu Asp Phe Leu Arg Lys Val
95     100    105
Leu Gln Asn Ala Leu Leu Leu Ser Asp Ser Ser Leu His Leu Phe
110    115    120
Leu Gln Ser His Leu Asn Ser Glu Asp Ile Glu Ala Cys Val Ser
125    130    135
Gly Gln Thr Lys Tyr Ser Val Glu Glu Ala Ile His Lys Phe Ala
140    145    150
Leu Met Asn Arg Arg Phe Pro Glu Glu Asp Glu Glu Gly Lys Lys
155    160    165
Glu Asn Asp Ile Asp Tyr Asp Ser Glu Ser Ser Ser Ser Gly Leu
170    175    180
Gly His Ser Ser Asp Asp Ser Ser Ser His Gly Cys Lys Val Asn
185    190    195
Thr Ala Pro Gln Glu Ser
200

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

<210> 12
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2476232CD1

<400> 12
 Met Ala Phe Gly Lys Ser His Arg Asp Pro Tyr Ala Thr Ser Val
 1 5 10 15
 Gly His Leu Ile Glu Lys Ala Thr Phe Ala Gly Val Gln Thr Glu
 20 25 30
 Asp Trp Gly Gln Phe Met His Ile Cys Asp Ile Ile Asn Thr Thr
 35 40 45
 Gln Asp Gly Pro Lys Asp Ala Val Lys Ala Leu Lys Lys Arg Ile
 50 55 60
 Ser Lys Asn Tyr Asn His Lys Glu Ile Gln Leu Thr Leu Ser Leu
 65 70 75
 Ile Asp Met Cys Val Gln Asn Cys Gly Pro Ser Phe Gln Ser Leu
 80 85 90
 Ile Val Lys Lys Glu Phe Val Lys Glu Asn Leu Val Lys Leu Leu
 95 100 105
 Asn Pro Arg Tyr Asn Leu Pro Leu Asp Ile Gln Asn Arg Ile Leu
 110 115 120
 Asn Phe Ile Lys Thr Trp Ser Gln Gly Phe Pro Gly Gly Val Asp
 125 130 135
 Val Ser Glu Val Lys Glu Val Tyr Leu Asp Leu Val Lys Lys Gly
 140 145 150
 Val Gln Phe Pro Pro Ser Glu Ala Glu Ala Glu Thr Ala Arg Gln
 155 160 165
 Glu Thr Ala Gln Ile Ser Ser Asn Pro Pro Thr Ser Val Pro Thr
 170 175 180
 Ala Pro Ala Leu Ser Ser Val Ile Ala Pro Lys Asn Ser Thr Val
 185 190 195
 Thr Leu Val Pro Glu Gln Ile Gly Lys Leu His Ser Glu Leu Asp
 200 205 210
 Met Val Lys Met Asn Val Arg Val Met Ser Ala Ile Leu Met Glu
 215 220 225
 Asn Thr Pro Gly Ser Glu Asn His Glu Asp Ile Glu Leu Leu Gln
 230 235 240
 Lys Leu Tyr Lys Thr Gly Arg Glu Met Gln Glu Arg Ile Met Asp
 245 250 255
 Leu Leu Val Val Val Glu Asn Glu Asp Val Thr Val Glu Leu Ile
 260 265 270
 Gln Val Asn Glu Asp Leu Asn Asn Ala Ile Leu Gly Tyr Glu Arg
 275 280 285
 Phe Thr Arg Asn Gln Gln Arg Ile Leu Glu Gln Asn Lys Asn Gln
 290 295 300
 Lys Glu Ala Thr Asn Thr Thr Ser Glu Pro Ser Ala Pro Ser Gln
 305 310 315
 Asp Leu Leu Asp Leu Ser Pro Ser Pro Arg Met Pro Arg Ala Thr
 320 325 330
 Leu Gly Glu Leu Asn Thr Met Asn Asn Gln Leu Ser Gly Leu Asn
 335 340 345
 Phe Ser Leu Pro Ser Ser Asp Val Thr Asn Asn Leu Lys Pro Ser
 350 355 360
 Leu His Pro Gln Met Asn Leu Leu Ala Leu Glu Asn Thr Glu Ile
 365 370 375
 Pro Pro Phe Ala Gln Arg Thr Ser Gln Asn Leu Thr Ser Ser His
 380 385 390
 Ala Tyr Asp Asn Phe Leu Glu His Ser Asn Ser Val Phe Leu Gln
 395 400 405
 Pro Val Ser Leu Gln Thr Ile Ala Ala Ala Pro Ser Asn Gln Ser
 410 415 420
 Leu Pro Pro Leu Pro Ser Asn His Pro Ala Met Thr Lys Ser Asp

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

425      430      435
Leu Gln Pro Pro Asn Tyr Tyr Glu Val Met Glu Phe Asp Pro Leu
440      445      450
Ala Pro Ala Val Thr Thr Glu Ala Ile Tyr Glu Glu Ile Asp Ala
455      460      465
His Gln His Lys Gly Ala Gln Asn Asp Gly Asp
470      475

```

<210> 13

<211> 1220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Inocyte ID No: 2503986CD1

<400> 13

```

Met Lys Leu Lys Glu Val Asp Arg Thr Ala Met Gln Ala Trp Ser
1      5      10      15
Pro Ala Gln Asn His Pro Ile Tyr Leu Ala Thr Gly Thr Ser Ala
20      25      30
Gln Gln Leu Asp Ala Thr Phe Ser Thr Asn Ala Ser Leu Glu Ile
35      40      45
Phe Glu Leu Asp Leu Ser Asp Pro Ser Leu Asp Met Lys Ser Cys
50      55      60
Ala Thr Phe Ser Ser Ser His Arg Tyr His Lys Leu Ile Trp Gly
65      70      75
Pro Tyr Lys Met Asp Ser Lys Gly Asp Val Ser Gly Val Leu Ile
80      85      90
Ala Gly Gly Glu Asn Gly Asn Ile Ile Leu Tyr Asp Pro Ser Lys
95      100      105
Ile Ile Ala Gly Asp Lys Glu Val Val Ile Ala Gln Asn Asp Lys
110      115      120
His Thr Gly Pro Val Arg Ala Leu Asp Val Asn Ile Phe Gln Thr
125      130      135
Asn Leu Val Ala Ser Gly Ala Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Ile Trp
140      145      150
Asp Leu Asn Asn Phe Ala Thr Pro Met Thr Pro Gly Ala Lys Thr
155      160      165
Gln Pro Pro Glu Asp Ile Ser Cys Ile Ala Trp Asn Arg Gln Val
170      175      180
Gln His Ile Leu Ala Ser Ala Ser Pro Ser Gly Arg Ala Thr Val
185      190      195
Trp Asp Leu Arg Lys Asn Glu Pro Ile Ile Lys Val Ser Asp His
200      205      210
Ser Asn Arg Met His Cys Ser Gly Leu Ala Trp His Pro Asp Val
215      220      225
Ala Thr Gln Met Val Leu Ala Ser Glu Asp Asp Arg Leu Pro Val
230      235      240
Ile Gln Met Trp Asp Leu Arg Phe Ala Ser Ser Pro Leu Arg Val
245      250      255
Leu Glu Asn His Ala Arg Gly Ile Leu Ala Ile Ala Trp Ser Met
260      265      270
Ala Asp Pro Glu Leu Leu Leu Ser Cys Gly Lys Asp Ala Lys Ile
275      280      285
Leu Cys Ser Asn Pro Asn Thr Gly Glu Val Leu Tyr Glu Leu Pro
290      295      300
Thr Asn Thr Gln Trp Cys Phe Asp Ile Gln Trp Cys Pro Arg Asn
305      310      315
Pro Ala Val Leu Ser Ala Ala Ser Phe Asp Gly Arg Ile Ser Val
320      325      330
Tyr Ser Ile Met Gly Gly Ser Thr Asp Gly Leu Arg Gln Lys Gln
335      340      345
Val Asp Lys Leu Ser Ser Ser Phe Gly Asn Leu Asp Pro Phe Gly
350      355      360
Thr Gly Gln Pro Leu Pro Pro Leu Gln Ile Pro Gln Gln Thr Ala

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

365      370      375
Gln His Ser Ile Val Leu Pro Leu Lys Lys Pro Pro Lys Trp Ile
380
Arg Arg Pro Val Gly Ala Ser Phe Ser Phe Gly Gly Lys Leu Val
395
Thr Phe Glu Asn Val Arg Met Pro Ser His Gln Gly Ala Glu Gln
410
Gln Gln Gln Gln His His Val Phe Ile Ser Gln Val Val Thr Glu
425
Lys Glu Phe Leu Ser Arg Ser Asp Gln Leu Gln Gln Ala Val Gln
440
Ser Gln Gly Phe Ile Asn Tyr Cys Gln Lys Lys Ile Asp Ala Ser
455
Gln Thr Glu Phe Glu Lys Asn Val Trp Ser Phe Leu Lys Val Asn
470
Phe Glu Asp Asp Ser Arg Gly Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Gly Tyr
485
Arg Lys Glu Asp Leu Gly Lys Lys Ile Ala Leu Ala Leu Asn Lys
500
Val Asp Gly Ala Asn Val Ala Leu Lys Asp Ser Asp Gln Val Ala
515
Gln Ser Asp Gly Glu Glu Ser Pro Ala Ala Glu Glu Gln Leu Leu
530
Gly Glu His Ile Lys Glu Glu Lys Glu Glu Ser Glu Phe Leu Pro
545
Ser Ser Gly Gly Thr Phe Asn Ile Ser Val Ser Gly Asp Ile Asp
560
Gly Leu Ile Thr Gln Ala Leu Leu Thr Gly Asn Phe Glu Ser Ala
575
Val Asp Leu Cys Leu His Asp Asn Arg Met Ala Asp Ala Ile Ile
590
Leu Ala Ile Ala Gly Gly Gln Glu Leu Leu Ala Arg Thr Gln Lys
605
Lys Tyr Phe Ala Lys Ser Gln Ser Lys Ile Thr Arg Leu Ile Thr
620
Ala Val Val Met Lys Asn Trp Lys Glu Ile Val Glu Ser Cys Asp
635
Leu Lys Asn Trp Arg Glu Ala Leu Ala Ala Val Leu Thr Tyr Ala
650
Lys Pro Asp Glu Phe Ser Ala Leu Cys Asp Leu Leu Gly Thr Arg
665
Leu Glu Asn Glu Gly Asp Ser Leu Leu Gln Thr Gln Ala Cys Leu
680
Cys Tyr Ile Cys Ala Gly Asn Val Glu Lys Leu Val Ala Cys Trp
695
Thr Lys Ala Gln Asp Gly Ser His Pro Leu Ser Leu Gln Asp Leu
710
Ile Glu Lys Val Val Ile Leu Arg Lys Ala Val Gln Leu Thr Gln
725
Ala Met Asp Thr Ser Thr Val Gly Val Leu Leu Ala Ala Lys Met
740
Ser Gln Tyr Ala Asn Leu Leu Ala Ala Gln Gly Ser Ile Ala Ala
755
Ala Leu Ala Phe Leu Pro Asp Asn Thr Asn Gln Pro Asn Ile Met
770
Gln Leu Arg Asp Arg Leu Cys Arg Ala Gln Gly Glu Pro Val Ala
785
Gly His Glu Ser Pro Lys Ile Pro Tyr Glu Lys Gln Gln Leu Pro
800
Lys Gly Arg Pro Gly Pro Val Ala Gly His His Gln Met Pro Arg
815
Val Gln Thr Gln Gln Tyr Tyr Pro His Gly Glu Asn Pro Pro Pro
830
Pro Gly Phe Ile Met His Gly Asn Val Asn Pro Asn Ala Ala Gly
845
Gln Leu Pro Thr Ser Pro Gly His Met His Thr Gln Val Pro Pro
860

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Tyr Gln Pro Ala Gln Pro Tyr Pro Phe
875 880 885
Gly Thr Gly Gly Ser Ala Met Tyr Arg Pro Gln Gln Pro Val Ala
890 895 900
Pro Pro Thr Ser Asn Ala Tyr Pro Asn Thr Pro Tyr Ile Ser Ser
905 910 915
Ala Ser Ser Tyr Thr Gly Gln Ser Gln Leu Tyr Ala Ala Gln His
920 925 930
Gln Ala Ser Ser Pro Thr Ser Ser Pro Ala Thr Ser Phe Pro Pro
935 940 945
Pro Pro Ser Ser Gly Ala Ser Phe Gln His Gly Gly Pro Gly Ala
950 955 960
Pro Pro Ser Ser Ser Ala Tyr Ala Leu Pro Pro Gly Thr Thr Gly
965 970 975
Thr Leu Pro Ala Ala Ser Glu Leu Pro Ala Ser Gln Arg Thr Gly
980 985 990
Pro Gln Asn Gly Trp Asn Asp Pro Pro Ala Leu Asn Arg Val Pro
995 1000 1005
Lys Lys Lys Lys Met Pro Glu Asn Phe Met Pro Pro Val Pro Ile
1010 1015 1020
Thr Ser Pro Ile Met Asn Pro Leu Gly Asp Pro Gln Ser Gln Met
1025 1030 1035
Leu Gln Gln Gln Pro Ser Ala Pro Val Pro Leu Ser Ser Gln Ser
1040 1045 1050
Ser Phe Pro Gln Pro His Leu Pro Gly Gly Gln Pro Phe His Gly
1055 1060 1065
Val Gln Gln Pro Leu Gly Gln Thr Gly Met Pro Pro Ser Phe Ser
1070 1075 1080
Lys Pro Asn Ile Glu Gly Ala Pro Gly Ala Pro Ile Gly Asn Thr
1085 1090 1095
Phe Gln His Val Gln Ser Leu Pro Thr Lys Lys Ile Thr Lys Lys
1100 1105 1110
Pro Ile Pro Asp Glu His Leu Ile Leu Lys Thr Thr Phe Glu Asp
1115 1120 1125
Leu Ile Gln Arg Cys Leu Ser Ser Ala For Asp Pro Gln Thr Lys
1130 1135 1140
Arg Lys Leu Asp Asp Ala Ser Lys Arg Leu Glu Phe Leu Tyr Asp
1145 1150 1155
Lys Leu Arg Glu Gln Thr Leu Ser Pro Thr Ile Thr Ser Gly Leu
1160 1165 1170
His Asn Ile Ala Arg Ser Ile Glu Thr Arg Asn Tyr Ser Glu Gly
1175 1180 1185
Leu Thr Met His Thr His Ile Val Ser Thr Ser Asn Phe Ser Glu
1190 1195 1200
Thr Ser Ala Phe Met Pro Val Leu Lys Val Val Leu Thr Gln Ala
1205 1210 1215
Asn Lys Leu Gly Val
1220

```

<210> 14
<211> 222
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2596566CD1

```

<400> 14
Met Ala Phe Val Lys Ser Gly Trp Leu Leu Arg Gln Ser Thr Ile
1 5 10 15
Leu Lys Arg Trp Lys Lys Asn Trp Phe Asp Leu Trp Ser Asp Gly
20 25 30
His Leu Ile Tyr Tyr Asp Asp Gln Thr Arg Gln Asn Ile Glu Asp
35 40 45
Lys Val His Met Pro Met Asp Cys Ile Asn Ile Arg Thr Gly Gln
50 55 60

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

Glu Cys Arg Asp Thr Gln Pro Pro Asp Gly Lys Ser Lys Asp Cys
65 70 75
Met Leu Gln Ile Val Cys Arg Asp Gly Lys Thr Ile Ser Leu Cys
80 85 90
Ala Glu Ser Thr Asp Asp Cys Leu Ala Trp Lys Phe Thr Leu Gln
95 100 105
Asp Ser Arg Thr Asn Thr Ala Tyr Val Gly Ser Ala Val Met Thr
110 115 120
Asp Glu Thr Ser Val Val Ser Ser Pro Pro Tyr Thr Ala Tyr
125 130 135
Ala Ala Pro Ala Pro Glu Gln Ala Tyr Gly Tyr Gly Pro Tyr Gly
140 145 150
Gly Ala Tyr Pro Pro Gly Thr Gln Val Val Tyr Ala Ala Asn Gly
155 160 165
Gln Ala Tyr Ala Val Pro Tyr Gln Tyr Pro Tyr Ala Gly Leu Tyr
170 175 180
Gly Gln Gln Pro Ala Asn Gln Val Ile Ile Arg Glu Arg Tyr Arg
185 190 195
Asp Asn Asp Ser Asp Leu Ala Leu Gly Met Leu Ala Gly Ala Ala
200 205 210
Thr Gly Met Ala Leu Gly Ser Leu Phe Trp Val Phe
215 220

```

<210> 15
 <211> 924
 <212> FRM
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2685253CD1

```

<400> 15
Met Ser Arg Ser Arg Gln Pro Pro Leu Thr Gly Ile Ser Pro
1 5 10 15
Asn Glu Gly Ile Pro Trp Thr Lys Val Thr Ile Arg Gly Glu Asn
20 25 30
Leu Gly Thr Gly Pro Thr Asp Leu Ile Gly Leu Thr Ile Cys Gly
35 40 45
His Asn Cys Leu Leu Thr Ala Glu Trp Met Ser Ala Ser Lys Ile
50 55 60
Val Cys Arg Val Gly Gln Ala Lys Asn Asp Lys Gly Asp Ile Ile
65 70 75
Val Thr Thr Lys Ser Gly Gly Arg Gly Thr Ser Thr Val Ser Phe
80 85 90
Lys Leu Leu Lys Pro Glu Lys Ile Gly Ile Leu Asp Gln Ser Ala
95 100 105
Val Trp Val Asp Glu Met Asn Tyr Tyr Asp Met Arg Thr Asp Arg
110 115 120
Asn Lys Gly Ile Pro Pro Leu Ser Leu Arg Pro Ala Asn Pro Leu
125 130 135
Gly Ile Glu Ile Glu Lys Ser Lys Phe Ser Gln Lys Asp Leu Glu
140 145 150
Met Leu Phe His Gly Met Ser Ala Asp Phe Thr Ser Glu Asn Phe
155 160 165
Ser Ala Ala Trp Tyr Leu Ile Glu Asn His Ser Asn Thr Ser Phe
170 175 180
Glu Gln Leu Lys Met Ala Val Thr Asn Leu Lys Arg Gln Ala Asn
185 190 195
Lys Lys Ser Glu Gly Ser Leu Ala Tyr Val Lys Gly Gly Leu Ser
200 205 210
Thr Phe Phe Glu Ala Gln Asp Ala Leu Ser Ala Ile His Gln Lys
215 220 225
Leu Glu Ala Asp Gly Thr Glu Lys Val Glu Gly Ser Met Thr Thr
230 235 240
Lys Leu Glu Asn Val Leu Asn Arg Ala Ser Asn Thr Ala Asp Thr
245 250 255

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Leu Phe Gln Glu Val Leu Gly Arg Lys Asp Lys Ala Asp Ser Thr
 260 265 270
 Arg Asn Ala Leu Asn Val Leu Gln Arg Phe Lys Phe Leu Phe Asn
 275 280 285
 Leu Pro Leu Asn Ile Glu Arg Asn Ile Gln Lys Gly Asp Tyr Asp
 290 295 300
 Val Val Ile Asn Asp Tyr Glu Lys Ala Lys Ser Leu Phe Gly Lys
 305 310 315
 Thr Glu Val Gln Val Phe Lys Lys Tyr Tyr Ala Glu Val Glu Thr
 320 325 330
 Arg Ile Glu Ala Leu Arg Glu Leu Leu Leu Asp Lys Leu Leu Glu
 335 340 345
 Thr Pro Ser Thr Leu His Asp Gln Lys Arg Tyr Ile Arg Tyr Leu
 350 355 360
 Ser Asp Leu His Ala Ser Gly Asp Pro Ala Trp Gln Cys Ile Gly
 365 370 375
 Ala Gln His Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Met His Ser Cys Lys Glu
 380 385 390
 Gly Tyr Val Lys Asp Leu Lys Gly Asn Pro Gly Leu His Ser Pro
 395 400 405
 Met Leu Asp Leu Asp Asn Asp Thr Arg Pro Ser Val Leu Gly His
 410 415 420
 Leu Ser Gln Thr Ala Ser Leu Lys Arg Gly Ser Ser Phe Gln Ser
 425 430 435
 Gly Arg Asp Asp Thr Trp Arg Tyr Lys Thr Pro His Arg Val Ala
 440 445 450
 Phe Val Glu Lys Leu Thr Lys Leu Val Leu Ser Gln Leu Pro Asn
 455 460 465
 Phe Trp Lys Leu Trp Ile Ser Tyr Val Asn Gly Ser Leu Phe Ser
 470 475 480
 Glu Thr Ala Glu Lys Ser Gly Gln Ile Glu Arg Ser Lys Asn Val
 485 490 495
 Arg Gln Arg Gln Asn Asp Phe Lys Lys Met Ile Gln Glu Val Met
 500 505 510
 His Ser Leu Val Lys Leu Thr Arg Gly Ala Leu Leu Pro Leu Ser
 515 520 525
 Ile Arg Asp Gly Glu Ala Lys Gln Tyr Gly Gly Trp Glu Val Lys
 530 535 540
 Cys Glu Leu Ser Gly Gln Trp Leu Ala His Ala Ile Gln Thr Val
 545 550 555
 Arg Leu Thr His Glu Ser Leu Thr Ala Leu Glu Ile Pro Asn Asp
 560 565 570
 Leu Leu Gln Thr Ile Gln Asp Leu Ile Leu Asp Leu Arg Val Arg
 575 580 585
 Cys Val Met Ala Thr Leu Gln His Thr Ala Glu Glu Ile Lys Arg
 590 595 600
 Leu Ala Glu Lys Glu Asp Trp Ile Val Asp Asn Glu Gly Leu Thr
 605 610 615
 Ser Leu Pro Cys Gln Phe Glu Gln Cys Ile Val Cys Ser Leu Gln
 620 625 630
 Ser Leu Lys Gly Val Leu Glu Cys Lys Pro Gly Glu Ala Ser Val
 635 640 645
 Phe Gln Gln Pro Lys Thr Gln Glu Glu Val Cys Gln Leu Ser Ile
 650 655 660
 Asn Ile Met Gln Val Phe Ile Tyr Cys Leu Glu Gln Leu Ser Thr
 665 670 675
 Lys Pro Asp Ala Asp Ile Asp Thr Thr His Leu Ser Val Asp Val
 680 685 690
 Ser Ser Pro Asp Leu Phe Gly Ser Ile His Glu Asp Phe Ser Leu
 695 700 705
 Thr Ser Glu Gln Arg Leu Leu Ile Val Leu Ser Asn Cys Cys Tyr
 710 715 720
 Leu Glu Arg His Thr Phe Leu Asn Ile Ala Glu His Phe Glu Lys
 725 730 735
 His Asn Phe Gln Gly Ile Glu Lys Ile Thr Gln Val Ser Met Ala
 740 745 750
 Ser Leu Lys Glu Leu Asp Gln Arg Leu Phe Glu Asn Tyr Ile Glu

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

755          760          765
Leu Lys Ala Asp Pro Ile Val Gly Ser Leu Glu Pro Gly Ile Tyr
770          775          780
Ala Gly Tyr Phe Asp Trp Lys Asp Cys Leu Pro Pro Thr Gly Val
785          790          795
Arg Asn Tyr Leu Lys Glu Ala Leu Val Asn Ile Ile Ala Val His
800          805          810
Ala Glu Val Phe Thr Ile Ser Lys Glu Leu Val Pro Arg Val Leu
815          820          825
Ser Lys Val Ile Glu Ala Val Ser Glu Glu Leu Ser Arg Leu Met
830          835          840
Gln Cys Val Ser Ser Phe Ser Lys Asn Gly Ala Leu Gln Ala Arg
845          850          855
Leu Glu Ile Cys Ala Leu Arg Asp Thr Val Ala Val Tyr Leu Thr
860          865          870
Pro Glu Ser Lys Ser Ser Phe Lys Gln Ala Leu Glu Ala Leu Pro
875          880          885
Gln Leu Ser Ser Gly Ala Asp Lys Lys Leu Leu Glu Glu Leu Leu
890          895          900
Asn Lys Phe Lys Ser Ser Met His Leu Gln Leu Thr Cys Phe Gln
905          910          915
Ala Ala Ser Ser Thr Met Met Lys Thr
920

```

<210> 16

<211> 435

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2762252CD1

<400> 16

```

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

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

245      250      255
Thr Leu Glu Asp Leu Ser Glu Ser Asp Gly Ile Glu Gln Leu Glu
260      265      270
Glu Arg Leu Lys Tyr Tyr Arg Ile Leu Ile Asp Lys Leu Ser Ala
275      280      285
Glu Ile Glu Lys Glu Val Lys Ser Val Cys Ile Asp Ile Asn Glu
290      295      300
Asp Ala Glu Gly Glu Ala Ala Ser Glu Leu Glu Ser Ser Asn Leu
305      310      315
Glu Ser Val Lys Cys Asp Leu Glu Lys Ser Met Lys Ala Gly Leu
320      325      330
Lys Ile His Ser His Leu Ser Gly Ile Gln Lys Glu Ile Lys Tyr
335      340      345
Ser Asp Ser Ser Leu Leu Gln Met Lys Ala Lys Glu Tyr Glu Leu Leu
350      355      360
Ala Lys Glu Phe Asn Ser Leu His Ile Ser Asn Lys Asp Gly Cys
365      370      375
Gln Leu Lys Glu Asn Arg Ala Lys Glu Ser Glu Val Pro Ser Ser
380      385      390
Asn Gly Glu Ile Pro Pro Phe Thr Gln Arg Val Phe Ser Asn Tyr
395      400      405
Thr Asn Asp Thr Asp Ser Asp Thr Gly Ile Ser Ser Asn His Ser
410      415      420
Gln Asp Ser Glu Thr Thr Val Gly Asp Val Val Leu Leu Ser Thr
425      430      435

```

<210> 17

<211> 321

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 3452009CD3

<400> 17

```

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

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

Ser Glu Leu Asp Val Val Arg Gly Asn Thr Lys Val Met Ser Glu
230 235 240
Met Leu Thr Glu Met Val Pro Gly Gln Glu Asp Ser Ser Asp Leu
245 250 255
Glu Leu Leu Gln Glu Leu Asn Arg Thr Cys Arg Ala Met Gln Gln
260 265 270
Arg Ile Val Glu Leu Ile Ser Arg Val Ser Asp Glu Glu Val Thr
275 280 285
Glu Glu Leu Leu His Val Asn Asp Asp Leu Asn Asn Val Phe Leu
290 295 300
Arg Tyr Glu Arg Trp Glu Pro Asp Phe Phe Phe Phe Phe Pro
305 310 315
Leu Lys Arg Leu Leu Pro
320

```

<210> 18

<211> 499

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 4644780CD1

<400> 18

```

Met Pro Ala Val Ser Gly Pro Gly Pro Leu Phe Cys Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Pro His Ser Pro Glu Thr Gly Cys Pro Pro Leu
20 25 30
Arg Arg Phe Glu Tyr Lys Leu Ser Phe Lys Gly Pro Arg Leu Ala
35 40 45
Leu Pro Gly Ala Gly Ile Pro Phe Trp Ser His His Gly Asp Ala
50 55 60
Ile Leu Gly Leu Glu Glu Val Arg Leu Thr Pro Ser Met Arg Asn
65 70 75
Arg Ser Gly Ala Val Trp Ser Arg Ala Ser Val Pro Phe Ser Ala
80 85 90
Trp Glu Val Glu Val Gln Met Arg Val Thr Gly Leu Gly Arg Arg
95 100 105
Gly Ala Gln Gly Met Ala Val Trp Tyr Thr Arg Gly Arg Gly His
110 115 120
Val Gly Ser Val Leu Gly Gly Leu Ala Ser Trp Asp Gly Ile Gly
125 130 135
Ile Phe Phe Asp Ser Pro Ala Glu Asp Thr Gln Asp Ser Pro Ala
140 145 150
Ile Arg Val Leu Ala Ser Asp Gly His Ile Pro Ser Glu Gln Pro
155 160 165
Gly Asp Gly Ala Ser Gln Gly Leu Gly Ser Cys His Trp Asp Phe
170 175 180
Arg Asn Arg Pro His Pro Phe Arg Ala Arg Ile Thr Tyr Trp Gly
185 190 195
Gln Arg Leu Arg Met Ser Leu Asn Ser Gly Leu Thr Pro Ser Asp
200 205 210
Pro Asp Asp His Asp Val Leu Ser Phe Leu Thr Phe Ser Leu Ser
215 220 225
Glu Pro Ser Pro Glu Val Pro Pro Gln Pro Phe Leu Glu Met Gln
230 235 240
Gln Leu Arg Leu Ala Arg Gln Leu Glu Gly Leu Trp Ala Arg Leu
245 250 255
Gly Leu Gly Thr Arg Glu Asp Val Thr Pro Lys Ser Asp Ser Glu
260 265 270
Ala Gln Gly Glu Gly Glu Arg Leu Phe Asp Leu Glu Glu Thr Leu
275 280 285
Gly Arg His Arg Arg Ile Leu Gln Ala Leu Arg Gly Leu Ser Lys
290 295 300
Gln Leu Ala Gln Ala Glu Arg Gln Trp Lys Lys Gln Leu Gly Pro
305 310 315

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

Pro Gly Gln Ala Arg Pro Asp Gly Gly Trp Ala Leu Asp Ala Ser
320 325 330
Cys Gln Ile Pro Ser Thr Pro Gly Arg Gly Gly His Leu Ser Met
335 340 345
Ser Leu Asn Lys Asp Ser Ala Lys Val Gly Ala Leu Leu His Gly
350 355 360
Gln Trp Thr Leu Leu Gln Ala Leu Gln Glu Met Arg Asp Ala Ala
365 370 375
Val Arg Met Ala Ala Glu Ala Gln Val Ser Tyr Leu Pro Val Gly
380 385 390
Ile Glu His His Phe Leu Glu Leu Asp His Ile Leu Gly Leu Leu
395 400 405
Gln Glu Glu Leu Arg Gly Pro Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala Pro
410 415 420
Arg Pro Pro Gly Gln Pro Pro Arg Ala Ser Ser Cys Leu Gln Pro
425 430 435
Gly Ile Phe Leu Phe Tyr Leu Leu Ile Gln Thr Val Gly Phe Phe
440 445 450
Gly Tyr Val His Phe Ser Arg Gln Glu Leu Asn Lys Ser Leu Gln
455 460 465
Glu Cys Leu Ser Thr Gly Ser Leu Pro Leu Gly Pro Ala Pro His
470 475 480
Thr Pro Arg Ala Leu Gly Ile Leu Arg Arg Gln Pro Leu Pro Ala
485 490 495
Ser Met Pro Ala

```

<210> 19

<211> 879

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 4946103CD1

<400> 19

```

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

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Lys Glu Val Asp Gln Ile Glu Leu Lys Leu Ser Ser Tyr Glu Glu
 230 235 240
 Met Leu Gln Ser Val Lys Glu Gln Met Asp Gln Ile Ser Glu Ser
 245 250 255
 Asn His Leu Ile His Leu Ser Asn Thr Asn Asn Val Lys Leu Leu
 260 265 270
 Ser Glu Ile Glu Phe Leu Val Asn His Met Asp Leu Ala Lys Gly
 275 280 285
 His Ile Lys Ala Leu Gln Glu Gly Asp Leu Ala Ser Ser Arg Gly
 290 295 300
 Ile Glu Ala Cys Thr Asn Ala Ala Asp Ala Leu Leu Gln Cys Met
 305 310 315
 Asn Val Ala Leu Arg Pro Gly His Asp Leu Leu Leu Ala Val Lys
 320 325 330
 Gln Gln Gln Gln Arg Phe Ser Asp Leu Arg Glu Leu Phe Ala Arg
 335 340 345
 Arg Leu Ala Ser His Leu Asn Asn Val Phe Val Gln Gln Gly His
 350 355 360
 Asp Gln Ser Ser Ser Leu Pro Gln His Cys Val Ser Thr Gly Phe
 365 370 375
 Thr Gln Ser Ser Ser Ile Ser Gln Arg Phe Pro Pro Ile Ala Lys
 380 385 390
 Leu Met Glu Trp Leu Lys Ser Thr Asp Tyr Gly Lys Tyr Glu Gly
 395 400 405
 Leu Thr Lys Asn Tyr Met Asp Tyr Leu Ser Arg Leu Tyr Glu Arg
 410 415 420
 Glu Ile Lys Asp Phe Phe Glu Val Ala Lys Ile Lys Met Thr Gly
 425 430 435
 Thr Thr Lys Glu Ser Lys Lys Phe Gly Leu His Gly Ser Ser Gly
 440 445 450
 Lys Leu Thr Gly Ser Thr Ser Ser Leu Asn Lys Leu Ser Val Gln
 455 460 465
 Ser Ser Gly Asn Arg Arg Ser Gln Ser Ser Ser Leu Leu Asp Met
 470 475 480
 Gly Asn Met Ser Ala Ser Asp Leu Asp Val Ala Asp Arg Thr Lys
 485 490 495
 Phe Asp Lys Ile Phe Glu Gln Val Leu Ser Glu Leu Glu Pro Leu
 500 505 510
 Cys Leu Ala Glu Gln Asp Phe Ile Ser Lys Phe Phe Lys Leu Gln
 515 520 525
 Gln His Gln Ser Met Pro Gly Thr Met Ala Glu Ala Glu Asp Leu
 530 535 540
 Asp Gly Gly Thr Leu Ser Arg Gln His Asn Cys Gly Thr Pro Leu
 545 550 555
 Pro Val Ser Ser Glu Lys Asp Met Ile Arg Gln Met Met Ile Lys
 560 565 570
 Ile Phe Arg Cys Ile Glu Pro Glu Leu Asn Asn Leu Ile Ala Leu
 575 580 585
 Gly Asp Lys Ile Asp Ser Phe Asn Ser Leu Tyr Met Leu Val Lys
 590 595 600
 Met Ser His His Val Trp Thr Ala Gln Asn Val Asp Pro Ala Ser
 605 610 615
 Phe Leu Ser Thr Thr Leu Gly Asn Val Leu Val Thr Val Lys Arg
 620 625 630
 Asn Phe Asp Lys Cys Ile Ser Asn Gln Ile Arg Gln Met Glu Glu
 635 640 645
 Val Lys Ile Ser Lys Lys Ser Lys Val Gly Ile Leu Pro Phe Val
 650 655 660
 Ala Glu Phe Glu Glu Phe Ala Gly Leu Ala Glu Ser Ile Phe Lys
 665 670 675
 Asn Ala Glu Arg Arg Gly Asp Leu Asp Lys Ala Tyr Thr Lys Leu
 680 685 690
 Ile Arg Gly Val Phe Val Asn Val Glu Lys Val Ala Asn Glu Ser
 695 700 705
 Gln Lys Thr Pro Arg Asp Val Val Met Met Glu Asn Phe His His
 710 715 720
 Ile Phe Ala Thr Leu Ser Arg Leu Lys Ile Ser Cys Leu Glu Ala

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

735
Glu Lys Lys Glu Ala Lys Gln Lys Tyr Thr Asp His Leu Gln Ser
740
Tyr Val Ile Tyr Ser Leu Gly Gln Pro Leu Glu Lys Leu Asn His
755
Phe Phe Glu Gly Val Glu Ala Arg Val Ala Gln Gly Ile Arg Glu
770
Glu Glu Val Ser Tyr Gln Leu Ala Phe Asn Lys Gln Glu Leu Arg
790
Lys Val Ile Lys Glu Tyr Pro Gly Lys Glu Val Lys Lys Gly Leu
800
Asp Asn Leu Tyr Lys Lys Val Asp Lys His Leu Cys Glu Glu Glu
815
Asn Leu Leu Gln Val Val Trp His Ser Met Gln Asp Glu Phe Ile
830
Arg Gln Tyr Lys His Phe Glu Gly Leu Ile Ala Arg Cys Tyr Pro
845
Gly Ser Gly Val Thr Met Glu Phe Thr Ile Gln Asp Ile Leu Asp
860
Tyr Cys Ser Ser Ile Ala Gln Ser His
875

```

<210> 20

<211> 298

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Misc_feature

<223> Incyte ID No: 5562355CD1

<400> 20

```

Met Asp Asn Ala Gly Lys Glu Arg Glu Ala Val Gln Leu Met Ala
1
Glu Ala Glu Lys Arg Val Lys Ala Ser His Ser Phe Leu Arg Gly
20
Leu Phe Gly Gly Asn Thr Arg Ile Glu Glu Ala Cys Glu Met Tyr
35
Thr Arg Ala Ala Asn Met Phe Lys Met Ala Lys Asn Trp Ser Ala
50
Ala Gly Asn Ala Phe Cys Gln Ala Ala Lys Leu His Met Gln Leu
65
Gln Ser Lys His Asp Ser Ala Thr Ser Phe Val Asp Ala Gly Asn
80
Ala Tyr Lys Lys Ala Asp Pro Gln Glu Ala Ile Asn Cys Leu Asn
95
Ala Ala Ile Asp Ile Tyr Thr Asp Met Gly Arg Phe Thr Ile Ala
110
Ala Lys His His Ile Thr Ile Ala Glu Ile Tyr Glu Thr Glu Leu
125
Val Asp Ile Glu Lys Ala Ile Ala His Tyr Glu Gln Ser Ala Asp
140
Tyr Tyr Lys Gly Glu Glu Ser Asn Ser Ser Ala Asn Lys Cys Leu
155
Leu Lys Val Ala Ala Tyr Ala Ala His Leu Glu Gln Tyr Gln Asn
170
Ala Ile Glu Ile Tyr Glu Gln Val Gly Ala Asn Thr Met Asp Asn
185
Pro Leu Thr Thr Tyr Ser Ala Lys Asp Tyr Phe Phe Lys Ala Ala
200
Leu Cys His Phe Ile Val Asp Glu Leu Asn Ala Lys Leu Ala Leu
215
Glu Gln Tyr Glu Asp Met Phe Pro Ala Phe Thr Asp Ser Arg Glu
230
Cys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Glu Ala His Glu Glu Gln Asn
245
Ser Glu Ala Tyr Thr Glu Ala Val Lys Glu Phe Asp Ser Ile Ser

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

Arg	Leu	Asp	Gln	260	Leu	Thr	Thr	Met	265	Leu	Leu	Arg	Ile	Lys	270
				275					280						285
Ser	Ile	Gln	Gly	290	Gly	Glu	Gly	Asp	295	Gly	Asp	Leu	Lys		

<210> 21

<211> 941

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte LD No: 5679924CD1

<400> 21

Met	Ala	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Arg	Arg	Phe	Val	Phe	Phe	Asp	Lys	
1				5					10					15	
Glu	Leu	Val	Lys	Glu	Pro	Leu	Ser	Asn	Asp	Gly	Ala	Ala	Pro	Gly	
				20					25					30	
Ala	Thr	Pro	Ala	Ser	Gly	Ser	Ala	Ala	Ser	Lys	Phe	Leu	Cys	Leu	
				35					40					45	
Pro	Pro	Gly	Ile	Thr	Val	Cys	Asp	Ser	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	
				50					55					60	
Phe	Gly	Asp	Met	Glu	Gly	Gln	Ile	Trp	Phe	Leu	Pro	Arg	Ser	Leu	
				65					70					75	
Gln	Leu	Thr	Gly	Phe	Gln	Ala	Tyr	Lys	Leu	Arg	Val	Thr	His	Leu	
				80					85					90	
Tyr	Gln	Leu	Lys	Gln	His	Asn	Ile	Leu	Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Asp	
				95					100					105	
Glu	Glu	Gly	Ile	Asn	Pro	Leu	Val	Lys	Ile	Trp	Asn	Leu	Glu	Lys	
				110					115					120	
Arg	Asp	Gly	Gly	Asn	Pro	Leu	Cys	Thr	Arg	Ile	Phe	Pro	Ala	Ile	
				125					130					135	
Pro	Gly	Thr	Glu	Pro	Thr	Val	Val	Ser	Cys	Leu	Thr	Val	His	Glu	
				140					145					150	
Asn	Leu	Asn	Phe	Met	Ala	Ile	Gly	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Val	Thr	
				155					160					165	
Leu	Asn	Lys	Gly	Asp	Ile	Thr	Arg	Asp	Arg	His	Ser	Lys	Thr	Gln	
				170					175					180	
Ile	Leu	His	Lys	Gly	Asn	Tyr	Pro	Val	Thr	Gly	Leu	Ala	Phe	Arg	
				185					190					195	
Gln	Ala	Gly	Lys	Thr	Thr	His	Leu	Phe	Val	Val	Thr	Thr	Glu	Asn	
				200					205					210	
Val	Gln	Ser	Tyr	Ile	Val	Ser	Gly	Lys	Asp	Tyr	Pro	Arg	Val	Glu	
				215					220					225	
Leu	Asp	Thr	His	Gly	Cys	Gly	Leu	Arg	Cys	Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	
				230					235					240	
Pro	Ser	Gln	Asp	Leu	Gln	Phe	Ile	Val	Ala	Gly	Asp	Glu	Cys	Val	
				245					250					255	
Tyr	Leu	Tyr	Gln	Pro	Asp	Glu	Arg	Gly	Pro	Cys	Phe	Ala	Phe	Glu	
				260					265					270	
Gly	His	Lys	Leu	Ile	Ala	His	Trp	Phe	Arg	Gly	Tyr	Leu	Ile	Ile	
				275					280					285	
Val	Ser	Arg	Asp	Arg	Lys	Val	Ser	Pro	Lys	Ser	Glu	Phe	Thr	Ser	
				290					295					300	
Arg	Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Asp	Lys	Gln	Ile	Leu	Asn	Ile	Tyr	Asp	
				305					310					315	
Leu	Cys	Asn	Lys	Phe	Ile	Ala	Tyr	Ser	Thr	Val	Phe	Glu	Asp	Val	
				320					325					330	
Val	Asp	Val	Leu	Ala	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Tyr	Val	Leu	Thr	Arg	
				335					340					345	
Asp	Gly	Arg	Val	His	Ala	Leu	Gln	Glu	Lys	Asp	Thr	Gln	Thr	Lys	
				350					355					360	
Leu	Glu	Met	Leu	Phe	Lys	Lys	Asn	Leu	Phe	Glu	Met	Ala	Ile	Asn	
				365					370					375	
Leu	Ala	Lys	Ser	Gln	His	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Gln	Ile	

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

380
Phe Met Gln Tyr Gly Asp His Leu Tyr Ser Lys Gly Asn His Asp
395
Gly Ala Val Gln Gln Tyr Ile Arg Thr Ile Gly Lys Leu Glu Pro
410
Ser Tyr Val Ile Arg Lys Phe Leu Asp Ala Gln Arg Ile His Asn
425
Leu Thr Ala Tyr Leu Gln Thr Leu His Arg Gln Ser Leu Ala Asn
440
Ala Asp His Thr Thr Leu Leu Leu Asn Cys Tyr Thr Lys Leu Lys
455
Asp Ser Ser Lys Leu Glu Glu Phe Ile Lys Lys Lys Ser Glu Ser
470
Glu Val His Phe Asp Val Glu Thr Ala Ile Lys Val Leu Arg Gln
485
Ala Gly Tyr Tyr Ser His Ala Leu Tyr Leu Ala Glu Asn His Ala
500
His His Glu Trp Tyr Leu Lys Ile Gln Leu Glu Asp Ile Lys Asn
515
Tyr Gln Glu Ala Leu Arg Tyr Ile Gly Lys Leu Pro Phe Glu Gln
530
Ala Glu Ser Asn Met Lys Arg Tyr Gly Lys Ile Leu Met His His
545
Ile Pro Glu Gln Thr Thr Gln Leu Leu Lys Gly Leu Cys Thr Asp
560
Tyr Arg Pro Ser Leu Glu Gly Arg Ser Asp Arg Glu Ala Pro Gly
575
Cys Arg Ala Asn Ser Glu Glu Phe Ile Pro Ile Phe Ala Asn Asn
590
Pro Arg Glu Leu Lys Ala Phe Leu Glu His Met Ser Glu Val Gln
605
Pro Asp Ser Pro Gln Gly Ile Tyr Asp Thr Leu Leu Glu Leu Arg
620
Leu Gln Asn Trp Ala His Glu Lys Asp Pro Gln Val Lys Glu Lys
635
Leu His Ala Glu Ala Ile Ser Leu Leu Lys Ser Gly Arg Phe Cys
650
Asp Val Phe Asp Lys Ala Leu Val Leu Cys Gln Met His Asp Phe
665
Gln Asp Gly Val Leu Tyr Leu Tyr Glu Gln Gly Lys Leu Phe Gln
680
Gln Ile Met His Tyr His Met Gln His Glu Gln Tyr Arg Gln Val
695
Ile Ser Val Cys Glu Arg His Gly Glu Gln Asp Pro Ser Leu Trp
710
Glu Gln Ala Leu Ser Tyr Phe Ala Arg Lys Glu Glu Asp Cys Lys
725
Glu Tyr Val Ala Ala Val Leu Lys His Ile Glu Asn Lys Asn Leu
740
Met Pro Pro Leu Leu Val Val Gln Thr Leu Ala His Asn Ser Thr
755
Ala Thr Leu Ser Val Ile Arg Asp Tyr Leu Val Gln Lys Leu Gln
770
Lys Gln Ser Gln Gln Ile Ala Gln Asp Glu Leu Arg Val Arg Arg
785
Tyr Arg Glu Glu Thr Thr Arg Ile Arg Gln Glu Ile Gln Glu Leu
800
Lys Ala Ser Pro Lys Ile Phe Gln Lys Thr Lys Cys Ser Ile Cys
815
Asn Ser Ala Leu Glu Leu Pro Ser Val His Phe Leu Cys Gly His
830
Ser Phe His Gln His Cys Phe Glu Ser Tyr Ser Glu Ser Asp Ala
845
Asp Cys Pro Thr Cys Leu Pro Glu Asn Arg Lys Val Met Asp Met
860
Ile Arg Ala Gln Glu Gln Lys Arg Asp Leu His Asp Gln Phe
875

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

His Gln Leu Arg Cys Ser Asn Asp Ser Phe Ser Val Ile Ala Asp
 895 895 900
 Tyr Phe Gly Arg Gly Val Phe Asn Lys Leu Thr Iou Leu Thr Asp
 905 910 915
 Pro Pro Thr Ala Arg Leu Thr Ser Ser Leu Glu Ala Gly Leu Gln
 920 925 930
 Arg Asp Leu Leu Met His Ser Arg Arg Gly Thr
 935 940

<210> 22

<211> 336

<212> PPT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 5870962CDL

<400> 22

Met Ser Lys Ser Val Pro Ala Phe Leu Gln Asp Glu Val Ser Gly
 1 5 10 15
 Ser Val Met Ser Val Tyr Ser Gly Asp Phe Gly Asn Leu Glu Val
 20 25 30
 Lys Gly Asn Ile Gln Phe Ala Ile Glu Tyr Val Glu Ser Leu Lys
 35 40 45
 Glu Leu His Val Phe Val Ala Gln Cys Lys Asp Leu Ala Ala Ala
 50 55 60
 Asp Val Lys Lys Gln Arg Ser Asp Pro Tyr Val Lys Ala Tyr Leu
 65 70 75
 Leu Pro Asp Lys Gly Lys Met Gly Lys Lys Lys Thr Leu Val Val
 80 85 90
 Lys Lys Thr Leu Asn Pro Val Tyr Asn Glu Ile Leu Arg Tyr Lys
 95 100 105
 Ile Glu Lys Gln Ile Leu Lys Thr Gln Lys Leu Asn Leu Ser Ile
 110 115 120
 Trp His Arg Asp Thr Phe Lys Arg Asn Ser Phe Leu Gly Glu Val
 125 130 135
 Glu Leu Asp Leu Glu Thr Trp Asp Trp Asp Asn Lys Gln Asn Lys
 140 145 150
 Gln Leu Arg Trp Tyr Pro Leu Lys Arg Lys Thr Ala Pro Val Ala
 155 160 165
 Leu Glu Ala Glu Asn Arg Gly Glu Met Lys Leu Ala Leu Gln Tyr
 170 175 180
 Val Pro Glu Pro Val Pro Gly Lys Lys Leu Pro Thr Thr Gly Glu
 185 190 195
 Val His Ile Trp Val Lys Glu Cys Leu Asp Leu Pro Leu Leu Arg
 200 205 210
 Gly Ser His Leu Asn Ser Phe Val Lys Cys Thr Ile Leu Pro Asp
 215 220 225
 Thr Ser Arg Lys Ser Arg Gln Lys Thr Arg Ala Val Gly Lys Thr
 230 235 240
 Thr Asn Pro Ile Phe Asn His Thr Met Val Tyr Asp Gly Phe Arg
 245 250 255
 Pro Glu Asp Leu Met Glu Ala Cys Val Glu Leu Thr Val Trp Asp
 260 265 270
 His Tyr Lys Leu Thr Asn Gln Phe Leu Gly Gly Leu Arg Ile Gly
 275 280 285
 Phe Gly Thr Gly Lys Ser Tyr Gly Thr Glu Val Asp Trp Met Asp
 290 295 300
 Ser Thr Ser Glu Glu Val Ala Leu Trp Glu Lys Met Val Asn Ser
 305 310 315
 Pro Asn Thr Trp Ile Glu Ala Thr Leu Pro Leu Arg Met Leu Leu
 320 325 330
 Ile Ala Lys Ile Ser Lys
 335

<210> 23

WO 01/46256

PCT/US00/34919

<211> 163
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2818605CD1

<400> 23
Met Asp Asp Lys Glu Pro Lys Arg Trp Pro Thr Leu Arg Asp Arg
1 5 10 15
Leu Cys Ser Asp Gly Phe Leu Phe Pro Gln Tyr Pro Ile Lys Pro
20 25 30
Tyr His Leu Lys Gly Ile His Arg Ala Val Phe Tyr Arg Asp Leu
35 40 45
Glu Glu Leu Lys Phe Val Leu Leu Thr Arg Tyr Asp Ile Asn Lys
50 55 60
Arg Asp Arg Lys Glu Arg Thr Ala Leu His Leu Ala Cys Ala Thr
65 70 75
Gly Gln Pro Glu Met Val His Leu Leu Val Ser Arg Arg Cys Gln
80 85 90
Leu Asn Leu Cys Asp Arg Glu Asp Arg Thr Pro Leu Ile Lys Ala
95 100 105
Val Gln Leu Arg Gln Glu Ala Cys Ala Thr Leu Leu Leu Gln Asn
110 115 120
Gly Ala Asp Pro Asn Ile Thr Asp Val Phe Gly Arg Thr Ala Leu
125 130 135
His Tyr Ala Val Tyr Asn Glu Asp Thr Ser Met Ile Glu Lys Leu
140 145 150
Leu Ser His Gly Thr Asn Ile Glu Glu Cys Ser Lys Val
155 160

<210> 24
<211> 1983
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 381035CB1

<400> 24
gtcaggggag ccggcgctgc ggaggcggt gatgaggcgg gaaggcgcca gtggttgag 60
gggtgattgc tgaactagcgg ggaggcgagt ggcagcgatg gtagtggcgg cgaagaaagg 120
cccgggcccg ggcggcgggg tcagcggggg caagcgggag ggcggcggg cctcgagggt 180
gtggtgccgt cgggtgcggg agctgggtgg ctgcagccag gccgggaacc gccactgctt 240
cgagtgcgcc cagcgcgggg tcacctacgt ggatatcacc gtgggcagct tcgtgtgcac 300
cccttgcctc gccctcctga pgggctgaa cccctccat cgtgtcaagt caatctccat 360
gacaacttcc actgagcctg aagtgtatt cctgcaatcc cgtggaatg aggtttgcgg 420
gaagatttgg ttgggtctgt ttgatgctg gacatcttta gtaccagatt ccagggtacc 480
tcagaagtgg aaggagtttc tccaggaaaa atatgagaag agagatggt atgtccccc 540
agaccagtc aaggggccca cttataccaa aggcagtgcc tccaccctg tgcagggtcc 600
catccagaaa gggaagccccc ttoggaaact ttgtggtgat cctgcaacct ctctctcagt 660
tgctgcctcc actcagagcc agcccgctcag tcagtctcac gctgggacat cccaggcccg 720
gagcactcag ccacctcccc actcctctgt caaaaaagcc agtactgacc tgctggctga 780
catcggtgga gacctcttg ctgcacccca gatggcacca gcttttctg cattccctgc 840
ctttgggggc cagaacacct cccaaaggag ctttgccaac ttgatgctc ttagcagttg 900
cccagctct tctgtgttg gaagcctccc tccagctggt caagctcgt tccaggccaa 960
gccactctc gccaggagca gccaggggac tccctttggt gccactcccc tggcaccgcc 1020
cagtcagcca aacagcctcg cagacgtggg cagcttctg ggaacccggg tgcccgctgc 1080
aggtgttctc agcagcctct tccggatggc tggccaggtc cccccgctcc agtctgtcac 1140
gatgggcggc ggcgggcgca gcagcaaggg gctggccttt ggagcctten ctaccccttt 1200
cacagctccc gccggccagt ccccgctgcc tccaccacac ccgttccagc ccaatggctt 1260
ggcgccaggg ccggcctttg ggaatgagcag tgcctgggctt ggttccccc aggcagtgcc 1320
ccccactggg gcccttgcca gctccttccc agcccgctg tcccccgcgc agaccccgct 1380
tgttcagcag cagaatggct cttccttcgg ggaattaggga tccgccaagt tggggcagag 1440
gccactgagc cagccagctg ggaatccac caaccccttc atgactggac cctcatcag 1500

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```
ccacattggc  tccaaacctc  caacccacaa  cccctcttgg  tagcaattgt  tttttggggg  1560
gccctcttcc  tgccttctgg  ggcctctctg  ctccctagag  ctctggtagc  caattgcttg  1620
tgagcatttc  tatggccclt  ggggatggtg  gaggtgctaa  tgcttttgct  cgggccctaa  1680
ggtagaaggc  ggtgcctctc  agattccaca  aagcctctct  cccctccctc  gcatcaccoc  1740
caaccaggca  ggaagccocg  gagtagtgcg  ggcagggcct  gacctggagg  agtgatggtt  1800
gaggggggag  gatttttttc  acatgatcag  tccctgtlgr  aacagctctt  ccttgggctt  1860
agctcgccag  cgtctgtctc  ctcatggacg  gtagcgcatg  gggaaagtag  gggaaagtag  1920
aggccacagt  ttgatggcgc  agtgaocaga  cagttctgag  ccccaagagg  cccatgtggc  1980
caa  1983
```

```
<210> 25
<211> 1559
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

```
<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 383249CB1
```

```
<400> 25
cccagcgaga  gatctgcagc  taggcctggc  gcacttgctc  cccgggtcag  gggatcggag  60
ggggattgaa  gaatgcgcga  ttaaaaggaa  agatcaaggc  gtaaacagaa  agaagaagaa  120
aaagaggact  tcaaaagctg  gaaggatgag  ttctlgcagc  aacgtctgtg  ggtccaggca  180
ggcacaggct  gcagctgagg  gtgggttacc  gcgcctatgg  gtccggctct  acctgcacca  240
gttttatgag  gaactgtacg  cctcaatttg  ggaatgtgag  gatgatcttc  agatccaaag  300
atccootaac  aggtggagct  cagtattctg  gaaagttaga  ctatctcag  gtaacgtttt  360
tgtatctctc  ggaattgact  ttctggcagt  ggcctttctt  gtcccccca  aaatcgaagc  420
atttggcgaa  gccgattttg  tgggtgtcga  caacatgct  gtccagttaa  acagtgtctt  480
ggacatgtac  aagctggcag  gagctgttct  cttctgcatt  ggaaggcagt  ccatggcagg  540
gtgcctgctg  atgtcgggtg  ttgtaaagag  ctactccaaa  gaagaaaaat  tctccagca  600
gaagttttaa  gaacgaatcg  cagacatcaa  agcccaacac  cagccggtta  caaaagctcc  660
agggccaggg  gaaacaaaga  ttccagtca  ttgttcagg  gttcaaaatg  tccagctctt  720
actggcaacc  tgaacctttt  cccacccag  ttctcttgt  ctgatttatg  cccgtggtta  780
aaaagagag  gccagtttct  gagataaga  agatttgagg  ttgaactgvc  tagggctgtg  840
ttcagctgtg  ggcaataata  tgggtggaat  caaacttgct  aagttaagcc  agctctgtgt  900
gagggcggtg  ccatgctcaa  gccctgtcac  atgcctcag  ctgcttaaga  tgggtgtctc  960
ctgttaccgg  gccaccagaa  aacccctgga  actcctcttt  catagatcgt  gactttgtgt  1020
tattttccgt  gttgtttgaa  agtgccgac  agtttagacc  agctcaccaa  tggctaagt  1080
ggctcaattt  attttctaat  attggtttat  ctatgtttt  ctgcgtgggt  ctgtcttcca  1140
ttctgtctc  actatgtgta  agattttgtc  atatgtgttc  atagaaacat  ggaattctct  1200
gaatttgagc  gaaacatgag  ttcttagact  ghatctgac  atgggttcc  tgacatgga  1260
taaaagttta  tcaagattca  caaatcttt  tgtttctctc  atttttttct  cctttgagat  1320
gaagtgtgt  tcttttgct  aggttggagt  acagcgttga  aatcatagcg  cactgcagcc  1380
ttgaactctc  gggctcaagc  gatctctcca  cctcagctc  ccaagttagc  gggactacag  1440
gcacctgcc  ccaacccag  ttaatatctt  ttttaatttt  tttagagggc  aggtatcttc  1500
tgtccaattt  ttttaaaaa  gctaaaattg  ccaactttag  aatcttgacc  aaaaaaaaa  1559
```

```
<210> 26
<211> 1643
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

```
<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 618769CB1
```

```
<400> 26
gaaatcatgc  cctctgtaga  gcagcaggtc  caagcagggc  tgctggctat  ttttccaaaa  60
agtggggcag  tttaaaaaaa  aggcgggaaa  ctageattat  agaaiaatgg  cactttttgt  120
gtatttgtta  aactaacggc  ttgcattggt  cacaacccat  ttcttatgcc  tgtgttttcc  180
ttggcagcaa  aatttctgtg  gtccctccta  ctccacctcc  tgtagggag  agccagtcca  240
gcgcagctcc  tggcaggga  gtcagtgcac  cagatattct  gaaacctctc  aatcaagagg  300
atcccaaatg  ctctactaac  cctaltttga  agcaacagaa  tctccatcc  agtccggcac  360
ccagtaccat  attctctgga  ggttttagac  accggaagtt  aattagcatt  gacagcaact  420
gtacagagat  gggcaatttt  gacaaatgta  atgtcactgg  agaaatagaa  ttgcccattc  480
atttttgtct  caaaacctat  tctttagaaa  tatgcataaa  ggcctgtgag  aacttggct  540
atggagaaga  aaggaagaaa  aagtgcattc  cgtatgtgaa  gacctacctg  ttgcccagca  600
```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

gatcctccca gggaaagcgc aagaatggag tccaaaggaa caccgtggac ccgaccttcc 660
agggagacct gaagtatcag gtggcccttg cccagctggc gaccgggcag ctgcaggctc 720
cgtgtgtggca tctgggcacg ctggcccgga gagtgtttct tggagaggtg atcattctcc 780
tggccacgtg ggaatttgaa gacagccaaa caccgtcctt cccgtggcat ccgtccggg 840
ccaagcgaga gaaatacgaa gacagcgctc ctacagtaaa tggagagctc acagtcggg 900
ctaagctggc tctcccttca cggcccgcaa aactccaaag ggtccaaaga gggcagagtc 960
agccatcaat toatggtoaa ctttgttttg tagtgctagg agccaaagaa ttacctgtgc 1020
ggccagatgg aacctgaaac tcaattgtta agggctgtct cactctgcca gaccacaata 1080
aactgagact gaagtgcaca gtccgtggga agcaggttg cccccagtg aaacactcat 1140
ttgtcttcag tggcgtaacc ccagctcagc tgaagtagtc gagcttggag ttaactgtct 1200
gggatcaggg cctcttttga atgaatgacc gcttgccttg aggaaccaga cttgttcaaa 1260
agggagagac agctgtttgc ggggatgcat gctccatc gaagctccag tggcagaaag 1320
tcccttcag ccccaatcta tggacagaca tgactctgt cctgcactga catgaaggcc 1380
toaaggttcc aggttgcagc aggcgtgagg caactgtcgt ctgcagaggg gctacgaacc 1440
aggtgcaggg tccagctggy agaccctctt gaccttgagc agtctccatc tggggccctg 1500
tccatggct taaccgccta ttggtatctg tgtatatlla cgttaaacac aattatgta 1560
cctaagcttc tggtygggta tctcctcttt gagatgtaga aatggccag abtttaataa 1620
acgttgttac ccaaaaaaaa aaa 1643

```

<210> 27
 <211> 1613
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> Incyte ID No: 1234637CB1

```

<400> 27
cccgggccag gggcgggcgc cgcctatggc aacctgttcc gccgcaagaa gcagagccgc 60
gtccagggagc aggaacaggc catcctgcac ctgaagcagc agcgggacaa gctgaggcag 120
taccagaaga ggaatcgccca gcagctggag cgcgagcgcc cctggcccg gcagctgctg 180
gggagcggca ggaaggaacg ggcacagctg ctgctcaaga agaagcgata ccaggagcag 240
ctccttgaca ggaagggaga ccagatcagc agcctggagg caatggttca gagtatggag 300
ttcaccacaga tgcgaatgaa agtgatggag ggcctgcagt ttggaacga gtctctgaac 360
aagatgcacc aggtgatgct catgaagag gtgagagaga tcttgagaga gacgagggag 420
gcctgtgggt accagcgcca aatagacgag ctccctgcag gaagcttcc tcaggaggat 480
gaagacggca tccctggagg gctgagcgca atcactcagg aacaaataga gctgccagag 540
gttccctccg agcctcctcc tgagaagatc ccagaaacg tccctgtcaa ggcagggccc 600
agcgagggcg agctgttggc agcttcttaa cgtggccctg tcttgtggga ctacggggga 660
tgctccaggg actgtggccc acagagagtt tgggtcacgg ccagctctg accgggttcc 720
ctggagccca gtgcgcaagg tgcagagcag agctgcagcc acgagggcgc attcagggag 780
gactccagag cgtctctcgg agacctttag cctgaaccca ctacgycgcc actgacctgc 840
tctcagtcag gattaactct cgaacgagcc cagctctcgc cgggttgtgg ctcccccggt 900
ggccagggcc cagcccaaac gcctctgggt ctgttccctc gcagtccag ccccgcttgg 960
ctcgcgtctg tctgtgaggg agacaacctc agaccttggg gtccccggc ttctctcttc 1020
tctcgtctgc tccattagc tgggtcaggg ttcctttaag gggctcctcc cttggccctg 1080
cttcccgggc caactcagct tccctgtggt tggggggatc cccagggac cagcatgtgc 1140
tgaaaccttc ttgtgtctgt cctccgcagc ctgacaaccc acctccagtt tgaaggttgc 1200
gggcccaggg ctttcttctg gaattgacga ctccagagc cctgactccc gcttgcacc 1260
tcacgctct gtccactagg gctcagccct gctgaacaa gacctccat ccttgagaga 1320
cgctgctccg gacagtcag ccccggaagt ttgtccatgg ggttcccgcc ggttggggct 1380
catggaactg cgagacccgg gacctctctg cctcgcggt cccgagacca ccagcagcca 1440
ggactggagg ctgtggggca tggcgtgact tctcgtccac agggctgggt tgggtatgag 1500
acgactctgc tgggaaccgc cctgcctgtg gaaagccaca aggacaaagg gagcgggcac 1560
ctcgaccccc agacaggcgg gccctgatta aagttggccc tgcagcccca aaa 1613

```

<210> 28
 <211> 2810
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> Incyte ID No: 160723CB1

<400> 28

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

taccaggttgg gcaattgttg gcaactgtat taggttgcct gacctatct cccatggag 60
tgatgaacac tcccagaggo ctgtgtgact ctgaattctt caacctcaca ggcatctcc 120
tccctcttga aagcccaacc atgggtctct ggccctgttc caaggcgtgg gagggaagcc 180
aggcctcttg atgcacctgg cgttcccttc ccatccctcc tccctgcaca ggtgtgtgaa 240
acacgcatga agagctggcg caagcgggtc caagcgaag tgggcaagtl cagtcttctc 300
aacgagctca tcaaggtcgt gtctcccaag tatctgggt ctctggacatc ggaggaagtg 360
aagacaaga tottggagct cctctacagc tggacagtgg gcttgcctga ggaggtgaaa 420
atccagaggg cctaccagat gctaaagaag cagggtgatt taaagtccga ccccaggtt 480
ccagatgaca ctaccttctc ccttctctct ccacggccga agaattgtat ctttgaagat 540
gaggagaaat ccaagatgct ggcctggctg ctgaagagct ccatctccga agacctcgc 600
ggagccaata agctcatcaa agagatggtg caggagagcc agacgggat ggagaaagtc 660
tcgaagaggg tgaatgccat cgaagaggtg aacaacaatg tgaactgct caggagatg 720
gtgatgagcc acagccaggg cgggcagaca gctgtcagca gctgaggaat catgaagaa 780
gtgtaccagc gctgtgagcg gatggcgccc acgtctctcc gactggcag tgacacagag 840
gacaagatg aggccttagc ggagatctct caggccaatg acaacctcac ccaggtgatc 900
aacctgtata agcagctggt gcgggggtgag gagggtcaag gtgagtccac agcgggtccc 960
atccctggga gcaacctggc cctgtgtgat ctctcaggcc tggatctccc gcttgcgggc 1020
agcaacctac cagctatgct caccggcctt ggagagcagg ccagccctga ccagccagt 1080
gcctcagttt cctgtcttga cgaagagctc atgtctctgg gcttctgta cctcacacc 1140
ccttcaggcc caagccttga ttgtaccgga tgaacaagct tccagtcgtc ggatgccact 1200
gagcccccag cccctgctct ggccacggcc cccagtatgg aaagccgacc ccagcgag 1260
acatctctgc cagcaagcag cgttctggac gacctagacc tcttggggaa gacctctgt 1320
cagcagctgc tgcctccgga atcccagcaa gtgcgggtgg agaagcaga gccaaccccc 1380
cggctcacac tccgggacct gcagaataag agcagcagct cagctctccc cagctccag 1440
gccaccagcc ttctccacac cgtgtcccca gagccccca ggctctcgca gcagccgta 1500
ccaaacgagc ttctactgct cagatcact gtgcccctgg agtccctaaa acccagaaa 1560
atccctgccc tgaactgtga tgacacagac ggttctcgca tctcttccca ttttgcagg 1620
gacacactgc caggcgcttc cgaactgctg gtgggtgtgg ttctcatgct gacacccgc 1680
ccccagccca tccgcaacat cgtgttcag tcaactgtcc caaggttat gaaggtgaag 1740
ctgagccac cctcgggccc ggagctgcca gcttttaacc ccatgttcca cccctagca 1800
atcccccagg tctgtgtgct tgcacaaccc cagaagagaa aggttgcctt cctctacag 1860
ctcaccttca ccatgggtga ccaagcttac aacgagatgg gggatgtgga ccagtcccc 1920
ccactgaaa cctgggttag cctctagAAC agaggggctg gggagagaaa ggggcagag 1980
gacgggtcac tgtcagctt gggagagagc atgtgagc agagacacc ttgttgccc 2040
atggcatttc accccagac cttgtgcttc tcccacacc cctgtaggcc tcaagtact 2100
ctctcccttc ctgtccggc cccgcccctg ctgagccaaa cccagttaga ggttgggct 2160
gggtttgtgc cgttgggttc tccatcccg ggaactggag agggaggggc tgtgtagct 2220
tggaagaact tgggtcatg ggaagagca cagctgttgg ggaagggcca ggaactcag 2280
cccagcccca accccagctg ggggtgggtc ttccccact gtctctatg ccttatggg 2340
aggccacgac ataaactcgg ggcctatgct gactcgggga ccagcttagg cctctccat 2400
aggaacccag tgaactgggg gtgaagccta caccccagc tatgtgact ctggtgtgtg 2460
gtttgactct gctttctctc cggattggcc ctgtgtgaa agcctcagg ggcagagct 2520
ggggaacctc acctggcccg tactcttggg ggttctctt tccatggg cccctgagg 2580
gactgtgggg gctcaggtt aatgcagag gccatggcc ccagcaggg gctgtgggg 2640
acctagagtt ctgggtgtgt ctctctaat catggctc tgcgtgggac tctatgggt 2700
gtcttaagtc tgtccatcca tctgtcgtg gtaagaagt gggctcagt gtgagtga 2760
gcaggagtat ttatgaat aaacgtctgt tttctctgga aaaaaaaa 2810

```

<210> 29
 <211> 2321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1621554CB1

```

<400> 29
tccccagtga gtccaggggg gatccgaact ccagtcgggg gcttggcca gggagagcgc 60
ggatattcga agcgggaatc ccatcagag ccgggctgt tagggcgagg cgttccggg 120
caccgggtat tggggctct cccgtctgc accgggccc cggcgactca cccggagga 180
gaagccgtga tctggctata tgggtggggc cgggctgtgt cgtgtgggg agotgggtct 240
gttctcagat gttctcttc aatgggcttt tgggttagga tgtcgggaa caagaacag 300
gaggaggtga ttacagtgcg gttcaggac cccagatgc agaagaggg ctctggaac 360
tcttatgttg attataagat attctccat accacagca aagcctttac tgcacagact 420
tactgtgtgc ggccgcgta cgtgagctc gttgtgctga gaaagagat acaggaat 480
gctgggttgg tgcctgttcc tgaacttctt gggagatcaa cctcttggg caactcagat 540

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

gagttcattg agaaagcagc acaaggctct cagcacttcc ttgaaaaggt cctgcagagt 500
gtggttctcc tgtcagcaag ccagctgcac ctattctctg aaagccagct ctgggtgctt 560
gagatagaaag cctgtgtcca gggccagagt aacctgactg tttctgtatg cttctctcga 720
tatgtatgtt caaactgttg ctgggcccag gaagagaggg agagctcttc tcaactggct 780
aaagagagacc agcctaagag ttgtgtcttt ctccaagat cgggttagag gagctctccc 840
tcacgcctct ccagtgaaag aaaggacatc ttgaagagt ggggtccagt tgttgactct 900
gaggttctct ccttggaag tccactctc caacctctct cctcaccatt atgtgtgat 960
tttggagac ccaagagggg aacctccact ctccagtctg tgaaggaggg tgtggaggga 1020
gatcatgctg tgccttttga cctgtgtcag ttgaaacag ttttggaaaa gtgagctctc 1080
gtttctgctt tggatgtgtc agagagagat cgggcagaga gacttactca ggtgggactg 1140
ggccaggggc agtatgttg gagggtgggc tggctagtgt ctctagtcca cctgtgtgtg 1200
ggctgattga cagaggtcag tcaatacaga ccttatgccc tcttccatgg gaacaaatac 1260
tgtgcagatg ttttgaagtt aaacataaga cacaggggct gttgttttg aacagaaccc 1320
tatattactc tcttgggac tgaatttctg caggtcatct gtatgttaga ccagagatgt 1380
ctcctcaggt gaccagtttt ggggacccgt atgtggcaaa ttctaagctg ccatattgaa 1440
catcatccca ctgggagtggt ttatgttgta tcccactctt ggtgtgcttc agtttttgtt 1500
gtagccctag agcactttgt ttgtggaggg ctggcctctt gcttactctc ttgcatggac 1560
agggggatga atatttactt tcccactctc ttgctttctc ttctactgat accactgaa 1620
ggaaactgtg ctgtgactcc tggctgtggg gatttatgtc ccagagacct agctgtgtgt 1680
agtgagacct gtagcttcca caacagctca tggctcatga tgaagagaga gtgctgtggc 1740
acagccagag ggaacagtta cagccagggt gcccttatct ttgggaaggg tttccggggg 1800
tgttactgtc tcttctgttt ataaagcaga catgtggcca tcttttccgc aggtgttagg 1860
tgggtctctt tcttttttga atcctttctt tctcttttgg tagcagctcc ctgcctccag 1920
ggcttccccc accagcgtct ctgctgtgtt gcgcagtgca gtggggggca agggctttgt 1980
ttctgtctgc ctgaaagaga gggcctctgg gatggagat agaaacaaca cgtctctctt 2040
cagaaactga ggcattctgt cctcctgttg ccatctctca tctccactga ggcacagagc 2100
tgttagagag ccagatgcaa aggaattctg catctgtcta ctcttaggt ttgtgtgtgt 2160
atcttctccc tctctgtcgc ccaactctcc ctctctgtgg tatctacccc tgtctgtggg 2220
ctcttttact ccagcctat gctgtgggac tgtcatggca tttagtccag agtggagggg 2280
ctttggcttg aaataaatg caagtattta aaaaaaaaaa a 2321

```

<210> 30
<211> 3581
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> Incyte ID No: 1751553CB1

<400> 30
ggggccgggc gggcgcccag cgggcgttgg gactgtgaga cccggagagg gggcggggac 60
ccggcggggg aaagcgccgg cgtggcttgg ctccggtgag cttctccac ctggcagctc 120
gctcagggct gggggggggc cctgtgaggg cgcgcgcgtg tgcggcggtg gagattaata 180
ttaagattgg aagtttgtgt cttttgttgg atattggaaa ttgaatgtaa tggcaacaga 240
atttataaag agttgtgttg gaggatgttt ctatgttgaa acagaaaac acaacttttc 300
tgttggaaaga gattttaaag cagcagctcc aaatagtcaa aatgctacta tctctgtacc 360
tccattgact tctgtttctg taaagcctca gcttggctgt actgaggatt atttgttttc 420
caaatattaca tctgatggca aagaagtaac atttctgttg cccagtttta agttatctta 480
cattcaacc ccggcccaag aaactctctc acatctggaa gaaactggag gatctgcag 540
agcatctttt ggagatgaaa aggtagaact ttccagttca tcccgagag gaactagcta 600
tgtatgttat aaccattctc atatgtatca gcaactttca cctgatttga gtgcagcgtt 660
tctcctccgt toagaagtga cagactgtta tggatgggt ttgtatttaa ggaagaacaa 720
acttcccggt tccctgtggc taagcaaatc tatgtttgat cttacaact catctcagcg 780
atctacccag agcatgaltb cattgtccag tttacccagt agttcttctt caaggaaaaa 840
ttctcagggg agtaacagaa gctgggatac aattactcta tcaaggagatg aaaggagctt 900
tgggagactg aatgtgaat tgttttataa ttcttcagta gaacagatct ggtacacagt 960
tttactgtgc agagattaa gttggccctc tagttatgga gaactctcta cgtttctat 1020
aaaaggaata cttaacttgc caaaacaggt gattttcaa tcttcagcca aggaaggttc 1080
caacgctatt gaatttatgg aaacgtttgt atttgtatt aaacttcaa atctacaac 1140
tgttaagact gtatttanga ttcaaaccca gactccaggt aagaacaaca ttggagaatg 1200
ctcaatgtca ctcaaacccc ttacacacca ggaatggat tactcttgg atataacacc 1260
accttcaaaa atttctgttt gccatgcaga acttgaattg gggacttgtt ttcaagcagt 1320
aaatgcagaa attcagttac aaattcttga ggcacgttac ctccaagct catcaacacc 1380
cttgactttg agtttttttc tgaagtgagg aatgttttag tggggagagt tgaattataa 1440
gaaaagaaca cgttactga aggcctccaa tggaaagatc aagtggggag agactatgat 1500
ttttcactt atacagagtg aaaaagaat tgtttttctc attagcttt acagtgtgag 1560

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

ctctgttaaga agaaaacact ttgtgggcca gatttggata agtgaagaca gtaataacat 1620
tgaagcagtg aacacgtgga aagggacagt aataaatcca gaaaggttg ttatcaggtg 1680
gcacacnatta aatccatctt gaaagacthca cacattant ttgtgaagaa cttgacattc 1740
ttttagaaga ctatgatatt caatttgcta ccaatgagaa gaggcaaatc aacaattttg 1800
tcaatttatg ggggtatata ttatggatata taatgtatct gatagaaat ttgataagaa 1860
aatgtataga attttatcag atatccaaag taaaggaat gttttaaaac tgaacaagaa 1920
gaacacagaca gtaaaatcaa agtatattata ggaatgactaa tlaaattata aagtcgttga 1980
gaatcatcaac catagatagt tctttctata ttatgttttt gcttttgtat ttaagctttt 2040
acttagatat tcaaaacctg gtatataaag tctgtgttag tactatiggg atttagaaga 2100
ctttacacatt atttcagtgc taggcattat tgatagggtc ttggtccac ttgttacctc 2160
ttgtgatgta tttctccog gttaaaatga attgaaacat ttcaactatt tctatatttt 2220
ggagaaagtt ttgtccctgt gttttataat tttttaccc atagacatc acattatccc 2280
ttgttaagct acttatctcc aaaaacttc agaaatagaa aactacattt tggcaggaa 2340
aatgaaaac accagaggtt tgaagttaa ttggaacccc agaatataca tactttgtgt 2400
ttttctccc tcaaatattt tactatttgt ttattctgga gttaaaataa gagtatcatc 2460
catatgggcc atccaatcc acaganttaa atgagcttaa atagaacatt cagtatttta 2520
tgataatcac ttctttttta gtttttaaaa tttagattat tctataattt accgtgtttg 2580
agtatattct catctttttc ataaacatad ctgatatadac ttgttaacaa atatttttta 2640
ttgcagtttt ctctccagta cttattagaa ctcaagtatt ggaataattt tcaagctaat 2700
tgacacaaag aactgtggcc aaaaagaaca gttttttgga gaggcagatg acattatacc 2760
tgatttttga aaatctcact ttatttttgc taantaagtag actaagtgtc ctgtgttctc 2820
agttctccct ttcttctgc cccattctct actttgtccc aggcctgcag agaaagatgg 2880
tgatttttta ggcacaggag atacctgtct ataacctaag catgccttct ttatccagc 2940
tctatgttct ttgttatatc tcccaaatat acacttaatt ctcttttccc 3000
tgagtgccat cctctcaagc tacaanaatt ccactcttta tatccctttt gcttctacig 3060
ctctgatttt gtgtacacag tactctctgc cactgaaat ttgaaatat ttgtgtttta 3120
gatttgcaaa aaatgaata taggtcagta ctcaatgga tttttaagat aaatcacctg 3180
tgatgaataa tttgaactc gagacgaata caacttttaa aaattgtttt taaaaataga 3240
cttttttttt taggcagttt gtaggttaac aganaaatg agagaaagat agagatttcc 3300
ttttctccct gacaaagccc tcaacagcct cccaggtcat cagtatcctg caccacaatg 3360
tgacatttgt tacaatcaat gaacctactc tgaacatca ttatratcca aagtctcatg 3420
tttcaatcag agtccctct ttgtgttata catgctagag gacaaatata tgatgatag 3480
tatgtatcat tataatcag tatagtttgc ctgcctabaa catctctgc aaataaact 3540
attttaatga aactaaaga agaaatgta tagaatcgt 3581

```

<210> 31
 <211> 1014
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> Incyte ID No: 1832403CB1

```

<400> 31
cccacgcgtc cgcggcgccc cctcgcgcca ggtttggggc ttccaggaca ttctgtatgg 60
cgggggcttg ttccgcgctt gtatcggggg cagggaaccc ggttgcgggg cccacaggcc 120
gggaactttt gcgcgaaggg ctgctggagt tctgtgaacc cgtgtggaag cagctogact 180
ctcacgtaca cgcgcgcaga gagagccagg tagagctccc ggaacaaatt gacaacctag 240
ccacagaact gtgcgcata aatgaggtc agaaaggtgc cctggatctt gacccctatg 300
ttaagaagct acttaatgcc cggcgacgcg ttgtcttggg taacacact ctacagaatg 360
ctcaggaacg actgagacgg cttaaacaca gtgttgcaca ggaacacgcc cgcaggagag 420
caatgctgga ttgcggaatt taccccccgt gctccccagg caataacag algaagctat 480
ggactcagta gcaacagtac tgttccccag ctgccttgtt tcaacagaca tgcagaagatc 540
ctaggagaca gtccccatag accttcagac attaaaaagg gagcgtaca gtttgtttga 600
agcacctcgt cttaaccttt tatgtagggg cccagggaaa cctacacaca gccagaatga 660
ggttcccaaa ggaactacat taattatggc tctgtcttcc ttccacaaat gagctgaggg 720
ctctactttt tttttaagc tgcatacttg aggttaact ccttcaggac tagttaacca 780
gaggggcttc ctttgtatgt taactgcctg gttaaatggg cctggacaga atgctctcta 840
cctgtgactt ctcaatttcc tgtttacact ggggatttgg agggggcagg caaagtcaaa 900
tggaatgacc tctgtccacc cactttttta ttgcactggc ttgaatacag tagcagtgtt 960
gatagaatca ttatttcaa taataactta aaatgataaa aaaaaaaan aagy 1014

```

<210> 32
 <211> 4195
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

<220>
<221> misc.feature
<223> Incyte ID No: 1971747CB1

<400> 32
gcacagactag gccaccccca gccagtcctt gggctggggc gatcccccga gaggctggcc 60
aatggagcga tctccaggag agggcccccag ccccaagccc atggacacgc cctctgctcc 120
ctccgacccc actgacccagc ccccgcctgc tcaagcaaac ccagacccag gttctggggg 180
ccacccctgt ggccttggcg cggcgggtga ggcctggcg gtctgactt catctggggg 240
gcggttgctg gtgctgatac ctgtgtattt ggcggggcga gtggactca gcgtgggttt 300
cgctctcttc ggcctgcctc tctacotggg ctggcgccgg gtccgcagcg agaaagaaac 360
gagccctcga gcagcgaggg agctactgga cgaacagggg agctcactg cgaaaaactc 420
ctatacgagt catcgagagc taactgctct ggtcagcttc ccagacgttg aaagggctga 480
atggctcaat aagattgtgg cccaggtctg gcccttctgt ggcaggtata tggagagct 540
tctggctgaa actgtgcttc cggctgttag gggatctaac ccccatctgc aaacatttac 600
atttacaaga gtggaaactg gtgaanaagg attgcctac attggagtcn aggttccacc 660
aggtcagaga aaagagcaga tcttgcctga cttgaacatc agctatgtag gtgagtgca 720
gatctgctgt gaagtgaaga aatatctttt caaagcagga gtcaaggcca tgcagctaca 780
tggccttttg cgggtgatac tggagccact oattggggag cttccctcg tgggggctgt 840
gtcaatttllc ttcatccgac gcccgacctt agacacacac tggcagggga tgcacacact 900
gtggagatac ccaggaacta gctcactctc tgacacacat atcatggact ccatgtctgc 960
ctctctctgt ttccccaacc gattactggt gcccttctgt cctgaccttc aagatgttgc 1020
tcagttcgtt tcccccttgc ccaggggcat tattcgaatc cacttctgtg ctgtctgagg 1080
gctgagttcc aagggacaaat atgtgaaggg cctgatttgg ggcaggtcag acccatatgc 1140
actgttggtt ttgggtcaacc agacactctg cagtcgtgtc attgagtgag aactcaacco 1200
acactgggga gacactctat aggtgaaggt acagagcagg ctgagtgagg gatttgagg 1260
ggaggtgttc gacaaggatc cagataaaga tgacttctgt ggcagataga agctggatgt 1320
agggagaggtg ttaacaggta cgttctctga tgattgtctt cctctacaag tggggcaag 1380
ccacagttac ttgaggttag aatggctgtc acttttgcga gatgcagaga aactggagca 1440
ggctctacag tggaaattgg gagtctcttc tgcaccagat ccccgctcag ctgcacttt 1500
agttgtctac ctggatcggg cccaggtatc tctctgnaag aaggggaaca aggaacccaa 1560
ccctatggta caactgtcaa ttcaggatgt gactcaggag agcaagggtt tctacagcac 1620
caactgtcaa gtgtgggagg aaggttctcg gttctctcta caagactctc aaagccagga 1680
gctcagatgt caagtgaagg atgtatccag gtcacctgact ttagggagaa tgaagctgac 1740
ctctggccgc ctgctgactg ccccaagaat catctgggaa cagtgggttc agctcaagag 1800
ctctgttcca aactccagac tctatattga actagtcagt aggtactgtt acttggatc 1860
atcagaaata tgcctcccca cgttgcttgg ttgtctgtgt gcttgggagc tggacaagtga 1920
gaatcccccag agagggcagca gtgtggatgc cccacctoga cctgttcaca cgaactctga 1980
tagccagttt gggactgagc atgtgcttgc gatccatgta tttagggccc aggaactgat 2040
tgccaaagac cgtttcttgg ggggacttgg gaagggcagc tcaagccctt atgtcaact 2100
aaagtggca gggagagct tccggagcca tgttggctgg gaagatctca atccccgtg 2160
gaatgaagtt tttagagtgat tcttcaactc agttccaggg caagagctag aggttgaggt 2220
ctttgacaag gacttggaca aggatgattt tctgggcagg tgaataatgo gtctccacc 2280
agttctaaac agtgcttctc ttgataagtg gctgacctcg gaggatgtcc catctggccg 2340
cctgacttgy cgcctggagc gtctccccc cgttccact gctgctgagt tagaggaggt 2400
gctgcaggtg aatagtttga tccagactca gaagagtgcc gactgtgctg cggccctgtc 2460
atccatctat atggagcggg cagaggaact cccgctcoga aaaggcacca agcaactcag 2520
cccttatgtc actctcactg tgggagatag ttctcataaa accaagacta ttctgcacaa 2580
tcaagccctt gtctgggagt agatgtcttc ctctctctc aggaacacac acactggag 2640
cctagagttg caagttcggg gtgagggcac tgggtgtctg ggtctctat acttgccct 2700
ctcagagctc ctctgtctg accagctctg cttggaccgc tggtttcaac tcaagcagtg 2760
tcaagggcag gtgtacttga ggcacagctc agggatctct gtgtccaccg actcgggagt 2820
ggagctcat acagcacagc ctctcatcg ctgagtgaag aacccagagct 2880
ctcgggggga cccctccaca tcaactcttc agccccagag ctccggcagc gctcaacaca 2940
tgttgacagt ccccttgagg ctccagccgg gctctgggc cagggtgaac tgaactctgt 3000
gtaactcagt gaagaacgaa agctgttcag catgttctat ggttgcgggt cctctcgaca 3060
gaatggaggt gatctctctg atccctatgt gtcactgttg ctacttgcag acaggaacgg 3120
aggaaccaa agagagacct caccgaagaa gaggaacctg agtctgaaat ttaatgaacg 3180
gtttgagttg gaaactcccc tggatgaggg ccaagagcga aagctggagt tctctgtcaa 3240
gctcaattcc taactcatgt caagagagcg tgaactgtct gggcaaggtgc agctggacat 3300
agctgagaca gaccttctcc aggggtgtagc cgggtgttat gaactgatgg acaacaagga 3360
caagggcagc tctaggagc tggcgagtcc cagctgactc gctctgtctt cctgctctg 3420
tctctctcca tcaagcctc aatgtgatga gctaaagctc agggctcaag ggcagagcct 3480
gtgctcttca gcccttctac ctaacaggcc catattcggg cctttgcctg accaagaga 3540
agaaacgat gttcccttta ctgcaaggcc ttatctcttc tgggcctctg gggcagggac 3600
ctgagcttgc tgttctctgc ttgtcttcca catgtctc cctctctcc aactctcag 3660
ggcctctctg atctgtgctt ggcaggttgc agcaactaga gtggtattag cttatgcca 3720

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

atcacgcttt ggaaggatct ttttttcttt aactagatgg tcaactcttt cctaccaca 3780
catgggtgug aaggtggaca ggcataactc tccagctgtg agcctcttag actactgcat 3840
taggoaatg ttoagagct caggccccc tttccagttc tttccact gttctcaacc 3900
ctgtccatgaa aattctactg ctttgatggt tggggccagt ctctgttcac tttggaact 3960
gaggagcgtt ggtattctact caagctccca agtagtgga tatcagttt ggagctccta 4020
gctgggtgata cggagagggtc ttggaggtac ttggagcagc agggccattt tttttgccc 4080
agtgcttagg ctgctaactc actgactaga aattaatctg gtactttaca gttttgcaac 4140
aaccttgcca agccactgga tcttacatta aacatcatat tcaaaaaaaa aaaaa 4195

<210> 33
<211> 3343
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Misc_Feature
<223> Incyte ID No: 2285348C31

<400> 33
gaaaaagaca aagatgatct ggggcoctgac agattctcaa cactcacaga tgatcccgcc 60
cctagactca gtgcaaaagc tcaagtggtc gaggatattc tggacaata caggaaatgcc 120
atcaaacgga ccagcccccag tgatggagca atggcaaaact atgaaagtac agaggttatg 180
gggtgatggtt aaagtgcaca tgattctccc cgtgacgaag cactgcagaa catctcggt 240
gatgatctcc cagactctgc aagccaaagca gcccccccgc aggtattcagc tttctcttac 300
agagatgcaa aaaaagaact gaggctctgt cttgtctctg cggactctgt tgccttccca 360
gtgctgaccc attcaacaaag gaattggttta ccagaccaca cagaccacca agcaaatgaa 420
attgtatgct tcttaaaagt tcaaatagct gaagcaatta atttacaaga taagaatcta 480
atggctcaac ttcaggaaac aatggcctgt gtgtgcggtt ttgataatag gacttgtagg 540
aaactgtctg ctctgattgc tgagactac agaaaaagag ccccatatat tgccttatct 600
aactgttctc gacaaggact acagaccaca caggtccacc tggaaaggct attgcaaga 660
gttttcgggg acaaaagaagt ggcacatcga tactttacca ctgtctgtgt gagattactg 720
cttgagagca aagaaaagaa gatcagggaa ttcattcaag actttcagaa actcacgca 780
gctcagacta aaactgtctca ggtagaagat ttctctcagt ttctttatgg tgcacaggcc 840
caggatgtca tatggcaaaa cgcaggtgaa gaaatggcto cagabgocaa gctgycatt 900
gagcgaaagc tgatgaaccg gattttcaag ctgcctctct accctaata agatggggaa 960
aatcttgctg accaggttct tcatgaacat atccagagat tgtctaaagt agtgactgca 1020
aatcacagag ctcttcagat accagaggtt tatcttcagag aagcaccatg gccatctgca 1080
caatcagaaa tcaaggacat aagtgtttat aaaaaccccc gggacaaggt gcagtgcatc 1140
ctgagaatgt gctctacgat tatgaacctc ctgagcctgg ccaatgagga ctctgtccct 1200
gggctggatg actttgttcc ttgttgggtg ttgtgttga taaaggcaaa tccacccctgt 1260
ttgtgtgata ctgtgagata tatcagtagc ttctttagca gctgtctctc tggagaggag 1320
tctctattgt ggtatgagtt ccaagcaaga gtgaattca tttaaaccat cgaatgacga 1380
aagtgcacaa gaccaaagcc cacaagagca gcaagactgt aatcagacaa acagatctct 1440
gagaaggtgc atcagctgct ttgaaggctg aggatgtttt tgtatgata tgcacagcat 1500
caggcctttt aaagcagatc tttaactaac aggttaatga gctaacaagc aggttctctc 1560
gtctttgggc tcttctcttt ctgagttgca tattctattt tctgtctccc agtagagac 1620
tactactaca aaaagggacc acatttttca agtattttta agtataaaaa acaaaacaaa 1680
aatctcttag gaattgtcta gacctccatt ctggallcc ctttcttcc ttttatttta 1740
aaaaagaaac gtacccctct tttaaatggt ttcttaccat taatgagcat ctactgaaaa 1800
gaaggtatga gtgcactga ggaatgaat agtggtgctg tagtggctt attctaat 1860
aaactcaact aaattgaaay ctaagagga aatgtaata taatatatat tbatattga 1920
tgtaatatgg acatctgcag attctataa acaagagcta ttgctgtag taggtgtgta 1980
catactgtct tgtgaatggt ttctctgac aaatttaag ctgagcttaa aagcaaaaaa 2040
caaaaagtag acagaatat ttattcaaat gtaatacagt ttattgaact tcttaggtat 2100
ggagtttgat ggaacagggt gcocttaaty agtgtgaag tcaactaagt acttagacat 2160
ctcacctggt aagtttgtga gccctgaatta ggaatagac tgattacat acatgaata 2220
aaaaggcaaa ctggttagct catactctat ggtgttctct cctctcgaa ataatatct 2280
gcaagaatcc cagacagagc tcttcaaaa ccttlaattg taatatattt ttgatgata 2340
ttcacattga atgcacagac caagaattca gtaaatgtca tttttttaa aactaatttg 2400
tattgtctgc tctagtata caagttttac tagtgataa ctattttaat caacactact 2460
attcttatgg aaaaaaatat ctatttctgc aggttttgtt gcocttaatt cctctctctg 2520
aaaaaagtc tgtgttttca tagtttggtt tgcattgtat atcaataatt aatcaggaa 2580
gggttttgtt gcoctgaanaa ttggccatgg aggcacacca aagcttcaag cacagctct 2640
gtacatgggc catcactgtc tgggttcaat tctgtgtgtt cctaaacaca tttagctgt 2700
tttttaacaa actcagcccc alactcagat cctgttgtgt tgggagcatt cccaggtatc 2760
ttttaaggga actgtgaaa acagctctgg ccaagagac acggagctc tctgtgtct 2820
gtctctgaga tctttgtgtc tgggaatgac taaagatttt atttttttt ctttgtttt 2880

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

atttttttttt atttttttttt tttagagacag agtctcacc ttgtgcccag gctggagtg 2940
aatgggtggga tctgggtgca ctgcaacctc cactctccag ttcaagtgat tccccggt 3000
agccctcgcg agtagctagg actacaggcg catgtcccca agcccggtca atttttgtat 3060
tttttagtaga aacgggggttt caccatgttg gccaggtatga tccctcaatct cctgacctcg 3120
tgatcccaccc gccctgggctt cccaaagtgc gggattacaa gctgtaacca cctgcccag 3180
ccagaaacta gattttcttt atgcctccac cctctcttat tcaittactt tacaatacca 3240
aaataacaaa ttgcatagga gtgtgggatg tgggtttctgc cttctagaga gagatcagaa 3300
ttaactagtt actatgaaat gtccctttga atgttaggtc aag 3343

```

<210> 34

<211> 2456

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> incyte ID No: 2374186CB1

<400> 34

```

tgagtcaaga aactccggcg cccgcaagcc cggctcgccc cggccctgct ctgttctgcc 60
cggagtagacc gccacttgat cgtgtcctgt gctgaagatg ttccgggac aacagaaaga 120
ggaatttgta agtgctctggg ttccagatcc taggatccag aaggaggact cctggcattc 180
ttacattgac tatgagatat gtattccatc taatagcatg tgttttcaaa tgaaaacatc 240
ctgtgtacga agaagatata gagaattcgt gtggctgagg cagagactcc aaaglaatgc 300
gtgtgtggta caactgccag aactccatc taaaaacctg tttttcaaca tgaacaatgc 360
ccagcaagtg gctcagctgc gccagggtct ggaagatttc ctccagaaag tctacagaa 420
tgcaatttg ctctcagata gcagcttcca cctctctta cagagcctc tgaattcaga 480
agcaattgag gctgtgtgtt ctgggcaagc taagtactct gtggaagag caattcaaca 540
gtttgctta atgaatagac gtttccctga agaagatgaa gaagaaaaa aagaaaaaga 600
tatagattat gattcagaaa gtctcctctc tgggcttggg cacagttagt atgacagcag 660
ttcacatgga tgtaagtaaa atacagctcc gcaggaaatcc tgaaaaaata ttotaatgtt 720
actatcttag gaatagcaaa ttatgtccag tcatagagaa gaaagcttca taataatata 780
ttcttaacta aagctcactg tcatgatgtt aggtatttaa attcttaag atgttgggtt 840
gtttattagt ggtattttta tgtgtctcta ttttaggtta gctctgtgtt aaagctaaaa 900
atcctgtgaa tacaatacta tctttacag gcagcaatta ttggttaaca agtcttggcc 960
ctccaatgaa atgacttaca tgttttaaaa aaccagattg gttttattga atttaaaaag 1020
ataggttaact aagtagcatc taaaatcang atagagcatt ccttttgtta tcaagtggggc 1080
agtttaccac taaacacggt gtatatgttg ttaaacotta tgaagatgaa cagtgtagac 1140
cagactgctt ctctcagata tgttctgtat attttgtgga taactccctt gcactggcaa 1200
aacacatgco ttttgggtgt tagactgaaa tattttaaga gtatttaacc ttccagtat 1260
tctgtttcac gcttagatgg aaatgatct tatgaataga gacatactaa aataagttt 1320
caalcttaga aaaaaatag atagtgctag taacttact tatactgta atattagat 1380
tcagaataac attttcatta tccaaataca gcttcaacaa atggtttctg gagaacaata 1440
atttcttttc actatcattg tataatcagg ttaatgattt atttttgac taattgtgca 1500
atttcttttc actagataac ttccagtatc agtgggtgtt acttattact taactcgag 1560
gaaggatttt ataaagatta ataaatttaa ttttaoccat aaatttccc ataatttga 1620
aaaggatgtc gacttgcata tttcagatat nattattcat ttttaaaaag ccccttttaa 1680
sgcatctact tgaagattgg tataatttc ataaaatgct ttttttttla gttccccaaa 1740
galatcttag ataaactatt ttgaagtcca gatttcagat gaggcaacat tttcttgaga 1800
taattacca agtttatacc atgttgatg gtaaaaaata tttctgtgaa actaaagga 1860
agatattttc agataactag gtaacttgt tgccttggta cccagcttaa tgaagagtg 1920
gcagaggcta ccccaaaaag caacttttc atttccacta agagttaaaa agotattgta 1980
ttattaaaaa gcttttaaaa tgctgttttc aaagaaccaa aagaaaaaaa agotaagaaa 2040
actgagaact aacattaaaa aaattaaatt tagaataaga atgatttctt taattgttcc 2100
tttttttctt tggcttaaaa cattattaaa tttttgtaa tttttgatt taatgtgtct 2160
tagatcctca ttattttaat acaggaaaag aaaagattta gtaatttctt accatgtcaa 2220
tatgtaaagt tcatgccatc caggcattta agagcgatcc tcatcccttc agcaatattgt 2280
atttgagtic acaattttc tgttttaag cagttttgaa aaaaacacac tatgcacaa 2340
attgtcatat tatttttaga tgatgaaca tagcaatcaa aattaatatt atgtaatgcc 2400
taatacttag tatgtaaatg tcaagagatc atttttaact taacgtgaa aaaaaa 2456

```

<210> 35

<211> 2004

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

WO 01/46256

PCT/US00/34919

<221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2476232C31

<400> 35
 cggggagcagc ggtggaggcg gatttccctgg gccgggcct ctggcgctac catggcgltt 60
 ggcagagatc accgggatcc ctacgcgacc tccgtgggccc acctcataga aaaggctaca 120
 tttgctggag ttcagactga agattggggc cagttcatgc acatctgtga cataattaac 180
 actaccacagg atgggccaac agatgcagtg aaagctttga agaaaaggat tcccaaaac 240
 tacaatcata aagaatcca acttaccttg tcaattattg acatgtgtgt gcagaactgt 300
 ggtcccaagt tccagctctc gattgtgag aaggaatttg ttaagagaa tttagttaag 360
 ctactgaatc ccagatacaa cttgcattta gaacttcaga atagaatctt gaatttcatt 420
 aagacttggt cacaggcctt ccaggaggt gtggatgtaa gcgaagtcaa agaagtatac 480
 ctcaacttgg ttaagaaagg cgttcagttt cctccctcag aagcagagggc tgaacacaga 540
 agacaagaga ctgctcaaat ctcatcaaat cctcccaact ctgtccctac tgcaccagct 600
 ctttctctct taattgctcc aaagaactcg actgttcaat tgggtccaga acagatttga 660
 aaactgcaca gtgaatttga katgtgnaa atgaattgtc gagtgtgtc cgcctatttg 720
 atggagaata cctctgggtc tgaaaacat gaagacatag agotttotga gaaactotat 780
 aaaaacagtc gggagatgca ggaagagtc atggacctgc tgggggtgt ggagaacaga 840
 gatgttaact ttgagctaat tcaagtgaaat gaggatttga ataatglat ccttggaat 900
 gagaggttta ctagaacaa acaaggatt ttggagcaaa atagaacaa gaaggaaagc 960
 accaatctta ccagttagcc ttctgcccc tctcaagatc tctctgaact agtcccagct 1020
 ccccgatgac ctaggccac ttggggagaa ctcaacacca tgaataatca actttcagcc 1080
 ttaaatctca gccttccag ttctgatga acaaacacat taataccagc tcttcatca 1140
 cagatgaact tctagcctt ggagaataca gagatacccc cgtttgcccc aaggaccagc 1200
 caaaactcca cctcaagcca cgcataatgat aattttctgg aacattcaaa ttcagtgttt 1260
 ctacagccag ttagcttaca aacatctga gcagacacat caaacccag tctgtccact 1320
 ttgcacagca atcatccagc gatgacaaa agtgatctcc agccacactaa tctatcagag 1380
 gtaattgggt ttgatccctt agctcctgct gtaactacag aagctattta tgaagaatt 1440
 gatgcttccc agcccaagg agctcaaat gatgtgtact gagaagaagc tggatgata 1500
 gctcaactcc acatcaagg tgccaactct ctcaaacgta gactctgtgc agctttgaag 1560
 cctggagagc aatacctacc aacatgtcaa agccatgggt gcaactttct gctataatga 1620
 agatttaata gaataacagt tccagatcaa cactgattcc tgacaacagc atgagattc 1680
 aacagacttt gtttggagca aatactcaat taacaacttca gcagaagaaa aattacttag 1740
 tctctagccc acaaatctta actgcagtg catgtttcac agggcttctt acatttagaa 1800
 atcgtccac agctgtgata agagtgaatt atttactat gaataaattc tgaatagatg 1860
 aaagcataaa atgtgagaaa ctgaatgtat tattcaggaa gaatactgag tgcctcaatt 1920
 taactaaagt tgaatgtaaa agtcaatttg cacttcttta taactctctg gtttagaatt 1980
 atgaaaaata gtggcaggct cgta 2004

<210> 36
 <211> 4019
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2503986CB1

<400> 36
 ccttgcgcac agtctcttgc cggggagtag tagccgggct ggttaactga gtttgagatt 60
 aggaagacttt cagacccttg tgcacaagga ggtgcccgtcc ccagggcagg atgaagttaa 120
 aggaagtaga togtacagcc atgcaggcat ggagccctgc ccgaatcac cccatttacc 180
 tagcaacagg aacatctgct cagcaattgg atgcaacatt tagtacaatt gcttcccttg 240
 agatatttga attagacctc tctgatccat ccttggtatg gaattctgt gccacattct 300
 cctcttctca caggtaccac aagtgtgatt gggggcctba taanaatgat tccaaaggag 360
 atgtctcttg agttctgatt gcaggtggtg aanaatggaa tattattctc tatgatcctt 420
 ctasaattat agctgagac aaggaagtta tgattgccc gaatgacaag catactggcc 480
 cagtgagagc ctgggatgtg aacattttcc agactaaatc ggtagcttct ggtgtaattg 540
 aatctgaat ctacatatgg gatctaaata attttgcaac ccaactgaca ccaggagcca 600
 aaacacagcc gccagagat atccagctga ttgcatggaa cagacagtt cagcatattt 660
 tagcatcagc cagtcccaat ggcggggcca ctgtatggga tcttaggaaa aatgagccaa 720
 tcatcaaggt cagtyaccat agtaacagaa tgcattgttc tgggttggca tggcatctgt 780
 atgttcttac tcaatggttc cttgcctcgg aggtatgacc gttaccagtg atccagatgt 840
 gggatcttgc atttgcttcc tctccacttc gtgtcctgga aaaccatgcc agggggattt 900
 tggcaattgc ttggagcatg gcagatcttg aattgttact gactgttga aaagatgcta 960
 agatctctg ctccaatcca aacacaggag aggtgttata tgaactccc accaacaac 1020
 agtggtgctt cgaatttcag tgggtgcccc gaatacttgc tgtcttaca gctgcttgt 1080

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

tggatggggc tateagtggt tattotatca tgggaggag cagagtggt ttaagaacga 1140
aacaggttga caagcgttca tcatcttttg ggaatcttga tcectttagg acaggacaga 1200
cccttctctc gttacaattl ccacagcaga ctgctcagca tagtalaagig ctgctcttga 1260
agaagccgcc cagtggtatt cgaagccctg ttggtgtctt ttttttattt gggagcaaac 1320
tgggtcagtt tgagaatgtc agaattgcct ctcatcaggg agctgagcag cagcagcagc 1380
agcaccatgt gttcatltag caggttgtta cagaaaagga gttcttcago cgtatcagcc 1440
aacttcagca ggtgtgtcag tcacaaggat ttatcaatta ttgcaaaaaa aaatttgatg 1500
cttctcagac tgaatttgag aaaaatgtgt ggtccttttt gaaggttaac tttgaggtg 1560
attctctggg aaaaatcctt gaactcttag gatacagaaa agaagatcta ggaagaaga 1620
ttgcttttgg ctggaacaaa gtggatggag ccaatgtggc tcttaagac ctgacacag 1680
tagcagcagc tgaatgggag ggaagccctg ctgctgaaga cagctcttgg ggaagcaca 1740
ttaaagagga aaaaagagaa tctgaatttc taccctctc tggaggaaca tttaatatct 1800
ctgtcagtg gacatttgat ggtttaatta ctacagcttt gctgacgggc aattttgaga 1860
gtgctgttga ccttgtttta catgataacc gcatggcgga tgccattata ttggccatag 1920
caggttgaca agaactcttg gctgaacccc agaaaaata ctgcgcaaaa tcccaagaca 1980
aaattaccag gctcatcact gcagtgttga tgaagaactg gaaagagatt gttgagtctt 2040
gtgattttaa aaatttgaga gaggctttag ctgcagttat gacttatgca aagccggatg 2100
aattttcago ccttctgtat cttttgggaa ccaggttga aaalgaaaga gatagctctc 2160
tgaagactca agcaggtctc tgcatactt gtgcaaggaa tgtagagaaa ttagtgtcat 2220
gttgacttaa agctcaagat ggaagccccc ctgtgacct tcaagatctg attgagaag 2280
ttgtcalcct gcgaagaagt gtgcactca ctcaagccat ggcactagt actgtagag 2340
ttctcttggc tgcgaagatg agtcagttat ccaatttgtt ggcagctcag ggcagttatg 2400
ctgagccttt ggcttttctt cctgacacaa ccaacagccc aaatctatg cagctctgtg 2460
acagactttg tagagacaaa ggaagccctg tagcaggaca tgaatcacct aaatttctg 2520
acgagaacaa cagctctccc aaggtcaggg ctggacaggt tgcgtggcac caccagatgc 2580
cagaggttca aactcaacaa tatlatccc atgggagaaa tctctccact ccgggttca 2640
taalgacagg aaattttaa ccaaatgtg ctggtcagct tccacactct ccaggttca 2700
tgacacacca ggtacacact tatccacaga caagcctta tcaaccagcc cagcgtatc 2760
ccttcggaac aggggggtca gcaatgtatc gaactcagca gctgttgtct cctctacttt 2820
caaacgctta cctcaacacc ccttactat ctctgtctt tctctactt gggcagttct 2880
agctgtacgc agcaacagac caggtctctt caactacctc cagcctgtgt actcttctc 2940
ctctctcccc tctctctgga gcatctctcc agcatgggg accaggagat ccaacatcat 3000
cttcaagctta tgcactgcct ccttgaacaa caggtacact gctctgtgct agtgaagctg 3060
ctggcttcca aagacaggtt cctcagatg gttggaatga ccttccagct ttgaacagag 3120
taaccacaaa gaagagatg cctgaacct tcatgctctc tgttccctc acatcccaa 3180
tcattgaacc gttgggtgac cccagtcac aaatgtctga gcaacagcct tcaagctcag 3240
taccactgtc aagcagttct tcatccac agccacatct tcaagtyggc cagccttcc 3300
atggcgtaca gcaacotctt ggtcaacag gcatgcaccc atcttttca aagcccaata 3360
ttgaagtgcc cccaggggct cctattgga ataccttcca gcatgtgag tctttgcaa 3420
caaaaaaaat tacaagaaa cctattccag atgagcaact cattotaaag accacatttg 3480
aggatcttat tcagcgtgct ctttctcag caacagaccc tcaaaccaag aggaagctg 3540
atgataccag caaacggttg ggtttctgt atgtataact tagggacag acatttctc 3600
caacatcac cagtggttta cacaacatg caagagcat tgaactcga aactactcag 3660
aagatttgac catgcalacc cacatagta gcaacagcaa ctctagtag acctctgct 3720
tcattgcagt tctcaagtt gtctcaccc aggcacataa gcttgggtgc taaaaggaca 3780
gcttctcttc cactcaatct tgcattttt ccaagaaaa atgttaaaa aaaaatttat 3840
aagcatgga ctatgctca ttagcatgtt tgcatagcaa ccagtcagga gcatttcac 3900
tatttctgct gataactca cctagaact gctagaacc ctggtgcttt attttgggt 3960
ttaatctttt gttgcagtg atgattttcc tattctgcaa atagtgcac tccggactt 4019

```

<210> 37
 <211> 1793
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> Incyte ID No: 2596566CH1

```

<400> 37
cgacgcggga cgtgcggcag ttgcaggcga ggaagggagg aatgcgcgtg gctctctggt 60
gtcttccacg ctggttgcga ggtgaagaga tggcgtttgt gaagagtggt tgggtgtctg 120
gacagagtac tatttgaag cgttgaaga agaactggtt tgatctgttg tggatgtgtc 180
acctgatcta ttatgatgac cagactcggc agaatactga ggaataaggtc cactatgcaa 240
tggaatgcat caacatccgc accggggcag aatgtcggga tactcagccc ccggatggaa 300
agtcacaaag ctgcagctc cagattgttt gtctgagatg gaaacaaatt agtcttctgt 360
cagaagagcag agtgatgtg ttggcctgga aatttacct ccaagattct aggaacaaa 420

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

cagcgatagt ggcctctgca gtoatgacg atgagacatc cgtggtttcc tcaacctcac 480
cctaacacgc ctatgctgca ccggcccttg agcagcgtta tggctatgg ccataccggg 540
gtgcgttacc gcccggaact caagttgtct acgctgcgaa tggcgaggcg tatgccgtgc 600
cctaacagta ccatatgca ggcatttatg gaacgcagcc tgcataccaa gtoactatcc 660
gagagcgcta tggagacaac gacagcgacc tggcactggg catgctggca gtagcagcca 720
cgggcatggc ctatagggtct ctatttttggg tcttctcaggg gccccaaggt cttgatgtgc 780
atagcttctg ataaccctgt gtgcataaat atgatttgca gggcatttct gttgtgaca 840
aaagttttta ataactagtt taactattcc tttgaagta gtgatgtcat aattgtacta 900
atccacataa gtaccacaga gaaggggttg aactgtgcta ttttgtcaa atgttgactc 960
tcgggggcca ctggctcatt ccaagactgt tcttgggcaa ctctcagaat actctatttg 1020
agcctaacctg ttgtgaagg catttctctt tttaggttag gtgatgtgct taagggttaa 1080
tttattttca tgttatgcca gtaatatagt gttgtatgcc tattgagtga ttgtggcaag 1140
aaaagctaca gcttctttgc gtttaacttt ttcaaacac agaccagaac tggttgcatg 1200
ttaatttagg agttgtgggt tggtaugctc ccaggtactt ccgagtgcta tgggttgaga 1260
gcccccctcc tgcctctggg ggtccacag gcccttgcca aggcgcatgg ctccaggtga 1320
tggggcacag ccgccttttg aacaatcatg cttcagaaat ctgcctgacc ctacgtctctg 1380
ctgctgctca ctttatctct gatatggctt ggtaggcata cttggagaac atatcccaca 1440
ttaggaattg atttaagcct gtaggttga gggctttaa cctttaaacc ttggagaaag 1500
cggtgtggcg tgggtggctca cgcctgtaac ccaagcactt tgagagaaag aggcggggcg 1560
atccagaggt caggagatcg agccatcct ggttaacag gtgaacccc atctctacta 1620
aaatcacaaa aaattagctg ggcgtgtgtg caggccctg tggctccagc tactctggag 1680
gctgagctag gagaatagt tgacccagg aggcggagct tgcagttagc caagtagtg 1740
ccactgcact tcaagcctggg tgacagagtg agactctgtc tcaaaaaaaaa aaa 1793

```

<210> 38

<211> 4427

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2685253Ca1

<400> 38

```

ctctggcgag acctacggg cctgtctgt gcggcgctg agctgggcca ggaaggctgg 60
agattacttc tctaacagga taccagttt gctccacaaa gcaaatgtc tgcatacaga 120
caaaccccc ttgtgacgg catctctcca aatgaaggga taccatggac gaaggtcaaa 180
atcaggggag aaaaatctgg gactggcccc accgaactca taggcttgac catttttgga 240
cataattgcc tctgacggc agaattggatg tctgcaagta aaatagtatg tggagtggga 300
caagccaaaa atgacaaagg agcattattt gtacccacta agtcagggtg caggagaaac 360
tcaacagctc cttcaagct actcaaacct gagaaatag gaattttgga tcaagtctgt 420
gtgtgggttg atgaatgaa ttattatgat atgcgcactg acaggaacaa aggaattctg 480
cccttctcct taccgtctgc taaccgctt ggcattgaga ttgaanaaag taaattttcg 540
cagaaggact tagaatgct attccatgga atgagtctg attttacag tgaagaattc 600
tcagcgctct ggtatcttat aggaatcac tcaaacacca gttttgagca gctcaaaatg 660
gcagtaccca acctaaagag acagctaac aagaagagtg agggcagcct ggctatgtg 720
aaaggcggtc tcaatcatt cttcgaagca caggatgcc tctcagccat ccatcaaaaa 780
ctagaacag atggaacgga aaaagttaga gcatccatga cgcagaact gaagaattgt 840
ctgaacagag caagtaatac tgcagacaca ttgttcaag aagtattagg tgggaagac 900
aaggcagatt ccaatgaaa tgcctcaat gtgctcage gatttaagtt ctttttcac 960
cttctcttaa atattgaaag gaattattca aagggtgatt atgatttgtt tattaatgat 1020
tatgaaaagg ccaagtcact ttttgggaaa accggaggtg aagttttcaa gaattattat 1080
gttgaagttag aaaoaggat tgaagcttta agagaattac ttctggataa attgcttag 1140
acaccatcaa ctttcatgta ccaaaaacgt tacataaggt acctgtctga ccttcatgct 1200
tctgttgacc ctgcttgga atgcattgga gcccaacaca agtggatcct tcaagctcatg 1260
cacagttgca aagagggcta cgtgaagat ctgaaggta acccaggcct gcaagtcct 1320
atgttggata ttgataatga tacacgtccc tcaagtttgg gccatctcag tcaagacagc 1380
tccctgaaga gggcagcag ctttctagct ggtcgaagc acacgtgag atacaaaact 1440
cccccaagg tggcctttgt tgaanaattg acaaaactg tcttgagca gctgcctaac 1500
ctctggcaac tctggaatc ctacgttaa ggaagcctc tcaagtgagc tgcgtggaag 1560
tcaggccaga ttgaagatc aaagaatgta agccaaagc aaatgattt taagaaatg 1620
attcaggga tctgacact ccgttggaag cttaccgcg gagcctgct tccctcagc 1680
atccgggatg ggaagccaa gcagtacgga ggcctggagg tgaagtgcga gctctcggga 1740
cagtggtctg ctacagccat ccagactgta agacttact atgaatgctt gactgcctt 1800
gaaattccct atgacctgtt acagactatc caggatctca tcttgatct cagagtacgt 1860
tgcgtaatg ccagcttga gccacggcg gaagaataa agagattag tgaanaagaa 1920
gctgggattg ttgcaatga aggaactgac tcttaccat gtcagttga acagtgaac 1980

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

gtgtgttctc tgcagtcact gaaggggggt ctggagtgca agccgggaga ggcagtgct 2040
ttcaaccac ctacaaccac ggggggggtt tgcagtgca agccagtgct 2100
tttatctact gtctgggaca gttaggacc aagcctgctg cagatataga tactacacat 2160
ctctctgttg atgtttcttc cctgacttg tttggagta tccatgaaga ctccagcttg 2220
acccagaaac aggcctcttt gatagtccta agtaattgtt gctatctaga acgtcacacc 2280
ttccataata tgcagaaaca ttltgaaag cacaacttcc aggggaataga aaaaatcaca 2340
caggttagca tggcctcatt gaaagaacta gatcaagac tctttgaaa ttacatcgag 2400
ttgaaagcag atcccatcgt tggctcctta gaacctggaa tttatgcagg atattttgat 2460
tggagggact gctcgtcttc aacagggttc agaaactatt taaagaagc actgtggaat 2520
ataattgocg tgcattgcaga ggtgttccac atttccaaag aactggtccc tgggttacta 2580
tccaggttga tagaagcagt ttctgaagag ctccagtcag tgatgcagtg tgtttcatcc 2640
tccagcaaaa atggagcttt acagcgagga ctggaattct gtgctttgag ggcactgtg 2700
gctgtttacc tgacaaccga aagcaagtca agttttaagc aggttttggg agccctgccc 2760
cagctttcca gtggagcaga taaaaagtta ctggagagc tccgaaaca gtccaagat 2820
agcatgcact tgcagctcac ctgtttccaa gacgttctt caacctgat gaaaaacata 2880
atctctgcca ctataaagaa gtccaggnaa ataacacgta ntaagactgt tcaactctca 2940
agtaacctaa aggtatttgg tgtatlaaac attggtgttg ccaattttct ctctttcttc 3000
ctctgactt cgaaaaattg tgtatcaat ttcaaccaaa atgactctat ctgaaatg 3060
caggaaagtat tttgttttgc attcttacta gatcagatcc tgtatgactt taaaatacat 3120
tttaaaatat attttgcate tccagcagag gttagctgtc gcaagaaagag ctgcttctgc 3180
agggagtttt ctggaatggc gtggcacata ttgaagcatt tctcagtgcc cgttccaggy 3240
aagccaggcc agctccacag acacacggag agactgactg atacagatt tggaaagcta 3300
tgttagacat tttggagctc ttaactgtcc aaactgtaca gctgtgttta aaaccttat 3360
ttcatataaa tggcctlaag ttttctaatt caagcgggtt tttgaaaaa tttatgttct 3420
ccatlaaaat acatatataa actggggtag attattttgt gtccaggtgt ctgtgattta 3480
aouttggttt ttgctatctg attttctatt ttaacagggc taagcagtag cttaactct 3540
cactcaactct taattttgct tgcgtcacta caactgcagc tgtgtcagtc cctgagggccc 3600
tgtgtgttat ctgtgatgga gtgtgaatgt gtaacgggca ctgtgttaca ctctcagtg 3660
ttggcggggc ggtgcagac ttcagggtcc cctaacggaa aggcaggct cccgttggac 3720
ggcaactctc ctgcccgttc ctccagcagc tgaactgttc tgcacttct taccgtgta 3780
aggaatctgc tcaagtactg gaacaaatgt gctgtcacac agtctcttct ctgaaacttc 3840
aggaatgtcc ttggtcaaca ggaatgggga gctgtagacc agcccgatgc aettgcccc 3900
catctcctgc tgaatggctt cactggaata ggttcaggtc accgggactt ctctcagagt 3960
cagcagccca cccactctcc tcaatcgttc gcaatggaaa attttcagag aggaattctc 4020
cttgttagtc gctgtcaggt gttttcaagt ttttctatgg ttatttttaa atctcttttt 4080
tcaatgtcta aaattaatgt cctcatteat gcaagtaatt ttagagcaca gtgtgacct 4140
gtacagbttc cattatttaa aataataaaa tgtgttggtt catltggtgt atggygggac 4200
atcatgttaa ctggaatga aagtttaact tttcacaaat gtgcttgata angctgttaa 4260
gaattgtctt tcttaagtat gttaactgtt gtaacttaact caactgtgag ctgaatttaa 4320
aaactgtcat catgaatgtt tgtgataatt taactatcta ctacagcaca ttcagccaat 4380
aaagaatctg cctttaatgt aagttgtaat ttaactgaaa aaaaaaa 4427

```

```

<210> 39
<211> 1583
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<323> Inctm ID No: 2752252CB1

```

```

<400> 39
gagctgaag ccaggaacat ccgaggagaa gagaagctt ccagccctcc tcccttacc 60
ctggaaatcc agacaccccc acccccaccc tccagtcact ttaagataat tcttttatto 120
gtttgcccga cagaccatgg ctccctttgg aagaacttgg cttaagactc ggcataaaaa 180
cagatctcca actaaagaca tggatccaga agagaaagaa atttgtgttt gggtttgcca 240
agaagagagc ctgtctctgt ggtgtactaa acgcaacacc tctgtgatgt tcatccagge 300
tttgttgag gaacatgagg ctacgtttgg agagaaagca tttctctgtg ggaagccag 360
tgtttactgc atcatagaga agtggagagg ctccagaggg gttcttcttc cactaaactag 420
aatcctgagc ctttgaaaag cgttgggaga tgaagcagcc aatatgcaat ttgttttgtt 480
taagagagat gctttctctc cagttctctt gttgggggaa gctgaagcna aattagtcca 540
aaacacagaa aaattgtggg agctcagccc agcaaaactac atgaagactt taccacccaga 600
taaacaaaaa agaatagtca ggaaaacttt ccgaaaactg gctaaaaatta agcaggacac 660
agttttctat gatcagata atattggagac attagtctat ctgactattt cccaggacca 720
tactattcat cagcaagtca agagaatgaa agagctggat ctggaaattg aaaaagtgtg 780
agctaaagtc catcttgatc aggtagaaga tgaaggagaa aactatgttc aggtgtcata 840
tttaatgccc agtttcaagt aagttgagca aaactagac ttgcagtag aggaaaaaca 900

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```
gactctggag gactcgagcg aagtgatgg aattgaacag ctggaagaa gactgaata 960
ttacgggaata ctacttgata agctctcttc tgaaatagaa aagtggtttg 1020
catggtatata aatgaagatg cggaaagggg apctgcaagt gaactggaaa gctctaattt 1080
agagagctgtt aagtgtgatt tggagaaaag catgaaagct gglttgaaaa tctactctaa 1140
tttgatgtggc atccgaaag agattaaata cagtgaacta ttgottcaga tgaagcaaaa 1200
agaatattgaa ctccctggcca aggaattcaa ttcaactcac attagcaaca aagatgggtg 1260
ccagttaaag gaaaaacagag cgaaggaaatc tgaggttccc agtagcaatg gggagaltcc 1320
tccctttact caaagagtat ttagcaatta cacaatgac acagactcgg acactgggtat 1380
cagtctaaac cacagtcagg acttcgaaac aacagttaga gatgtgtgg tgtgtcaac 1440
atagttcaaa tgggtctctt ctgacctgct tctatgtttt aatgtttgtt taatttaata 1500
ggaaactcaa ttttaatat aactctcaa aaaaatgtaa atcatattgt agtattcaat 1560
agttaataaa aactcgagaa atg 1583
```

<210> 40
<211> 1416
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 3452009CB1

```
<400> 40
gtccggcggg ttacagcgga ggcctaggtg gaagacaggg ggcccgggcc gctgcgtgtt 60
gtccacccaa gatggagttc ctctggggga acccggtcag cacaccagtg gggcagtgcc 120
tcgaaagggc aacagatggc tccctgcaaa gtgaggatgt gaacttgaa atggagatct 180
gtgaactcat caatgagagc gaggaaaggg caaaggatgc caatcgagcc ctgaagaagc 240
ggctcaacgg gaaccggaac tacagagagg tgatgctggc attaacagty ctggagacat 300
ctgtggaagaa ctgtggccac cgtctccaca tctctgtggc caaccagatg ttcactgaca 360
gtgtctgtgt caaanattata tctcccaaga acaacccctc caccaatgta caggacaaag 420
tgcttgctct gatccaggca tgggctgatg ccttccgaag cagtccctgt ctccaccggc 480
ttgtgcacat atatgaggag ctgaagaggga aaggggttga atttcccatg gcagacttgg 540
acgtctctgt tccatcacac acacacacag ggaagtgtcc tgaagtggat ccagctgcga 600
ccatgcacag gtcccaatca cagcaagaga caagtgtctg ttctattcc tgcgcgtc 660
ctgtctctta ctccgcaccc gaggcccccag ctctgagtgf gaotggcccc atcaacagca 720
attcagacaa gattgcacgg ctgcggagtg aactggacgt cgttcagaga aacacaaaag 780
tcatgtctga gatgttaaca gaattggtcc ctggacagga ggattcatct gatctggagt 840
tgctgcagga gctcaacagc acctgtcggg ccatgcagca ggcactcgtg gagctcatct 900
cccgctgtct caatgaggag gtcaccaggg agctgcctga tgtgaacgat gacctcaaca 960
acgtcttctc tcgatacag aggtggggagc cggatttctt ttttttttt tttcccttga 1020
aaagatttgt gccataacag agggatttct tcaataaaca aaggaaagag agggagaggg 1080
agagagatta gagtggaaa atactatca gagaatgtaa ttgttccc gctgcagaga 1140
aaaatgcttc ttgtctctct ggaactgag cagcagaagc agcaggaagt tgaagtgcag 1200
aattagctc tgcctttgt aagctcaggg ctgctctgcc ttcccccact gccccgccac 1260
ccccagccc agggaggggt agcacttggg ggctcttggg cccacagact tctgcaactg 1320
ctcctttgat gatccttga atttgaagag gattaaaggg aaaaaaatc tctagtaaga 1380
aaagagattt cctcttctcc atctgtgaaa aaaaaa 1416
```

<210> 41
<211> 1662
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 4644780CB1

```
<400> 41
cgatgcgcgc ggtcagtggt ccaggtccct tattctgctt tctctctctg ctccctggcc 60
ccccacccc tgagacgggg gtctctcttc taocaggttt tgagtacaag ctacgcttca 120
aaggccacag gctggcatgt cctggggctg gaataccctt ctggagccat catggagagc 180
cactcctggg cctggaggaa gtcgggtgta cgcacatcat gaggaaacgg agtggcgccg 240
tgtggagcag ggcctctctc ccttctctct cctgggaagt agaggtgcag atgaggttga 300
cgggactcgg ggcgcggggg gccacgggca tggcctgtgt gtacaccccg ggcagggggc 360
atgtaggctc tgtccttggg gggctgtggt cgtgggaagg catcgggato tttcttgaat 420
ctccggcaga ggaactcag gacagctctg ccatcctgtg gctggccaga gacgggaca 480
tcccctctga gacgctggg gatggagcta gccaaaggct gggctcctgt cattgggact 540
```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

tccggaaaccc gccacacccc ttccagagcac ggcacacaca cttgggggag aggcctggcca 600
tgtctctttaa cagtggccttc actccacgtg atccagatga tcaigtatc ctgtctctcc 660
tgaccttcag cctgagtgag cccagccacg aggttccccc tccgcccctc ctggagatgc 720
agcagctccg cctggcgagg cagctgaag ggcctggggc aagcctgggc ttgggcacca 780
ggagagatgt aaactcaaaa tccagacttg aagctcaagg agaaggggaa aggtctcttg 840
acctggagga gacgctgggc agacacgcc ggcctctgca ggcctctggg ggtctctcca 900
agcagctggc ccaggctgag agacaatgga agaacgagct ggggccccca ggccaaagcca 960
ggcctgacgg aggcctggcc ctggatgctt cctgcccagat tccatccacc ccaggggagg 1020
gtggccaccc ctccatgtca ctcaataagg actctgcaaa ggtccgggccc ctgctccatg 1080
gacagtgagc gctgtccacg gccctgacag agatgaggga tgcagctgtc cgtatggctg 1140
cagaagccca ggtctctcac ctgcccgtgg gcatgtgagc tcatctctta gactgggacc 1200
acactcctgg cctcctgagc gaggagcttc ggggcccggc gaaggcagca gccaaaggccc 1260
cccggccacc tggccagccc ccaaggccct cctcgtgccc gacgctggcc atctctctgt 1320
tctacctcct cactcagact gtaggcttct tgggtacgt gcaattcagc aggcaggaga 1380
tgaaacagag ccttcaggag tgtctgtcca caggccagct tccctggggt cctgcccacc 1440
acacccccag gggcctgggg attctgagga ggcagcctct cccctggcagc atgctcctgt 1500
gacccacccc agagcctgct ttgcatcact gggaaagcagc cagtgctctg ggtgggggct 1560
tggtcagtat cctctccgtc tgggtgccc actccacgc acactggagc tttcggcatg 1620
ctccacactc gttaaagggt atttccctct caaaaaaaa aa 1662

```

<210> 42

<211> 3387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 4946103CB1

<400> 42

```

ccggctcccg ttttgaaga cccgctcgg cacagccagg ctacgtccgg ccttggggta 60
agccttcggc cgggctgccc cgttagtccc ggcggcgagg gacagacgag ctgacaggca 120
ccagggctcta aggggctccc tcaagtccggc tgcgtctccc acccctgggg tggggcaccg 180
ctcctctctga ccttctcttc cccgthtyle ccgctgagaa aagatgacag caactcagca 240
tgcattacaa agagacattt ttacacdaaa ctgctgagca ttgtgaatgt 300
ctgcaaaagca ggaaaaaaga aaaaagactg ttttttatgt gccacagta caactgaacg 360
ccctgttgca gttaaagttg tcaaaagtaa gaaatccgat aaggggagatt tctacaaaag 420
cgagcttgca tgggcccctc gtagctcttc tgtgttagat gccaaagatg ctatcaaaag 480
aaactctgaa tttgatttac actttgaaaa aatataataa tgggttgcca gcagcactgo 540
tgaaaagaat gcatctattt catgcatctt gaaattgaat cagcgatate tccggagaa 600
aattgatttt gtcaatgtta gctcacagct ttgggaagaa tctgttccaa ggggagaaaa 660
tcagagctgtg acagggggtg atgaagaggt agtagatgaa taccagaggt taatgtcaag 720
agaagacagc gatattgaaa taactgatga aggcctgtga tatgcaatct cgaatgggga 780
agcctttgca gaaaaattgt cccgagagct gcaggtgcta gatggggcta acatccagtc 840
aatcatggca tctgaaaaac aagtcacact cctgatgaaa ttgctagatg aggcctcaaa 900
ggaggttagat cagattgaat tgaactgag cagttatgag gaaatgctcc aaggtgtaaa 960
agaacaaatg gatcagatct ctgaaagcaa ccaactaatt catcttagta acataataa 1020
tgtaaaactc ctatctgaga tagagttcct tgtgaaccac atggacttgg ccaaaaggta 1080
tataaaggcc cttcagggaag gagatcttgc ttcttcacga ggcattggag cctgcaacaa 1140
tgctgtgatg gcccttctgc agtgcabgaa tgtagctctt cgaacaggcc atgactgtct 1200
tctggagtc aaacagcaac agcagagatt cagtgatttg cagagacttt ttgcccggag 1260
actgcccagt cactcaaca atgtttttgt tccacagggc cagcatcaga gttcgtctct 1320
cccctccacc tgtgtctcaa cgggttttac ccaactcaca tccatttccac agagatttcc 1380
tccgattgccc aagctgatgg agtggctaaa gactacagat tatggaaaat atgaaggact 1440
aacaagaat tacatggatt atttatccc actatatgaa agagaaaata aagatttctt 1500
tgaaatttga aagatcaaga tgactggcac aactaaagaa agcaagaagt ttggtcttca 1560
tggaagtctg gggaaattaa ctggatctac ttctagtcta aataagctca gttgtcagag 1620
ttcagggaaat agagatctcc agtcatcttc cctgttggat atgggaacaa tgtctgtctc 1680
tgatctogat gttgcagaca ggcacaaatt tgaaagatc ttltgacagg taclaaagta 1740
actggagccc ctatgtcttg cagaacagga ctctataagt aaatttttca aactaacgca 1800
acatcaaaat atgctctgga ctatggctga agcagagagc ctggatggag gacattatc 1860
acggcaacat aattgtggca caccactgccc tgtttcatct gagaagata tgatccgcca 1920
aatgatgatt aaaaatttct gctgcattga gccagagctg aacaacctaa ttgcattagg 1980
agacaaaatt gatagcttta actctcttta tatgttagtc aaaaatgagc atcatgtgtg 2040
gactgcacaa aatgtggacc ctgctctctt cctagtaact acattgggaa atgttttggg 2100
gactgtcaaa aggaactttg acaaatgcac tagtaaccac ataggccaaa tggaaagagt 2160
aaagatctca aaaaagagta aagttggaat tcttccattt gttgctgaat ttgaagaatt 2220

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

tgctggaactt gcagaatcaa tcttcaaaaa tgcctgagcgt cgtggagacc tggataaagc 2286
atatacaaaa ctatcacagc gagtatttgt taatgtggag aaagtagcaa atgaaagcca 2340
gaagaccccc agggatgtgg ttatgatgga aaactttcac ctatattttg caactctttc 2400
tcgattgaaa atctcatgtc tagaagcaga aaaaagagaa gccaaacaaa aatcacacga 2460
tcaccttcag tottatgtca tttaactttt aggaacaact cttgaaaaac taatacatbt 2520
ctttgaaggt gttgaagctc gcgtggcaca gggcataagg gaggaggaag taagttaaca 2580
acttgattt acaaaacag aacttcgtaa agtcattaa ggttaccctg gaagggaggt 2640
aaaaaaggt ctagataaac tctacaagaa agttgataaa catttatgtg aagagagaga 2700
cttacttoag gtggtgtggc actccatgca agatgaattt atacgccagt atagacatt 2760
tgaaggttg abagtcgct gtatccctgg atctgtgtgt acaatggaat tcaactttca 2820
ggacattctg gatatttgt ccagcattgc acagtcctcc taacacctgt gaagagaga 2880
aagataactg aatgaagcat ttgagtataa cagacactct accaaataac caagcactg 2940
ttttgagac ccagacttaa aattttatgt attatataat ttgagataaa tgggtagtac 3000
catactacaa atatttaaat gcaaaattac caacctatat agcagtttta ttgcccctat 3060
aggttgcata ctacttaag cattoatgtc accataaaat gcccttagca ttctcaaatg 3120
actggtatgg aaattttcct ttattgctta gctgctgtgt tttaggtgtt tgtctcatga 3180
gcantgcatt tggagtctct cagctttcac tacttctctg ttgcttgcta atcatgtaac 3240
tactaaaaata ctgtacaaaa ttgttttttc acactacaaa atgtgtatat ggagagaggt 3300
gtctatgtga tgaatcttgy tgaacttga tttttgagga ctatgtgact agtaataaat 3360
gtgaatanaa ttttcaaaaa aaaaaaaa 3387

```

<210> 43

<211> 1043

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 5562355C31

<400> 43

```

gggggggaca tggacaacgc ggggaaggag cgtgaggcag taacagctgat ggcggaggcc 60
gagagcgag tcaggccctc ccaactcctc ctccgagggc tgtttggagg aasocaaaga 120
atagaaagag ctgtgaaat gtatacaga gctgcaataa tgttcaagat ggttaaat 180
tggagtgtcg caggaaacgc attttgtcag gaagccaaag tcccaatgca gtttcagagc 240
aaacatgact ctgctaccag cttgtggat gctggaatg cttacaacaa gccagatccc 300
caaaagggcta tcaactgttt aaatgcagcc atgcacattt acacagacat gggaggtttt 360
acaattgcag ccaagcacca cattaactatt gcagagatct atgagactga actgttagac 420
attgagagag ctattgcaca ttatgaacaa tctgtcgtat attacaaggy agaagaatcc 480
aacagctcag caaacaagtg tctgtgaag gtggcagcat atgtgcccca tottgagcag 540
taccagaacg ccattgagat ctatgagcag gttggggcaa acacaatgga taatcccttg 600
acgacataca gtcgaaagga ttaactcttc aaagctggcc tctgcaactt catagttagc 660
gagttgaaag ccaagcttgc tcttgagcaa tatgagagca tgtttccagc atttactgat 720
tcaagagaat gtaaatattt gaaaaaactc ctagaagctc atgaagaaca gaacagtga 780
gcttaactcg aagcagtgaa ggaatttgac tcaatacttc gcttgatca gtggctgacc 840
accatgttgc ttgcacataa aaagtccatc caaggggatg pagaaggaga tggayaacata 900
aaatgaatg tttttgtctt tgtgtgcacg agctaactcc tctttagttt tgtcttaggg 960
tcaagtgtac tttatgggat gcttatitaa tggcttaatt ttgttgcata tgaagccagc 1020
ggcctgtgta ttgtttaagc tgg 1043

```

<210> 44

<211> 3207

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 5678824CB1

<400> 44

```

ccggagggtg gagccctggg ccaaaatggc ggcctacctg cagtgggggc gcttcgtttt 60
cttcgacaaag gagctgttga aggaagcgtc gagcaatgat ggggcccgtc ccggggccac 120
acctgcttct ggtccgctg ctccaagtt cctttgcctc cctcctggca tcaactgtct 180
cgactcagcg cgaggagacc tggctcttgg agatatggaa ggcacgatct ggttctgtcg 240
agtttcccta cagcttacag gcttccaaag ctacaaacta cgggtgacac acctgtacca 300
actgaagcag cacaaatatt tggcatctgt tggagaagat gaagagggca tcaacccttt 360
ggttaagatc tggaaactcg aagagagaga tgggtggcaat ccaactgtca ctgaatctt 420

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

ccctgttatt ccaggaacag agccaaactgt tgtatcttgt ttgactgtcc atgaaactct 490
caacttttat gccatttgt ttaacaaatgg cagtggttaca ttgacaacag gaggacatcc 500
ccgggaccgg catagcaaga cccagatttt gcccaagggc aactatccctg taactgggatt 600
ggccttttgc caagcaggaa agacacactca cttgtttgtt gtgacaacag agaacgtcca 660
gtcctatata gtttctggaa aagactaccc tggcttgagg ttggacaccc algtttgtgg 720
cctgccttgc tcagccctaa gtgacccttc tcaggacctg cagttcatctg tggccgggga 780
tgagtgtgtc taactgtacc agcctgatga acgtgggccc tgccttccctc ttgagggcca 840
taagctcatt gcccaactggt ttgagggtca ccttatcatt gctctccctg acccgaaagt 900
ttctcccaag tcagagttta ccagcaggga ttacagagc tccgaccaag agattctaaa 960
cctctatgac ctgtgcaaca agttcaatgg ctatagccac gtcttttggg atgtagtga 1020
tgtcttctgc gagtggggct cctgttactg gctgacgggg gatggggcgg tccacgcact 1080
gacggagagag gacccacaga ccaactgga gatctgttt aagaaagaacc tattttagat 1140
ggcgatlaac ctgtccaaaga gccacatct ggacagtgt gggctggccc agattttcat 1200
gcagtatgga gaccatctct acagcaaggg caaccagat ggggctgtcc agcaatatat 1260
ccgaaccatt ggaagtttgg agccatccta tgtgatccgc aagtttttgg atgcccagcg 1320
cattcaaac ctgactgcct acctgacagac cctgcaccga caatccctgg ccaatgcgga 1380
ccataccacc ctgctcctca actgtctaac caagctcaag gacagctga agctggagga 1440
gttcatcaag aaaaagagtg agagtgaag caactttgat gtggagacag ccatcaaggt 1500
cctccggcag gctggctact actccatgc cctgttatctg gggaggaacc atgcacatc 1560
tgagtgttac ctgaagatcc agctagaaga cattaagaat tatcaggaaag cctctcgata 1620
catgctcaag ctgccttttg agcagggcaga gacaaactg ancgctacg gccagatctc 1680
catgcaccac ataccagagc agcaactca gttgctgnag ggaatttgta ctgattatcg 1740
gcccagcttc gaaaggccga gcgataggga gggccaggc tgcagggcca actctgagga 1800
gttcatcccc atctttgcca ataaccggcg agagctgaaa gcttctctag agacatgag 1860
tgaagtgcag ccagactaac cccaggggat ctacgacaca ctctctgagc tggcagatga 1920
gaaactgggc cagcagagag atccacaggt caaagagaaag ctccacgcag agtgcattc 1980
cctgctgaag agtggtcgt tctggaaggt ctltgaacag gccctggctc tggcagagat 2040
gacagacttc caggatggtg tctttactc ttatgagcag ggaagctgt tccagcagat 2100
catgcactac cacatgcagc acgacagta ccgacaggtc atcagctgt gtgacgcga 2160
tggggagcag gacccctctc tttgggagca ggcctcagc taactcgtc gccagggaga 2220
ggactgcaag gattatgtgg cagctgtctc caagcatatc gagaacaaga acctcatgcc 2280
aactcttcta gtggtgcaaga cctgggccc caactccca gccacactc cctcatcag 2340
ggactactct gtccaaaaac tacagaaaca gaggccagag attgcacagg atgagctgag 2400
ggtgcggcgg taccgagag agacacaccc tatccgcag gagaaccag agtccaggg 2460
cagctctaaag attttccaaa agacccaagt cagcatctgt aaccagtgtc tggagtgtcc 2520
ctcagtcac ttctgtgtg gccactcct ccacaaacac tgccttgaga gttactcgga 2580
aagtgtatgc gactgcccc cctgctctcc tgaaaaacgg aaggtcatgg atatgactc 2640
ggccacagaa cagaaacgag atctccatga tcaattccag catcagctca ggtgtccaa 2700
tgacagcttt tctgtgatt ctgaactact tggagaggt gttttcaaa aattgactct 2760
gctgaacgac cctccacag ccagactgac ctccagcctg gaggctgggc tgcacgcga 2820
cctactcatg cactccagga ggggcaetta agcagcctgg aggaagatgt gggcaacagt 2880
ggggacagca gagaacagac acaatgggac ctggggggg gttaacaga aggtgtggt 2940
aactgcccag ggtccactc tcatctaatg tcaacgcct cagaactaaa gggccttct 3000
ttctcctgac ttctatttta gtcagcttgc catcctctc ctccactag agtctagatc 3060
attccagatc agtgggggag ggcacctcag caactctga gtgtggacaa tagctgctt 3120
ctctctatc caagagcacc aggcctgtgtc tgggtctctg ctctcagagt ctataataa 3180
aagatatata tgattaaaa aaaaaaa 3207

```

<210> 45
 <211> 2356
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyta ID No: 5870962CB1

```

<400> 45
ctgaactaac ccttaaccc ttgggagttc gtgtgcagca gtgagtggag ctgcacccgg 60
gctgaantgg gacgtccccc tatggcactg gctcaggag ctantctaaa gagaagatat 120
tttgggggag acattcttgg ttgcccccctc attgcatctt gactaattgc ttccaaactcc 180
ggggggttcc agggacaalc tcaattgtct ttctcttcca agggctagcc atgttaacca 240
tttgttaatt totctgaac agatcaagca aaagttagata atcagccaga agaattagty 300
cgtagtgtgt aagatgatga gaaaccagat cagaagccag ttacaaatga atgcgtacca 360
agaaattcca cagtgcctac acaacctgat aatccatttt ctacacctga caaactcaaa 420
aggaatgaga agtctgttcc agcattcttc caagatgagg tgaatggcag tctgagaggt 480
gtttatagtg gagaatttgg caactcggaa gtaaaaggaa atattcagtt tgcattgaa 540

```

WO 01/46256

PCT/US00/34919

```

tatgtggagt cactgaagga gttagcatgt tttgtggccc agtgttaagga cttagaagca 600
ggggatgtaa aaaaacagcg tttagaccga tatgtaaagg cctatttgcg accagacaaa 660
ggcaaaatgg gcaagagaaa aacactcgta gtgaagaaaa ccttgaatcc tgrgtataao 720
gaataatcgc ggtataaaat tgaaaaacaa atcttaaaaga cacagaaatt gaacctgtcc 780
atttggcacc gggatacaat taagcgcaat agtttccctag gggagggtga acttgatltg 840
aaacatgggg actgggtata caaacagaaat aaacaattga gatggtaccc tctgaagcgg 900
aagacagcac cagttgocct tgaagcagaa aacagaggtg aatgaanaat agctctccag 960
tatgtccag agcctagccc tggtaaaaag ctccctacaa ctggagaagt gcaacatctg 1020
gtgaagaaat gcttgtgctt accactgcta aggggaagtc atctaaatc ttttgttaaa 1080
tgtaccatcc ttccagatcc agtaggaaa agtgcgcaga agacaaagac tgtagggaan 1140
nccaccaacc ctatcttcaa cccactatgt gtgtatgatg ggttcaagcc tgaagatctg 1200
attggaagcct gtgtagagct tactgtctgg gaccattaca aattaaccaa ccaatttttg 1260
ggaggctctc gtattggctt tggacaggtt aaaaattatg ggaactgaag ggaactggat 1320
gaactactct cagagggaagt tgcctctctg gagaagatgg taaactcccc caatacttgg 1380
attggaagca cactgcctct cagaatgctt ttgattgcca agatttccaa atgagcccaa 1440
attccactgg ctccctcact gaaaactact aaaccgggtg aacttgatct tgaatatctg 1500
agtaggtgga caaatatcct caattctcat ctatctgcac taaggaaatc taacagaaat 1560
gtaaaagtca atctgcagct gcttctttga ttacaagggc caagggtatt aatatataca 1620
aattgtgtaa ttgtgactc taattattaa taagatatct gaacaaagta ggaatatgta 1680
atttctgtct ctgcttcaaa gaaaagctgt ccccgagcca ttaacatagg ggtattgtta 1740
agaagcaaaa tgttcttgtt tgcactcatg tgtttcaaac caaatctgt ggaacaggtt 1800
aagagggtct ggtacacctg caggaccttt gttaggttgt ggaanaagtc gcagaagat 1860
actcaagty gacagggaa tggagacaga catcagtgat gataaaaaa aaaaatggag 1920
cttaagaaac tatttactct gtaactctta ataaatatgt gaattcccta ttggggcaat 1980
gagacagaaa ctactgggtt ttctctgctt tgagaaaaa aacagttaaa acaagctcca 2040
aattgtattt agtgcacacc actggccata ggtacaaatc agttgttggc ttgtttgac 2100
ttaattctaa aataggtctc aagcctgtat ttttatgagt ttaatttttt aaaaacctgc 2160
ataatatgta ttgtttttct tataacttta ctatatgaaa gcagcataag agtagtcaac 2220
aacatgtttt gcaacaaagt tttaattaga atgttaagtt ctcaattata ctgttctctc 2280
tatgtatgta aaattttcgt attttgtaaa aacacttaga ataaattatc atttgattta 2340
aattgtatta gaaaat 2356

```

<210> 46

<211> 1034

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2818605CB1

<400> 46

```

gcttttctgt tgttctctt cggaggcggc gatccccgaa ggcgagctga aatacggctg 60
caggctacaa ttgtcagcgg accattatgg atgacaagga gccgaagagg tggccccacc 120
tcagggaacg atgtgtctcg gatgctctct tatttcccca ataccocatt aaacagatc 180
atctgaaggg gatccccaga gctgtctctt atcgtgatct gggggaactg agttcgtt 240
tgctcagcgg ttatgacatc aataagagag acaggaagga aaggaccgcc ctacatttgg 300
cctgtgtcac tggccaaacg gaaatggtac atctcctggc gtccagaaga tgtgagetta 360
aacctctgga cgttgaaagc aggaacacct tgaatcaagg tgaacaactg aggcaggaag 420
cttgtcaac tcttctgctg caaaatggcg cgaatccaaa tattacggat gcttttgaa 480
ggaatgctct gcaatagcct gtgtataatg aagatacaca catgatagaa aaacttctt 540
cacatggtac aatatttgaa gaatgcagca aggtataggt caacacatgt tatttcaaa 600
ctatctgaaa tgcattttat ttaacattga caatgttaag ggtcaatttt tcatatttgg 660
aagctcnaac atctcttgaa tgaatatatt tgaatatgcc ttaactgtct aagattttac 720
tttaaatatt ggaactttta aagaagcatt atagggaaac gcttttttct atgcaattat 780
ggttaataac tataaaaaa aatgaattac aataaattta taattcaatg caactgaatt 840
tgggaaggtt aatagtaag ttgttttcca cttaattact tttttttcaa tcaagtga 900
tggaacaggg aaagttaaat tgtcccttat aatatggctt tattttaaat gtcaagaa 960
attaaagaa ttccacaata atgtacatgt ttgtgtctgt gacaagtggt gtatgtgaag 1020
gtgatttcat ctga 1034

```

【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 June 2001 (28.06.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/46256 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/47, 16/18, C12Q 1/68, A01K 57/00, A61K
38/17, G01N 33/68

(21) International Application Number: PCT/US00/4919

(22) International Filing Date:
21 December 2000 (21.12.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/172,968 21 December 1999 (21.12.1999) US
60/172,066 23 December 1999 (23.12.1999) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier applications:
US 60/172,968 (CIP)
Filed on 21 December 1999 (21.12.1999)
US 60/172,066 (CIP)
Filed on 23 December 1999 (23.12.1999)(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): TANG, Y., Tam
[CN/US]; 4240 Ramwick Court, San Jose, CA 95118 (US);
YUE, Henry [US/US]; 826 Lois Avenue, Sunnyvale,
CA 94087 (US); BANDMAN, Olga [US/US]; 366 Anna
Avenue, Mountain View, CA 94043 (US); HILLMAN,
Jennifer, L. [US/US]; 239 Monrow Drive #17, Mountain
View, CA 94040 (US); BAUGEN, Mariah, R. [US/US];
14244 Santiago Road, San Leandro, CA 94577 (US); LU,Dyung, Aina, M. [US/US]; 233 Coy Drive, San Jose, CA
95123 (US); AZIMZAI, Valda [US/US]; 5518 Boulder
Canyon Drive, Castro Valley, CA 94552 (US); YANG,
Jenning [CN/US]; 7125 Bark Lane, San Jose, CA 95129
(US); BURFORD, Neil [US/US]; 105 Wildwood Circle,
Durham, CT 06822 (US); AU-YOUNG, Janice [US/US];
233 Golden Eagle Lane, Brisbane, CA 94005 (US);
REDDY, Roopa [IN/US]; 1233 W. McShiney Avenue #3,
Sunnyvale, CA 94086 (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, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
NZ, NG, NI, NO, NU, OV, PE, PG, PH, PK, PL, PT, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, SN, SR, ST,
SZ, TD, TF, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
27 December 2001For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/46256 A3

(54) Title: VESICLE TRAFFICKING PROTEINS

(57) Abstract: The invention provides human vesicle trafficking proteins (VETRP) and polynucleotides which identify and encode VETRP. 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 expression of VETRP.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 99/34919
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 A01K67/00 A61K38/17 G01N33/68		
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 C07K		
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) EPD-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 46744 A (FIORE PIER PAOLO DI ;ISTITUTO EUROPEO DI ONCOLOGIA S (IT); PELICCI P) 22 October 1998 (1998-10-22) page 2 -page 4; claims 1-6,10,27,28,32,33; figures 3,7 page 10 page 13 page 19 -page 20 page 22 & DATABASE EMBL 6 January 1999 (1999-01-06) SALCINI A.E. ET AL.: "human Rab-R protein" Database accession no. AF015042 the whole document --- -/--	1,3, 6-16,18, 19,22, 25-28
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Specify categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier documents but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on (priority claims) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 April 2001		Date of mailing of the international search report 20.07.01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 581's Patentamt 2 NL-2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 691 mtl Fax: (+31-70) 340-0016		Authorized officer van Heusden, M

Form PCT/IS/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/34919

C/(Continuation): DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SALCINI A.E. ET AL.: "Binding specificity and in vivo targets of the EH domain, a novel protein-protein interaction module" GENES AND DEVELOPMENT, vol. 11, 1997, pages 2239-2249, XP002073498 page 2245 ---	1,3, 6-16,18, 19,22, 25-28
X	DATABASE EMBL, 22 June 1999 (1999-06-22) HILLIER ET AL.: "WashU-NCI human EST project" Database accession no. A1880211 XP002165492 the whole document ---	3,12
A	SCHIMMOLLER F. ET AL.: "Rab GTPases, directors of vesicle docking" J. BIOL. CHEM., vol. 273, no. 35, 28 August 1998 (1998-08-28), pages 22161-22164, XP002165490 the whole document ---	1-19,22, 25-28
P,A	WATERS M.G. AND HUGHSON F.M.: "Membrane Tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways" TRAFFIC, vol. 1, August 2000 (2000-08), pages 588-597, XP002165491 the whole document -----	1-19,22, 25-28

Form PCT/IS/H/210 (second page of second sheet) July 1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 00/34919
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. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claim 18 is 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 composition.	
2. ☒ Claims Nos.: 20, 21, 23, 24 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: see additional sheet	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fees.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☒ 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.: 1-19, 22, 25-28 (partially)	
Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/US 00/34919

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

An isolated polypeptide comprising an amino acid consisting of SEQ ID NO:1, an isolated polynucleotide encoding said polypeptide, an isolated polynucleotide comprising a sequence consisting of SEQ ID NO:24, said polynucleotide in a cell or in an organism and methods of recombinant production of said polypeptide. Methods of detection of said polynucleotide, pharmaceutical composition comprising said polypeptide, method of treating a VETRP-related disease by administering said composition. Methods of screening compounds for binding to or for effectiveness as agonists or antagonists of said polypeptide. Method of screening a compound for altering expression of said polynucleotide. Method of assessing toxicity of a test compound on said polypeptide.

2. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 2 and 25, respectively.

3. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 3 and 26, respectively.

4. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 4 and 27, respectively.

5. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 5 and 28, respectively.

6. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 6 and 29, respectively.

7. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 7 and 30, respectively.

International Application No. PCT/US 00/34919

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

8. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 8 and 31,
respectively.

9. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 9 and 32,
respectively.

10. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 10 and 33,
respectively.

11. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 11 and 34,
respectively.

12. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 12 and 35,
respectively.

13. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 13 and 36,
respectively.

14. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 14 and 37,
respectively.

15. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 15 and 38,
respectively.

16. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 16 and 39,
respectively.

International Application No. PCT/US 00/34919

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 218

17. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 17 and 40,
respectively.

18. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 18 and 41,
respectively.

19. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 19 and 42,
respectively.

20. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 20 and 43,
respectively.

21. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 21 and 44,
respectively.

22. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 22 and 45,
respectively.

23. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As in invention 1 but relating to SEQ ID NO 23 and 46,
respectively.

International Application No. PCT/US 00/34919

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 20,21,23,24

Present claims 20-21 and 23-24 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely having agonist/antagonist activity on the VETRP polypeptide of claim 1. The claims cover all compounds having this characteristic or property. The application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search impossible.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/JP 00/34919

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846744 A	22-10-1998	IT 41970668 A	15-10-1998
		AU 7877598 A	11-11-1998

Form PCT/ISA/21C (latest version) dated June 1996

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 7/06	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 15/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	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	M
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/566	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S,G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ユエ、ヘンリー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 8 7 ・ サニーベイル・ルイスアベニュー 8 2 6

(72)発明者 バンドマン、オルガ

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・アンナアベニュー 3 6 6

(72)発明者 ヒルマン、ジェニファー・エル

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・# 1 7 ・ モンロードライブ 2 3 0

(72)発明者 ボーグン、マライア・アール

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 7 7 ・ サンレアンドロ・サンティアゴロード 1 4 2 4 4

(72)発明者 リュ、デュング・アイナ・エム

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 3 ・ サンノゼ・コイドライブ 2 3 3

(72)発明者 アジムザイ、ヤルダ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 5 2 ・ カストロバレー・ボールダーキャニオンドライブ

5 5 1 8

(72)発明者 ヤング、ジュンミング

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 9 ・ サンノゼ ・ バークレーン 7 1 2 5

(72)発明者 バーフォード、ニール

アメリカ合衆国コネチカット州 0 6 5 2 2 ・ ダラム ・ ワイルドウッドサークル 1 0 5

(72)発明者 オウーヤング、ジャニス

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 0 5 ・ ブリスベーン ・ ゴールデンイーグルレーン 2 3 3

(72)発明者 レディ、ルーパ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 8 6 ・ サニーバイル ・ # 3 ・ ウェストマッキンレーアベニュー 1 2 3 3

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 FB02

4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 CA04 CA09 CA11 DA02 DA05 DA11

EA02 EA03 EA04 FA02 GA11 HA01 HA03 HA11

4B063 QA01 QA18 QQ01 QQ13 QQ42 QQ52 QR08 QR33 QR42 QR55

QR59 QR62 QR74 QR80 QR82 QS05 QS25 QS34 QS36 QX02

4B064 AG01 AG26 CA01 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y AB01 BA01 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 BA01 BA02 BA08 BA22 NA14 ZA012

ZA452 ZA552 ZA592 ZA682 ZA812 ZA892 ZA972 ZB072 ZB112 ZB132

ZB152 ZB262 ZB312 ZB332 ZC332 ZC352

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA00 DA75 EA20 EA50

FA72 FA74

专利名称(译)	囊泡转运蛋白		
公开(公告)号	JP2004500813A	公开(公告)日	2004-01-15
申请号	JP2001547165	申请日	2000-12-21
[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	タングワイトム ユエヘンリー バンドマンオルガ ヒルマンジェニファーエル ボーグンマライアアール リュデュングアイナエム アジムザイヤルダ ヤングジュンミング バーフォードニール オウヤングジャニス レディルーパ		
发明人	タング、ワイトム ユエ、ヘンリー バンドマン、オルガ ヒルマン、ジェニファー・エル ボーグン、マライア・アール リュ、デュング・アイナ・エム アジムザイ、ヤルダ ヤング、ジュンミング バーフォード、ニール オウ-ヤング、ジャニス レディ、ルーパ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P7/06 A61P9/10 A61P11/06 A61P15/00 A61P17/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P37 /08 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21 /02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/04 A61P11/06 A61P15/00 A61P17/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P29 /00 A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P7/06 A61P9/10.101 A61P11/06 A61P15/00 A61P17/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P37 /08 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024 /BA80 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024 /HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ01 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/QR80 4B063 /QR82 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084		

优先权 60/172968 1999-12-21 US
60/172066 1999-12-23 US

摘要(译)

[illegible]