

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506059

(P2005-506059A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47 Z N A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 3
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-512263 (P2003-512263)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月11日 (2002.7.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年1月9日 (2004.1.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/007728
 (87) 国際公開番号 W02003/006493
 (87) 国際公開日 平成15年1月23日 (2003.1.23)
 (31) 優先権主張番号 01116640.2
 (32) 優先日 平成13年7月13日 (2001.7.13)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591032596
 メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ
 ト ベシュレンクテル ハフトング
 Merck Patent Gesell
 schaft mit beschræ
 nkter Haftung
 ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ
 ルムシュタット フランクフルター シュ
 トラーセ 250
 Frankfurter Str. 25
 0, D-64293 Darmstadt
 , Federal Republic o
 f Germany
 (74) 代理人 100123788
 弁理士 宮崎 昭夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 180kDにおけるヒスチジン・フォスファターゼ相互作用タンパク質

(57) 【要約】

PHPIP-180のポリペプチドおよびポリヌクレオチド、ならびにかかるポリペプチドを組換え技術によって製造するための方法が開示される。また、診断アッセイにおいて、該PHPIP-180のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを使用する方法も開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号：1の配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

(b) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列を含んでなるポリペプチド；

(c) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号：2のポリペプチド配列、および

(e) (a)~(d)に記載のかかるポリペプチドのフラグメントおよび変異体
 からなる群から選択される P H P I P - 1 8 0 ポリペプチドであり、上記(a)~(d)の P H P I P - 1 8 0 リガンドは、サバイピンおよびその変異体に対して特異的に結合する能力を有する。 10

【請求項 2】

配列番号：2のポリペプチド配列を含んでなる、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号：2のポリペプチド配列である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

(a) 配列番号：1のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド； 20

(b) 配列番号：1のポリヌクレオチドに対して、少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(d) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、

(e) 配列番号：1の配列または少なくとも15塩基長を有するそのフラグメントを有する、標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件下でライブラリーをスクリーニングすることによって得られる、少なくとも100塩基長の塩基配列を有するポリヌクレオチド； 30

(f) (a)~(e)のポリヌクレオチドのRNA等価体であるポリヌクレオチド；

(g) (a)~(f)のいずれか1つの前記ポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチド配列、および

(h) (a)~(g)のいずれか1つのポリヌクレオチドの変異体またはフラグメントであるか、あるいは前記のポリヌクレオチドに対して、その全長にわたって相補的であるポリヌクレオチド

からなる群から選択されるポリヌクレオチド。

【請求項 5】

(a) 配列番号：1のポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1のポリヌクレオチド； 40

(c) 配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、および

(d) 配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

からなる群から選択される、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

該発現ベクターが適合性宿主細胞に存在する際、請求項1~3のいずれか一項に記載されるポリペプチドの生産が可能なポリヌクレオチドを含んでなる発現システム。

【請求項 7】

請求項1~3のいずれか一項に記載されるポリペプチドを発現している、請求項6に記載される発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞またはその膜。 50

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載されるポリペプチドを製造するための方法であって、請求項 7 に記載される宿主細胞を前記ポリペプチドの産生に十分な条件下で培養して、該培養培地から該ポリペプチドを回収する工程を含んでなる方法。

【請求項 9】

免疫グロブリンの F c 領域と請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載されるポリペプチドとからなる融合タンパク質。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載されるポリペプチドに対して免疫特異的な抗体。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載されるポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定するためのスクリーニング方法であって、

(a) 該ポリペプチド(または該ポリペプチドを発現している細胞もしくは膜)あるいはその融合タンパク質に対する、候補化合物の結合を、該候補化合物に直接的または間接的に結合している標識によって、定量的または定性的に測定または検出すること；

(b) 標識された競合剤の存在下で、該ポリペプチド(または該ポリペプチドを発現している細胞あるいは膜)あるいはその融合タンパク質に対する、候補化合物の結合の競合を測定すること；

(c) 該ポリペプチドの活性化または阻害により発生するシグナルを、該候補化合物がもたらすか否かを、該ポリペプチドを発現している細胞または細胞膜に適合している検出システムを使用して試験すること；

(d) 候補化合物を、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載されるポリペプチドを含有する溶液に混合して、混合物を作製し、該混合物中の該ポリペプチドの活性を測定し、そして、何らの候補化合物をも含有しないコントロールの混合物に対して、該混合物の活性を比較すること、または

(e) 細胞中における前記ポリペプチドをコードする mRNA または前記ポリペプチドの産生に対する候補化合物の作用を、例えば、ELISA アッセイを使用して検出すること

、からなる群から選択される方法と、

(f) 生物工学的または化学的な標準的な手法に従って、前記化合物を製造することとを含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、以降、時に、「新規タンパク質・ヒスチジン・ホスファターゼ・180 kD 反応パートナー(PHPiP-180)」と称する、新たに同定されたポリペプチド、およびかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、診断ならびに、治療において潜在的に有用なアゴニスト、アンタゴニストとなりえる化合物の同定におけるそれらの使用、ならびに、かかるポリヌクレオチドの製造に関する。

【0002】

(発明の背景)

機能的ゲノミクスは、ハイ・スループットおよび現に利用可能な多くの分子生物学データベースから、潜在的な重要性を有する遺伝子配列を同定するためのバイオインフォマティクスの様々なツールに、大きく頼っている。医薬探索の標的として、さらなる遺伝子およびその関連するポリペプチド/タンパク質を同定し、その特定を行うことが引き続き求められている。

【0003】

近年、最初のヒト・タンパク質・ヒスチジン・ホスファターゼ(PHP1)が同定された(Apperson et al. : J. Neurosci. 16 : p6839, 1996)。その酵素はウサギ肝臓抽出物から単

10

20

30

40

50

離され、特徴付けられた。ヒト細胞株では、P H P 1 は細胞質において見られる。C.elegansにおけるオルソログタンパク質の機能の研究では、神経細胞の局在化を示した(Kennedy et al.: Trends Biochem. Sci, 20: p350, 1995) (Kennedy et al.: Trends Neurosci, 20: p264, 1997) (Kennedy et al.: Brain Res. Brain Res. Rev, 26: p243, 1998) (Kennedy et al.: Science, 290: p750, 2000) (Kornau et al.: Curr. Opin. Neurobiol, 7: p368, 1997)。P H P 1 のC.elegansホモログは、感覚運動および咽頭の感音性MC、M3およびI2に位置している。線虫の咽頭とヒトの心臓との類似性は示されており(PNAS 199895、5072-5)、従って、P H P 1 およびリガンドは様々な心疾患性の病気と関連がある。P H P 1 はさらに、骨格筋、腎臓、肝臓および脳において発現している。PHP1を参照とするさらなる参照文献としては以下のものを含む(Omkumar et al.: J. Biol. Chem, 271: p31670, 1996) (Ouyang et al.: J. neurosci, 19: p7823, 1999) (Walikonis et al.: J. Neurosci, 20: p4069, 2000) (Walikonis et al.: J. Neurosci, 21: p423, 2001) (Zang et al.: J. Neurosci, 19: p96, 1999) (Legouis et al.: Nature Cell Biol, 2: p415, 2000)。

10

【0004】

最近の適用においては、P H P 1 とタンパク質の相互作用の研究では、遺伝子配列と、リガンドであり分子レベルではP H P 1 の相互作用パートナーである遺伝子の機能とを定義するためにDNA配列技術と生物情報学(バイオインフォマティクス)とが併用されている。

【0005】

20

(発明の概要)

P H P 1 のタンパク質相互作用の研究においては、P H P I P - 180はまだ公知の相互作用のパートナーとはなっていない。

【0006】

本発明は、P H P I P - 180、特に、P H P I P - 180ポリペプチドおよびP H P I P - 180ポリヌクレオチド、組換え体およびその製造方法に関する。かかるポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、それらに限定はされないものの、自閉症：脂肪酸の基礎代謝にリンクする神経細胞の細胞膜活性の不良(Am J Med Genet. 4; 96(6): 765, 2000)、統合失調症(Psychiatre Q Winter; 65: 287 1994)、周期的に起こる家族性関節炎(Arthritis Rheum; 43:2041, 2000)、バルデー-ビードル症候群(BBS4) (Genomics; 41: 93, 1997)、先天性赤血球異形成貧血III型(Haematologica 85、753、2000)、および悪性線維性組織球種を含む、特定の疾患(以降、「本発明の疾患」と称する)を治療する方法に関連して、注目されている。さらなる形態において、本発明は、本発明により提供される材料を使用して、アゴニストおよびアンタゴニスト(例えば、阻害剤)を同定するための方法、ならびにその同定された化合物を用いて、P H P I P - 180の不均衡に関連する症状を治療するための方法に関する。さらに他の形態において、本発明は、不適当なP H P I P - 180の活性および濃度に付随する疾患を検出するための診断アッセイにも関する。

30

【0007】

(発明の説明)

第1の形態において、本発明はP H P I P - 180ポリペプチドに関する。かかるポリペプチドには、

40

(a) 配列番号：1の配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされる単離されたポリペプチド；

(b) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列を含んでなる単離されたポリペプチド；

(c) 配列番号：2のポリペプチド配列を含んでなる単離されたポリペプチド；

(d) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する単離されたポリペプチド；

(e) 配列番号：2のポリペプチド配列；ならびに

(f) 配列番号：2のポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99

50

の同一性指標を有するポリペプチド配列を有するか、または含んでなる単離されたポリペプチド；

(g) (a) ~ (f)に記載のかかるポリペプチドのフラグメントおよび変異体が含まれる。

【0008】

本発明のポリペプチドは、P H P I P - 1 8 0ファミリーのポリペプチドの一員であると考えられる。それらは、ヒト・タンパク質・ヒスチジン・ホスファターゼ(P H P 1)であるために、P H P I P - 1 8 0は興味をもたれている。ヒト・タンパク質・ヒスチジン・ホスファターゼ(P H P 1)は最近W O 00/52175に記載されており、その特徴とウサギ肝臓抽出物から単離されたタンパク質の該酵素との比較とによると、P H P 1は特異的な脱リン酸A T P - シトレートリア - ゼであり、アセチルC o Aおよびアセチルコリンの生合成に関与する重要な酵素であり、H i s - 764位におけるリン酸化であると知られている。この基質特異性は脂肪酸のアセチルC o Aの調製を介する生合成に役割を果たしている。従ってアセチルコリンの生合成は神経細胞において調節されている。

10

【0009】

哺乳類におけるヒスチジン・リン酸化は、多量体のタンパク質の複合体を介してシグナル伝達をもたらす。ヒト細胞株ではP H P 1 - リガンドは細胞質に存在する。C.elegansにおけるオルソログタンパク質のさらなる研究は独占的な神経細胞の局在化を示すが、しかしながら他の細胞のタイプではその位置の外側においても発現する。従って新しいリガンドは他の疾患および特に様々な心疾患性の病気に関連する。

20

【0010】

C.elegansのP H P I P 1 8 0ホモログタンパク質L E T - 413は、接着接合部の集合を必要とする側底タンパク質として示されている(Legouis et al. Nature Cell Biol. 2000, 2:415)。このことは、l e t - 413は、上皮細胞に輸送する極性化タンパク質に関与するアダプタータンパク質としての役割を果たすことを示唆している。該P H P I P - 1 8 0の生物学的性質を、以降、「P H P I P - 1 8 0の生物学的活性」、または「P H P I P - 1 8 0活性」と称する。好ましくは、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つのP H P I P - 1 8 0の生物学的活性を示す。

【0011】

本発明のポリペプチドには、全ての対立遺伝子形およびスプライス変異体を含む、上記ポリペプチドの変異体もまた含まれる。かかるポリペプチドは、挿入、欠失、ならびに保守的または非保守的であってもよい置換、あるいはそれらの任意の組合せによって、基準のポリペプチドから変異している。特に好ましい変異体は、幾つかの、例えば、50 ~ 30、30 ~ 20、20 ~ 10、10 ~ 5、5 ~ 3、3 ~ 2、2 ~ 1、または1個のアミノ酸が、任意の組合せで、挿入、置換または欠失されているものである。

30

【0012】

本発明のポリペプチドの好ましいフラグメントには、配列番号：2のアミノ酸配列に由来する、少なくとも30、50または100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチド、あるいは配列番号：2のアミノ酸配列から、少なくとも30、50または100の連続したアミノ酸が末端から除去または欠失しているアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチドが含まれる。好ましいフラグメントは、P H P I P - 1 8 0の生物学的活性をもたらす、生物学的に活性なフラグメントであり、類似する活性または改善された活性を有するか、あるいは望ましくない活性の低下したものも含まれる。また、動物、特に、ヒトにおいて抗原性または免疫原性である、それらのフラグメントも好ましい。

40

【0013】

本発明のポリペプチドのフラグメントは、対応する完全長型ポリペプチドをペプチド合成によって製造するために用いることができ；従って、これらの変異体は、本発明の完全長型ポリペプチドを製造するための中間体として用いることができる。本発明のポリペプチドは、「成熟型」タンパク質の形態であってもよく、あるいは、前駆体または融合タンパ

50

ク質などの、より大きなタンパク質の一部であってもよい。分泌またはリーダー配列、プロ配列、精製に役立つ配列、例えば、反復するヒスチジン残基、あるいは組換え生産の間の安定性に利する付加配列が含まれる、付加的なアミノ酸配列を含むことは、しばしば、有益である。

【0014】

本発明のポリペプチドは、何れかの好適な方法、例えば、天然に存在する提供源や、発現システム(下記参照)を含んでなる遺伝子操作された宿主細胞からの単離、または、例えば、自動化されたペプチド合成機を使用した化学合成によって、あるいは、かかる方法の組合せによって、調製することができる。かかるポリペプチドを調製するための手段は、当該分野では十分に理解されている。

10

【0015】

さらなる形態において、本発明は、P H P I P - 1 8 0 ポリヌクレオチドに関する。かかるポリヌクレオチドには、

(a) 配列番号：1のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1のポリヌクレオチドを含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：1のポリヌクレオチドに対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する単離されたポリヌクレオチド；

(d) 配列番号：1の単離されたポリヌクレオチド；

20

(e) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(f) 配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(g) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド；

(h) 配列番号：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；

(i) 配列番号：1のポリヌクレオチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を有するか、または含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

30

(j) 配列番号：2のポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するか、または含んでなる単離されたポリヌクレオチド；ならびに

上記のポリヌクレオチドのフラグメントおよび変異体である、またはその全長にわたって、上記のポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチドが含まれる。

【0016】

本発明のポリヌクレオチドの好ましいフラグメントには、配列番号：1の配列に由来する、少なくとも15、30、50または100の連続した塩基を有する塩基配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、あるいは配列番号：1の配列から、少なくとも30、50または100個の連続した塩基が末端から削除または欠失している配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチドが含まれる。

40

【0017】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい変異体には、スプライス変異体、対立遺伝子変異体、および1つまたは複数の単一塩基多型(S N P)を有するポリヌクレオチドを含む多型体が含まれる。

【0018】

本発明のポリヌクレオチドには、配列番号：2のアミノ酸配列を含んでなり、かつ幾つか

50

の、例えば、50～30、30～20、20～10、10～5、5～3、3～2、2～1、または1個のアミノ酸残基が、任意の組合せで置換、欠失または付加されているポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチドもまた含まれる。

【0019】

さらなる形態において、本発明は、本発明のDNA配列のRNA転写物であるポリヌクレオチドを提供する。従って、

(a) 配列番号：2のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物を含んでなる；

(b) 配列番号：2のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物である；

(c) 配列番号：1のDNA配列のRNA転写物を含んでなる；あるいは

10

(d) 配列番号：1のDNA配列のRNA転写物であるRNAポリヌクレオチド；
ならびにそれらに対して相補的であるRNAポリヌクレオチド

が提供される。

【0020】

配列番号：1のポリヌクレオチド配列は、配列番号：2のポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号：1の配列をコードするポリペプチドと同一であってもよく、あるいは遺伝子暗号の縮退(縮重性)の結果によって、同じく配列番号：2のポリペプチドをコードする、配列番号：1以外の配列であってもよい。

【0021】

20

本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、特に、それらの相同的なポリペプチドおよびポリヌクレオチドと類似する生物学的な機能/性質を有することが期待される。さらに、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、少なくとも1つのPHPIP-180活性を有する。

【0022】

本発明のポリヌクレオチドは、心臓、骨格筋、肝臓、腎臓および脳の細胞中のmRNAに由来するcDNAライブラリーから標準的なクローニング技術およびスクリーニング技術を使用して取得することができる。しかしながら、PHP1は他のヒト組織から単離されることもあり、そこでは低濃度で発現している。該基質特異性はアセチルCoAの調製を介して脂肪酸の生合成における役割を果たしている。従って、アセチルコリンの生合成は神経細胞において調節される(例えば、Sambrook 他、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.(1989)参照)。本発明のポリヌクレオチドはまた、ゲノムDNAライブラリーなどの天然の供給源から取得することもでき、あるいは、周知の、市販の手法を使用して合成することもできる。

30

【0023】

本発明のポリヌクレオチドを、本発明のポリペプチドの組換え製造に使用する際には、該ポリヌクレオチドは、成熟型ポリペプチドのコード配列、それ自体、あるいはリーダーまたは分泌配列、プレ-、もしくはプロ-またはプレプロ-タンパク質配列、あるいは、他の融合ペプチド部分をコードするコード配列などの、他のコード配列と読み枠を合わせた成熟型ポリペプチドのコード配列を含むことができる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にする、マーカー配列がコードされていてもよい。本発明のこの形態の幾つかの好ましい実施態様において、該マーカー配列は、pQEベクター(Qiagen, Inc.)中に提供され、そしてGentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA、(1989) 86: 821~824に記載されている、ヘキサ・ヒスチジン・ペプチド、あるいはHAタグである。該ポリヌクレオチドはまた、転写される非翻訳の配列、スプライシングならびにポリアダニレーション・シグナル、リボソーム結合部位、ならびにmRNAを安定化させる配列などの、非コードの5'ならびに3'配列を含んでもよい。

40

【0024】

配列番号：1のポリヌクレオチド配列に対して、同一であるか、または十分な同一性を有

50

するポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノムDNAに対するハイブリダイゼーション・プローブとして、あるいは核酸増幅反応(例えば、PCR)用のプライマーとして、利用することができる。かかるプローブおよびプライマーは、本発明のポリペプチドをコードする完全長型cDNAおよびゲノム・クローンを単離するために、ならびに、配列番号：1に対して、高い配列類似性、典型的には、少なくとも95%の同一性を有する他の遺伝子(ヒトの供給源に由来するパラログ、ならびにヒト以外の種に由来するオルソログおよびパラログをコードする遺伝子を含む)のcDNAおよびゲノム・クローンを単離するために使用してもよい。好ましいプローブおよびプライマーは、一般に、少なくとも15塩基、好ましくは少なくとも30塩基を含み、そして少なくとも100塩基ではなくとも、少なくとも50塩基を有してもよい。特に好ましいプローブは、30~50塩基を有するであろう。特に好ましいプライマーは、20~25塩基を有するであろう。

10

【0025】

ヒト以外の種に由来するホモログをも含む、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号：1の配列、またはそのフラグメントを有する、好ましくは少なくとも15塩基の標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、ライブラリーをスクリーニングする過程；および前記ポリヌクレオチド配列を含有する完全長型cDNAクローンおよびゲノム・クローンを単離する過程を含んでなる工程によって取得してもよい。かかるハイブリダイゼーション技術は、当業者には周知である。好ましい厳格なハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%のデキストラン硫酸および20マイクログラム/mlの変性させた剪断サケ精子DNAを含んでなる溶液中で、42℃で一晩インキュベーションし、その後、0.1×SSC中で、約65℃にてフィルターを洗浄することが含まれる。従って、本発明にはまた、配列番号：1の配列、またはそのフラグメントを有する、好ましくは少なくとも15塩基の標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、ライブラリーをスクリーニングすることによって取得される、単離されたポリヌクレオチド、好ましくは少なくとも100塩基の塩基配列を有する単離されたポリヌクレオチドも含まれる。

20

【0026】

当業者は、多くの場合において、該ポリペプチドをコードする領域は、5'末端に至るまで完全には伸長していない点で、単離されたcDNA配列は不完全であることもあることを理解している。これは、第1鎖のcDNA合成の際に、mRNAテンプレートのDNAコピーを完成させることができない、逆転写酵素、すなわち、本来、低い「プロセッシング能」(ポリメリゼーション反応の間、テンプレートに結合した状態を維持する酵素の能力の指標)を有する酵素の結果である。

30

【0027】

完全長型cDNAを取得する、あるいは短いcDNAを伸長させるために利用でき、かつ当業者に周知の方法がいくつかあり、例えば、cDNA端の迅速な増幅(RACE)方法に基づく方法がある(例えば、Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998~9002, 1988 参照)。例えば、Marathon(商標)法(Clontech Laboratories Inc.)で例示される、この技術の最近の改良は、より長いcDNAの探索を著しく簡単としている。Marathon(商標)法では、選択された組織から抽出されたmRNAと、その両端に連結された「アダプター」配列とから、cDNAが調製される。その後、遺伝子特異的なならびにアダプター特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの組合せを使用して、cDNAの「失われている」5'端を増幅するために、核酸増幅(PCR)を実施する。その後、「ネスティッド(入れこ型)」プライマー、すなわち、増幅産物の内部にアニーリングするように設計されたプライマー(典型的には、アダプター配列においてさらに3'側にアニーリングするアダプター特異的なプライマー、および既知の遺伝子配列においてさらに5'側にアニーリングする遺伝子特異的なプライマー)を使用して、PCR反応を繰り返す。そして、この反応の生成物をDNA配列決定によって分析することができ、また、完全な配列を与えるように、既存のcDNAに該生成物を直接結合させる、あるいは、5'プライマーの設

40

50

計のために新しい配列情報を利用して、別途に完全長のPCRを実施することのいずれかによって、完全長型のcDNAを構築することができる。

【0028】

本発明の組換えポリペプチドは、発現システムを含んでなる遺伝子操作された宿主細胞から、当該分野で周知の製法によって調製することができる。従って、さらなる形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドの1つまたは複数を含んでなる発現システム、かかる発現システムで遺伝子操作されている宿主細胞、ならびに、組換え技術による本発明のポリペプチドの製造に関する。無細胞翻訳システムもまた、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用して、かかるタンパク質を製造するために使用することができる。

【0029】

組換え製造のために、宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドに対する発現システムまたはその一部を取り込むように、遺伝子操作することができる。ポリヌクレオチドは、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986)及びSambrook et al.(前述)などの、多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている方法によって宿主細胞中に導入することができる。ポリヌクレオチドを宿主細胞中に導入する好ましい方法には、例えば、リン酸カルシウム・トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、スクレイプ負荷、パリスティック導入または感染が含まれる。

【0030】

適当な宿主の代表的な例には、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、大腸菌、ストレプトミセス属ならびに枯草菌細胞などの細菌細胞；酵母細胞やアスペルギルス属細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエ(Drosophila) S2細胞やSpodoptera Sf9細胞などの昆虫細胞；CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293ならびにBowesメラノーマ細胞などの動物細胞；および植物細胞が含まれる。

【0031】

非常に多様な発現システムを使用することができ、例えば、染色体、エピソームおよびウイルスに由来するシステム、例えば、細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、バキュロウイルス、パポウイルス(SV40など)、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、偽狂犬病ウイルスやレトロウイルスなどのウイルスに由来するベクター、ならびに、コスミドやファージミドなどの、プラスミドおよびバクテリオファージの遺伝子エレメントから誘導されたものなどの、それらの組合せに由来するベクターを使用することができる。該発現システムは、発現を生じさせるとともに、調節をする制御領域を含有してもよい。一般に、宿主内において、ポリペプチドを生産するためのポリヌクレオチドを維持、増殖、または発現させることが可能である、システムまたはベクターはいずれも使用することができる。適切なポリヌクレオチド配列は、例えば、Sambrook et al.(前述)中に示されているものなどの、周知で慣用の手法種々のいずれかによって発現システムに挿入することができる。適当な分泌シグナルを、小胞体の内腔、ペリプラズム腔または細胞外環境への翻訳タンパク質の分泌を可能にするために、所望するポリヌクレオチドに組み込むことができる。これらのシグナルは、該ポリペプチドに対して内因性であってもよく、あるいは異種のシグナルであってもよい。

【0032】

スクリーニング・アッセイにおいて使用するために、本発明のポリペプチドを発現させる際には、該ポリペプチドは細胞の表面で産生されることが、一般に好ましい。この場合、スクリーニング・アッセイにおいて使用するに先立ち、細胞を集菌してもよい。該ポリペプチドが培地内に分泌される場合には、該ポリペプチドの回収および精製を行うため、培地を回収することができる。細胞内で産生される場合には、ポリペプチドを回収する前に、細胞を予め溶解しなければならない。

【0033】

10

20

30

40

50

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈澱、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロース・クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、アフィニティー・クロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィおよびレクチン・クロマトグラフィを含む、周知の方法によって組換え細胞培養物から回収および精製することができる。最も好ましくは、ハイ・パフォーマンス・液体クロマトグラフィが精製のために使用される。該ポリペプチドが、細胞内合成、単離および/または精製の間に変性する際には、周知のタンパク質のリフォールディング方法を、活性な立体配座を再生させるために使用することができる。

【0034】

本発明のポリヌクレオチドは、関連する遺伝子における変異の検出を通して、診断試薬として使用することができる。cDNA配列またはゲノム配列において、配列番号：1のポリヌクレオチドによって特定され、また、機能不全に関連している、変異体型遺伝子の検出は、その遺伝子の過少な発現、過剰発現、あるいは変更された空間的または時間的な発現に起因する、疾患または疾患に対する感受性の診断に付加、あるいは、確定させることができる診断ツールを提供する。遺伝子に変異を有する個体は、当該分野で周知な様々な手法によって、DNAレベルで検出することができる。

10

【0035】

診断に供する核酸は、対象の細胞、例えば、血液、尿、唾液、組織生検または剖検試料などから得ることができる。ゲノムDNAを、直接、検出のために使用してもよく、あるいは、分析に先立ち、PCR、好ましくはRT-PCR、または他の増幅技術を使用して、酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAもまた、同様な手順で使用することができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較して、増幅産物のサイズにおける変化によって検出することができる。点変異は、増幅されたDNAを、標識されたPHPIP-180の塩基配列に対して、ハイブリダイゼーションさせることによって同定することができる。完全に一致する配列は、ミスマッチした二重鎖と、RNase消化、あるいは融解温度における差によって、弁別することができる。DNA配列の相違はまた、変性剤の存在下または非存在下での、ゲルにおけるDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化によって、あるいは、直接的なDNA配列決定によって検出してもよい(例えば、Myers et al., Science, (1985) 230:1242 参照)。特定の位置における配列の変化もまた、RNaseならびにS1保護などの、ヌクレアーゼ保護アッセイ、あるいは化学的な切断方法によって、明らかにすることもできる(Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 85:4397~4401 参照)。

20

30

【0036】

PHPIP-180のポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含んでなるオリゴヌクレオチド・プローブのアレイを、例えば、遺伝子変異の効率的なスクリーニングを行うために構築することができる。かかるアレイは、好ましくは、高密度のアレイまたは格子状である。アレイ化技術の方法は、周知であり、一般的な適用性を有しており、また、遺伝子発現、遺伝子連鎖および遺伝子変動性を含む、分子遺伝学における様々な問題を解明するために使用することができる。例えば、M. Chee et al., Science, 274, 610~613 (1996)およびそれに引用されている他の参考文献を参照する。

40

【0037】

異常に、低下または増大しているポリペプチドまたはmRNAの発現レベルの検出もまた、本発明の疾患に対する、被験体の感受性を診断または検出するために使用することができる。低下、または増大した発現は、例えば、核酸増幅、例えば、PCR、RT-PCR、RNase保護、ノーザン・プロットおよび他のハイブリダイゼーション法などの、当該分野で周知の、ポリヌクレオチドの定量方法のいずれかを使用して、RNAレベルで測定することができる。宿主に由来するサンプルにおける、本発明のポリペプチドなどのタンパク質レベルを決定するために使用することができるアッセイ手法は、当業者には周知である。かかるアッセイ手法には、放射免疫アッセイ、競合的結合アッセイ、ウエスタン・プロット分析およびELISAアッセイが含まれる。

50

【0038】

したがって、別の形態において、本発明は、

(a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは、配列番号：1のヌクレオチド配列またはそのフラグメントもしくはそのRNA転写物；

(b) (a)の配列に対して相補的なヌクレオチド配列；

(c) 本発明のポリペプチド、好ましくは、配列番号：2のポリペプチドまたはそのフラグメント；あるいは

(d) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号：2のポリペプチドに対する抗体を含んでなる診断キットに関する。

【0039】

かかるキットの何れにおいても、(a)、(b)、(c)または(d)は、実質的な成分を構成することができることは理解される。かかるキットは、疾患または疾患に対する感受性、中でも、特に本発明の疾患を診断する際に有用である。

【0040】

本発明のポリヌクレオチド配列は、染色体局在化の研究に有益である。該配列は、個々のヒト染色体上の特定位置に対して、特異的に標的化されており、そして、ハイブリダイゼーションすることができる。本発明に従って、関連する配列を染色体にマッピングすることは、それらの配列を遺伝子関連疾患と関連させる上での、重要な最初の過程である。一度、配列を正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上における該配列の物理的な位置を、遺伝地図データと関連させることができる。かかるデータは、例えば、V. McKusick、ヒトにおけるメンデル遺伝(Johns Hopkins大学 Welch Medical Libraryを通してオンラインで利用可能である)中で、見出される。同じ染色体領域にマッピングされている、遺伝子と疾患と間の関係は、その後、連鎖解析(物理的に隣り合う遺伝子の同時遺伝)を通して、同定される。ゲノム配列(遺伝子フラグメントなど)に関する、正確なヒト染色体上の局在化は、放射ハイブリッド(RH)マッピングを使用して決定することができる(Walter, M., Spillet, D., Thomas, P., Weissenbach, J.およびGoodfellow, P., (1994)、ゲノム全体の放射ハイブリッド・マップを構築するための方法、Nature Genetics、7、22~28)。多数のRHパネルを、Research Genetics (Huntsville, AL, 米国)から、例えば、GeneBridge4 RHパネル(Hum. Mol. Genet., 1996, Mar; 5(3): 339~46、ヒトゲノムの放射ハイブリッド・マップ。Gyapay G., Schmitt K., Fizames C., Jones H., Vega-Czarny N., Spillet D., Musele D., Prud'Homme J. F., Dib C., Auffray C., Morissette J., Weissenbach, J. およびGoodfellow, P.N.)を入手可能である。このパネルを使用して遺伝子の染色体上の位置を決定するためには、RH DNA上の関心のある遺伝子から設計されたプライマーを使用して、93回のPCRが行われる。これらのDNAのそれぞれは、ハムスターのバックグラウンド(ヒト/ハムスターのハイブリッド細胞株)中に維持された、ランダムなヒト・ゲノム・フラグメントを含んでいる。このようなPCRは、目的とする遺伝子のPCR産物の存在または非存在を示す、93のスコアをもたらす。これらのスコアは、既知の位置のゲノム配列に由来するPCR産物を使用して作製されたスコアと比較される。この比較は、<http://www.genome.wi.mit.edu/>において行われる。本発明の遺伝子はヒト染色体1p31にマッピングされる。

【0041】

本発明のポリヌクレオチド配列はまた、組織発現の研究に対する有益なツールである。かかる研究は、それらをコードするmRNAを検出することによって、コードされたポリペプチドの組織内の発現パターンに関する指標を与える、本発明のポリヌクレオチドの発現パターンの決定を可能とする。使用される技術は、当該分野では周知であり、また、cDNAマイクロアレイ・ハイブリダイゼーション(Schene et al., Science, 270, 467~470、1995およびShalon et al., Genome Res., 6, 639~645, 1996)などの、格子上に配列されたクローンに対する系内・ハイブリダイゼーション技術、ならびにPCRなどの塩基増幅技術を含む。好ましい方法は、Perkin Elmerから入手可能なTAQMAN(商標)法を使用する。これらの研究による結果は、生物におけるポリペプチドの正常な機能の指標を提供する

10

20

30

40

50

。加えて、mRNAの正常な発現パターンと、同じ遺伝子の別の形態(例えば、潜在的または調節的な変異をコードするポリペプチドにおける変化を有するもの)によってコードされるmRNAの発現パターンとの比較研究は、本発明のポリペプチドの役割、または疾患におけるその不適切な発現の役割に対する有益な見識を提供することができる。かかる不適切な発現は、時間的、空間的または単に量的な性質のものであってもよい。

【0042】

本発明のポリペプチドは、心臓、骨格筋、肝臓、腎臓、および脳の組織において発現される。

【0043】

本発明のさらなる形態は、抗体に関する。本発明のポリペプチドまたはそのフラグメント、あるいはそれらを発現している細胞は、本発明のポリペプチドに対して免疫特異的である抗体を作製するための免疫原として、使用することができる。「免疫特異的」の用語は、抗体が、先行技術における他の関連するポリペプチドに対するそれらの親和性よりも、本発明のポリペプチドに対して、実質的により大きな親和性を有することを意味する。

10

【0044】

本発明のポリペプチドに対して生成される抗体は、慣用的なプロトコルを使用して、該ポリペプチドまたはエピトープ保持したフラグメント、あるいは細胞を、動物、好ましくは、非ヒト動物に、投与することによって取得することができる。モノクローナル抗体の調製には、継代的な細胞株培養物によって産生される抗体を提供する技術のいずれをも、使用することができる。例には、ハイブリドーマ技術(Kohler, G.およびMilstein, C., Nature (1975), 256: 495~497)、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., Immunology Today (1983), 4: 73)、およびEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77~96, Alan R. Liss, Inc., 1985)が含まれる。

20

【0045】

米国特許第4,946,778号に記載されているものなどの、一本鎖抗体を製造するための技術もまた、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を製造する上で応用することができる。また、トランスジェニック・マウス、あるいは、他の哺乳動物を含む他の生物を、ヒト化抗体を発現させるために使用してもよい。

【0046】

上記抗体は、該ポリペプチドを発現するクローンを単離または同定するために、あるいはアフィニティー・クロマトグラフィによって該ポリペプチドを精製するために使用してもよい。本発明のポリペプチドに対する抗体は、また、中でも、本発明の疾患を治療するために使用することができる。

30

【0047】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドはまた、ワクチンとして使用することができる。従って、さらなる形態において、本発明は、その疾患が個体において既に慢性化しているか否かに関わらず、前記動物を疾患から保護するために、抗体および/またはT細胞免疫応答(例えば、サイトカイン産生T細胞または細胞傷害性T細胞を含む)を生じさせるに適する、本発明のポリペプチドを哺乳動物に接種することを含んでなる、哺乳動物における免疫学的応答を誘導するための方法に関する。哺乳動物における免疫学的応答はまた、本発明にかかる疾患から前記動物を保護するための抗体を産生するような、かかる免疫学的応答を誘導するために、*in vivo*で、該ポリヌクレオチドの発現を支配し、かつ該ポリペプチドをコードしているベクターによって、本発明のポリペプチドを送達することを含んでなる方法によって誘導してもよい。該ベクターを投与する1つの方法は、粒子またはそれ以外のものの上へのコーティング物として、所望する細胞中へのそれを促進することによる。かかる核酸ベクターは、DNA、RNA、修飾型核酸またはDNA/RNAハイブリッドを含むことができる。用途によって、ワクチン、ポリペプチドまたは核酸ベクターは、通常、ワクチン配合物(組成物)として提供される。該配合物はさらに、適合するキャリアを含むことができる。ポリペプチドは胃において分解されることもあるため、

40

50

それは、好ましくは非経口的に投与される(例えば、皮下、筋肉内、静脈内、あるいは皮内注射)。非経口投与に好適な配合物には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、ならびに配合物を接種者の血液と等張性にする溶質を含んでもよい、水性および非水性の無菌注射液;ならびに懸濁剤または増粘剤を含んでもよい、水性および非水性の無菌懸濁剤が含まれる。該配合物は、単位用量または多回用量容器、例えば、密封されたアンプルならびにバイアルに入れて提供することができ、また、使用直前に無菌の液体キャリアを添加するだけでよい、凍結乾燥状態で保存することができる。該ワクチン配合物はまた、水中油型システムや当該分野で既知のその他のシステムなどの、配合物の免疫原性を増強するためのアジュバント・システムを含むことができる。投与量は、該ワクチンの比活性に依存し、型どおりの実験によって容易に決定することができる。

10

【0048】

本発明のポリペプチドは、1つまたはそれ以上の疾患状態、特に、既に記載した本発明の疾患に関連している、1つまたはそれ以上の生物学的機能を有する。従って、該ポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定することは有用である。従って、さらなる形態において、本発明は、該ポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定するために、化合物をスクリーニングする方法を提供する。かかる方法は、上記したような本発明の疾患に対する治療および予防目的のために使用することができる、アゴニストまたはアンタゴニストを同定する。化合物は、様々な供給源、例えば、細胞、無細胞調製物、化学的ライブラリー、化学化合物のコレクション、および天然産物混合物から同定することができる。このように同定される、かかるアゴニストまたはアンタゴニストは、場合によっては、ポリペプチド自体の、天然または修飾された基質、リガンド、受容体、酵素など;その構造的または機能的な模倣体(Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, 1(2):5章(1991)参照)あるいは小分子であってもよい。そのような小分子は好ましくは分子量が2000ダルトンより小さく、より好ましくは300~1000ダルトンの間であり、さらに好ましくは400~700ダルトンの間である。好ましくは、これらの小分子は有機分子である。

20

【0049】

該スクリーニング方法は、候補化合物に直接的または間接的に連結されている標識を利用して、該ポリペプチド、あるいは該ポリペプチドまたはその融合タンパク質を表出している細胞または膜に対する候補化合物の結合を単に測定することでもよい。代わりに、該スクリーニング方法は、標識された競合剤(例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト)に対して、候補化合物のポリペプチドに対する競合的な結合の(定性的または定量的に)測定または検出を含んでもよい。さらに、これらのスクリーニング方法では、該ポリペプチドを表出している細胞に適する検出システムを使用して、候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害によって誘起されるシグナルをもたらすか否かを調べることもよい。活性化の阻害剤は、一般には既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、そして、候補化合物の存在による、アゴニストによる活性化に対する作用を観測する。さらに、該スクリーニング方法は、候補化合物を、本発明のポリペプチドを含有する溶液と混合して、混合体を形成させる工程、混合物におけるPHPIP-180活性を測定する工程、および混合物のPHPIP-180を、候補化合物を含有しないコントロール混合物と比較する工程を単に含んでなることでもよい。

30

40

【0050】

本発明のポリペプチドは、従来の低い容量のスクリーニング方法、そして、また、ハイ・スループットなスクリーニング(HTS)形態においても、使用することができる。かかるHTS形態には、十分に確立された、96-、また、最近では、384-ウエル・マイクロ・タイター・プレートの使用のみでなく、Schullek et al., *Anal. Biochem.*, 246, 20~29(1997)に記載されている、ナノウエル法などの開発途上の方法もまた含まれる。

【0051】

既に記載したような、Fc部分およびPHPIP-180ポリペプチドから作製されるものなどの、融合タンパク質もまた、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストを同定

50

するための、ハイ・スループットなスクリーニング・アッセイのために使用することができる(D. Bennett et al., J. Mol. Recognition, 8: 52~58 (1995); ならびにK. Johanson et al., J. Biol. Chem., 270 (16): 9459~9471 (1995) 参照)。

【0052】

スクリーニング技術

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および該ポリペプチドに対する抗体はまた、細胞内におけるmRNAおよびポリペプチドの産生に対する、添加された化合物の影響を検出するためのスクリーニング方法を形成するために使用することができる。例えば、当該分野で公知の標準的な方法によって、モノクローナルおよびポリクローナル抗体を使用して、ポリペプチドの分泌または細胞結合している濃度を測定するために、ELISAアッセイを構築することができる。これは、適当に操作された細胞または組織からのポリペプチドの産生を阻害または増強することができる薬剤(また、それぞれアンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる)を発見するために使用することができる。

10

【0053】

本発明のポリペプチドは、当該分野で公知の標準的な受容体結合手法を通して、存在する場合には、膜結合型または可溶性の受容体を同定するために使用することができる。これらには、それに限定されないものの、ポリペプチドを、放射性同位体(例えば、 ^{125}I)で標識、化学修飾(例えば、ビオチン化され)、あるいは検出または精製に好適なペプチド配列と融合して、そして推定される受容体の供給源(細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液)とインキュベーションする、リガンド結合ならびにクロスリンク・アッセイが含まれる。他の方法には、表面プラズモン共鳴および分光測定法などの、生物物理学的技術が含まれる。これらのスクリーニング方法はまた、存在する場合には、ポリペプチドのその受容体に対する結合と競合する、該ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するために使用することができる。かかるアッセイを行うための標準的な方法は、当該分野では十分に理解されている。

20

【0054】

本発明のポリペプチドのアンタゴニストの例には、抗体、あるいは、ある場合には、該ポリペプチド自体のリガンド、基質、受容体、酵素などに密接に関連するオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、場合により、例えば、該リガンド、基質、受容体、酵素などのフラグメント;あるいは本発明のポリペプチドに結合するものの、応答を誘発せず、その結果、ポリペプチドの活性が妨げられる、小分子が含まれる。

30

【0055】

スクリーニング方法はまた、トランスジェニック技術およびPHPiP-180遺伝子の使用を含んでもよい。トランスジェニック動物を構築する手法は、十分に確立されている。例えば、受精した卵母細胞の雌性前核へのマイクロインジェクション、移植前または移植後の胚へのレトロウイルス移入、エレクトロポレーションなどによって、遺伝子操作された胚性幹細胞の宿主胚盤胞への注入を通して、PHPiP-180遺伝子を導入することができる。特に有用なトランスジェニック動物は、その動物のゲノム内において、動物の遺伝子がヒトの等価体によって置き換えられている、所謂「ノック・イン」動物である。ノック・イン・トランスジェニック動物は、医薬探索のプロセスにおいて、化合物はヒトの標的に対して特異的であるという、標的の妥当性検証用に有用である。他の有用なトランスジェニック動物は、内因性DNA配列によってコードされている、本発明のポリペプチドに対する動物オルソログの発現が細胞内で部分的または完全に無効とされている、所謂「ノック・アウト」動物である。遺伝子のノック・アウトは、技術の限界の結果として、特異的な細胞または組織を対象とする、特定の細胞または組織においてのみ起きていてもよく、あるいは、動物内の全て、または実質的に全ての細胞において生じてもよい。トランスジェニック動物の手法はまた、導入された遺伝子が、本発明のポリペプチドを大量に供するために発現させられる動物全体の発現・クローニング・システムを提供する。

40

【0056】

上記方法において使用されるスクリーニング・キットは、本発明のさらなる形態をなす。

50

かかるスクリーニング・キットは、

- (a) 本発明のポリペプチド；
- (b) 本発明のポリペプチドを発現している組換え細胞；
- (c) 本発明のポリペプチドを発現している細胞膜；または
- (d) 本発明のポリペプチドに対する抗体；

を含んでなり、好ましくは、前記のポリペプチドは、配列番号：2のものである。

【0057】

かかるキット何れの中においても、(a)、(b)、(c)または(d)は、実質的な構成要素を構成することは理解される。

【0058】

(用語集)

下記の定義は、本明細書中で既に頻繁に使用されているいくつかの用語の理解を容易にするために提供される。

【0059】

本明細書中に用いられる「抗体」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、ならびにヒト化抗体、同様に、F a bフラグメントをも包含し、F a bまたは他の免疫グロブリンの発現ライブラリー生成物をも包含する。

【0060】

「単離(された)」は、その天然の状態から、「ヒトの手によって」変化していること、すなわち、自然界に存在する場合、その本来の環境から変化、または移動されているか、あるいは、その両方であることを意味する。例えば、生きた生物中に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離」されてはいないが、その天然状態の共存物質から分離された、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、この用語の本明細書中での用法に従うと、「単離」されている。さらに、形質転換、遺伝子操作、または何らかの他の組換え方法によって、生物中に導入されているポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、その生物が生存または非生存かのいずれでも、前記生物中に依然として存在している場合でさえ、「単離」されている。

【0061】

「ポリヌクレオチド」は、一般には、非改変型または改変型のRNAあるいはDNAであってもよい、任意のポリリボヌクレオチド(RNA)またはポリデオキシリボヌクレオチド(DNA)を指す。「ポリヌクレオチド」には、限定ではないものの、一本鎖および二本鎖のDNA、一本鎖と二本鎖の領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、ならびに一本鎖と二本鎖の領域の混合物であるRNA、一本鎖、または、より典型的には、二本鎖の、あるいは、一本鎖と二本鎖の領域の混合物であってもよい、DNAおよびRNAを含んでなるハイブリッド分子が含まれる。加えて、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNA、あるいはRNAとDNAとの両方を含んでなる三重鎖領域をもいう。用語「ポリヌクレオチド」はまた、1つまたは複数の修飾された塩基を含有するDNAまたはRNA、および安定性または他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAを含む。「修飾(された)」塩基には、例えば、トリチル化された塩基、ならびに、イノシンなどの非通常型の塩基が含まれる。様々な修飾をDNAおよびRNAに対して行うことができ、従って、「ポリヌクレオチド」は、ウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態と同様に、自然界に典型的に見出されるような、ポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態をも包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、しばしばオリゴヌクレオチドと称される、比較的短いポリヌクレオチドをも包含する。

【0062】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合(すなわち、ペプチド等配電子体)によって互いに連結された2つ以上のアミノ酸を含んでなるポリペプチドのいずれをも指す。「ポリペプチド」は、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと広く呼ばれる短い鎖、ならびに、一般にはタンパク質と呼ばれる、より長い鎖の双方ともを

10

20

30

40

50

いう。ポリペプチドは、遺伝子によってコードされる20種のアミノ酸とは異なるアミノ酸を含有することができる。「ポリペプチド」には、翻訳後プロセッシングなどの天然のプロセス、あるいは当該分野で周知の化学的な修飾方法のいずれかによって、修飾がなされたアミノ酸配列が含まれる。かかる修飾は、基本的な教本、およびより詳細な専門書、ならびに数多くの研究文献中に、広く記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含む、ポリペプチド内のいずれの位置に生じさせることもできる。同じタイプの修飾が、所与ポリペプチド内のいくつかの部位に同じ程度または異なる程度で存在してもよいことが理解される。また、所与のポリペプチドは、多くのタイプの修飾を含んでもよい。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝がなされてもよく、また、分枝を有する、または有していない、環状であってもよい。環状、分枝状および分枝した環状のポリペプチドは、翻訳に続く天然のプロセスに起因しても、あるいは合成的方法によって作製されてもよい。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ピオチン化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、クロス・リンク形成、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPI・アンカー形成、ヒドロキシ化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸のタンパク質へのトランスファー・RNA媒介付加、ならびユビキチン化が含まれる(例えば、Proteins-Structures and Molecular Properties、第2版、T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company、New York、1993; Wold, F.、翻訳後のタンパク質修飾：全体像および展望、1~12、Post-translational Covalent Modification of Proteins、B. C. Johnson 編、Academic Press、New York、1983; Seifter et al.、*Meth. Enzymol.*、182、626~646、1990; Rattan et al.、*Ann. NY Acad. Sci.*、663、48~62、1992 参照)。

10

20

30

40

50

【0063】

ポリペプチド配列の「フラグメント」は、基準の配列よりも短いものの、基準となるポリペプチドと同一の生物学的な機能または活性を本質的に保持しているポリペプチド配列をいう。ポリヌクレオチド配列の「フラグメント」は、配列番号：1の基準配列よりも短いポリヌクレオチド配列をいう。

【0064】

「変異体」は、基準となるポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるものの、その本質的な性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、基準となるポリヌクレオチドに対して、塩基配列に相違がある。変異体の塩基配列における変異は、基準となるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させても、させなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、下記に説明するように、基準の配列によってコードされるポリペプチド中における、アミノ酸の置換、付加、欠失、融合および末端の短縮化を引き起こしてもよい。ポリペプチドの典型的な変異体は、基準となるポリペプチドに対して、アミノ酸配列に相違がある。一般に、改変は、基準となるポリペプチドおよび変異体の配列が全体的には非常に類似し、そして多くの領域において同一となるように制限される。変異体ならびに基準となるポリペプチドは、アミノ酸配列において、1つまたは複数の置換、挿入、欠失の任意の組合せによって相違してもよい。置換または挿入されるアミノ酸残基は、遺伝子コードによってコードされるアミノ酸残基であっても、なくてもよい。典型的な、保存的置換には、Gly、Ala; Val、Ile、Leu; Asp、Glu; Asn、Gln; Ser、Thr; Lys、Arg; ならびにPheおよびTyrが含まれる。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子などの天然に存在するものであってもよく、あるいは天然では存在することが知られていない変異体であってもよい。ポリヌ

クレオチドおよびポリペプチドの天然には存在しない変異体は、変異誘発方法によって、あるいは直接合成によって作製することもできる。また、1つまたは複数の翻訳後の修飾、例えば、グリコシル化、リン酸化、メチル化、ADP-リボシル化などを有するポリペプチドも、また変異体には含まれる。実施態様には、N末端アミノ酸のメチル化、セリンおよびトレオニンのリン酸化、ならびにC末端グリシンの修飾が含まれる。

【0065】

「対立遺伝子」は、ゲノム中の所与の遺伝子座に存在する遺伝子の、2つまたはそれ以上の選択的な形態の1つをいう。

【0066】

「多型」は、集団内における、ゲノムにおける所与の位置における塩基配列(仮に関連する場合には、コードされるポリペプチド配列)の変動をいう。

10

【0067】

「単一塩基多型」(SNP)は、集団内においてゲノム内の1つの塩基位置における、塩基変動の発生をいう。SNPは、遺伝子内で、あるいはゲノムの遺伝子間領域内で起こってもよい。SNPは、対立遺伝子特異的増幅(ASSA)を使用してアッセイすることができる。該プロセスには、少なくとも3つのプライマーが必要とされる。共通プライマーが、アッセイされる多型に対して、逆方向に相補となるように使用される。この共通プライマーは、多様な塩基から50bpから1500bpの間で隔たったものとできる。それ以外の2つ(またはそれ以上)のプライマーは、最後の3'塩基が、多型を構成する2つ(またはそれ以上)の対立遺伝子の1つと一致するように変化している点を除いて、互いに同一である。そして、それぞれ、共通プライマーおよび1つの対立遺伝子特異的プライマーを使用して、2つ(またはそれ以上)のPCR反応を、サンプルDNAについて行う。

20

【0068】

本明細書中で使用されている「スプライス変異体」は、同じゲノムDNA配列から一旦転写され、ただし、択一的なRNAスプライシングを受けている、RNA分子から作製されたcDNA分子をいう。択一的なRNAスプライシングは、一般には、イントロンを除くために、一次RNA転写物がスプライシングを受ける際に生じ、それぞれ、異なるアミノ酸配列をコードしてもよい、1つ以上のmRNA分子の産生を引き起こす。スプライス変異体の用語はまた、上記のcDNA分子によってコードされるタンパク質をもいう。

【0069】

「同一性」は、その配列を比較することによって決定される、2つ以上のポリペプチド配列または2つ以上のポリヌクレオチド配列の間における相互関係を反映している。一般に、同一性は、対比がなされている配列の長さにかかわらず、2つのポリヌクレオチド配列、あるいは2つのポリペプチド配列の、それぞれ塩基毎またはアミノ酸毎の厳密な一致をいう。

30

【0070】

「%同一性」- 正確な一致が存在しない配列については、「%同一性」を決定することができる。一般に、対比すべき2つの配列を、配列間で最大の相関を与えるようにアラインメントされる。これには、アラインメントの程度を高めるために、「ギャップ」をいずれか一方の配列または両方の配列に挿入することを含んでもよい。%同一性は、比較されている配列のそれぞれの全長にかかわらず、決定してもよく(所謂、全体的なアラインメント)、同じ長さまたは非常に類似する長さの配列に対して、特に適している;あるいは、より短い、限定された長さにかかわらず、決定してもよく(所謂、局所的なアラインメント)、不ぞろいな長さの配列において、より好適である。

40

【0071】

「類似性」は、2つのポリペプチド配列の間における関係に対する、より精巧な、さらなる尺度である。一般に、「類似性」は、残基毎に基づき、(同一性に関してと、同様に)比較されている配列それぞれからの、相互に対をなす残基間における正確な一致だけでなく、正確な一致が存在しない場合にも、進化的な基準に基づいて、1つの残基は、他方に対する適当な置換であるかどうかをも考慮する、2つのポリペプチド鎖のアミノ酸間での比

50

較を意味する。この蓋然性は、付随した「スコア」を有し、2つの配列の「%類似性」は、それに基づき決定することができる。

【0072】

2つ以上の配列の同一性および類似性を比較するための方法は、当該分野では周知となっている。従って、例えば、ウイスコンシン配列分析パッケージ バージョン 9.1(Devereux J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 12, 387~395, 1984; Genetic Computer Group, Madison, Wisconsin, 米国)中の利用可能なプログラム、例えば、BESTFIT およびGAP プログラムを、2つのポリヌクレオチド間の%同一性、ならびに2つのポリペプチド配列間の%同一性および%類似性を決定するために使用してもよい。BESTFITは、SmithおよびWatermanの「局所的相同性」アルゴリズム(*J. Mol. Biol.*, 147, 195~197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482~489, 1981) を使用して、2つの配列間における、類似性の最も良い1つの領域を見出す。BESTFITは、長さが類似していない2つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列の比較に対してより適しており、該プログラムは、より短い配列は、より長いものの一部を表すことを仮定している。一方、GAPは、NeddlemanおよびWunschのアルゴリズム(*J. Mol. Biol.*, 48, 443~453, 1970) に従って、「最大の類似性」を見出しつつ、2つの配列をアラインメントする。GAPは、ほぼ同じの長さであり、また、アラインメントが長さ全体にわたって期待される配列の比較に対してより適している。好ましくは、比較されるものを、最適にアラインメントするための、各プログラムにおいて使用される「ギャップ加重」および「長さ加重」のパラメーターは、それぞれ、ポリヌクレオチド配列に対しては、50および3であり、ポリペプチド配列に対しては、12および4である。好ましくは、比較されている2つの配列を最適にアラインメントした上で、%同一性および類似性を決定する。

10

20

【0073】

配列間の同一性および/または類似性を決定するための他のプログラムもまた、当該分野では知られており、例えば、BLASTファミリーのプログラム(Altschul S.F. et al., *J. Mol. Biol.*, 215, 403~410, 1990; Altschul S. F. et al., *Nucleic Acids Res.*, 25: 389~3402, 1997; National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Bethesda, Maryland, 米国) から入手することができ、またwww.ncbi.nlm.nih.govのNCBIのホームページからアクセス可能である)、およびFASTA(Pearson WR, *Methods in Enzymology*, 183, 63~99, 1990; Pearson W.R. およびLipman D.J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85, 2444~2448, 1988; ウイスコンシン配列分析パッケージの一部として入手可能である)。

30

【0074】

好ましくは、BLOSUM62 アミノ酸置換行列(Henikoff S and Henikoff JG, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89, 10915~10919, 1992) を、比較の前に、ヌクレオチド配列をアミノ酸配列に予め翻訳する場合をも含み、ポリペプチド配列の比較において使用する。

【0075】

好ましくは、プログラム BESTFITが、基準とするポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に関して、検討するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の%同一性を決定するために使用され、前記したように、検討と基準とする配列とは、最適にアラインメントされ、また、プログラムのパラメーターは、暫定の値に設定されている。

40

【0076】

「同一性指標」は、候補配列(ポリヌクレオチドまたはポリペプチド)と基準の配列とを比較するために使用することができる、配列関連性の尺度である。すなわち、例えば、基準とするポリヌクレオチド配列と比較して、例えば0.95の同一性指標を有する候補ポリヌクレオチド配列は、該候補ポリヌクレオチド配列は、基準の配列の各100塩基あたり平均して5個までの相違を含んでもよい点を除いて、基準の配列と同一である。かかる相違は、少なくとも1つの塩基欠失、トランジションおよびトランスバージョンを含む置換、または挿入からなる群から選択される。これらの相違は、基準となるポリヌクレオチド配列の5'または3'末端部位に、あるいはこれら末端部位の間の任意な位置で、基準配列内の

50

塩基間に個々に、あるいは基準配列内において1つまたは複数の連続した群中で点在して、起こってもよい。換言すると、基準となるポリヌクレオチド配列と比較した際、0.95の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を得るためには、既に記載したように、基準配列内の塩基100個毎に、平均して5個までが、任意の組合せで、欠失、置換または挿入されていてもよい。同じことが、同一性指標の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要に応じて変更して適用される。

【0077】

同様に、ポリペプチドの場合には、基準のポリペプチド配列と比較したときに、例えば、0.95の同一性指標を有する候補ポリペプチド配列は、基準の配列の各100アミノ酸あたり、平均して5個までの違いを該ポリペプチド配列が含んでもよいことを除いて、基準の配列と同一である。かかる相違は、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、保存的ならびに非保存的な置換を含む置換、または挿入からなる群から選択される。これらの相違は、基準となるポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシ末端部位に、あるいはこれら末端部位間の任意の位置に、基準配列内のアミノ酸間に個々に、あるいは基準配列内において1つまたは複数の連続した群中に点在して、起こってもよい。換言すると、基準のポリペプチド配列と比較した際、0.95の同一性指標を有するポリペプチド配列を得るためには、既に記載したように、基準配列内のアミノ酸の100個毎に、平均して5個まで、任意の組合せで、欠失、置換または挿入がなされてもよい。同じことが、同一性指標の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要に応じて変更して適用される。

10

【0078】

塩基またはアミノ酸の相違数と同一性指標との関係は、下記の式で表記でき、

$$n_a = x_a - (x_a \cdot I)$$

式中、

n_a は、塩基またはアミノ酸の相違数であり、

x_a は、配列番号：1あるいは配列番号：2における塩基またはアミノ酸のそれぞれの総数であり、

I は、同一性指標であり、

\cdot は、乗算演算子に対する記号であり、

その際、 x_a と I との非整数の積は、 x_a から減ずるに先立ち、最も近い整数に切り捨てられる。

20

30

【0079】

「ホモログ」は、基準の配列に対して、高度の配列関連性を有するポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列を示すために、当該分野で使用されている一般的な用語である。かかる関連性は、既に定義されているように、2つの配列間の同一性および/または類似性の程度を決定することによって、定量化することもできる。この総称的な用語には、「オルソログ」および「パラログ」の用語が含まれる。「オルソログ」は、別の種中における、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの機能的等価体であるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。「パラログ」は、機能的に類似している、同じ種内にあるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。

【0080】

「融合タンパク質」は、2つの、関連しない、融合された遺伝子またはそのフラグメントによってコードされるタンパク質をいう。その例が、米国特許第5541087号、米国特許第5726044号に開示されている。Fc-PP1P-180の場合、融合タンパク質の一部として、免疫グロブリンのFc領域の使用は、治療に使用する際のかかる融合タンパク質の薬物動態学的性質を改善するため、ならびに、二量体型のPP1P-180を形成させるために、Fc-PP1P-180または該PP1P-180の断片の機能的発現を行う上で好都合である。Fc-PP1P-180のDNA構築物は、5'から3'の方向に、分泌カセット、すなわち、哺乳動物細胞からの細胞外への輸送を誘起するシグナル配列、融合パートナーとして、免疫グロブリンのFc領域フラグメントをコードするDNA、およびPP1P-180をコードするDNAまたはその断片を含んでなる。ある用

40

50

途では、融合タンパク質の残部には手を触れることなく、機能的なFc側を変異させ、その固有的な機能的性質(補体結合、Fc受容体結合)を変える、あるいは発現後にFc部分を完全に除くことを可能とすることが望ましい。

【0081】

特許および特許出願に限らず、これらを含む、本明細書中で引用されている刊行物および参考文献の全ては、十分に述べているように、個々の刊行物または参考文献を、参照して組み込むために、明示的かつ個別的に示唆されているように、その全部を、参照することで、本明細書中に組み込まれる。本出願が優先権を主張する特許出願はいずれも、先に刊行物および参考文献に関して記載したと同様に、その全部を、参照することで、本明細書中に組み込まれる。

10

【0082】

(さらなる実施例)

プラスミド構築

(すべてのプラスミドは配列表により検証された。)

pDBLeu-PHP1のクローニング

PHP1をコードするcDNAを、プライマーHisase-Sal-up(配列番号:3、プライマー1)およびHisase-Not-low(配列番号:4、プライマー2)を用いてPCR増幅を行い、ベクターpCR2.1TOPO(Invitrogen製)に連結した。続いて、ベクターを、Sal1およびNot1を用いて切断し、PHP1コード化断片をpDBLeuに連結した。

20

【0083】

pLexA-MCS-PHP1のクローニング

オリゴヌクレオチドのプライマー3(Y2H-MCS1(配列番号:5))およびプライマー4(Y2H-MCS2(配列番号:6))をアニーリングし、EcoR1およびSal1により制限されたベクターpLexA(Clontech)に連結して、EcoR1、Sal1、Xho1およびNot1の各制限部位を1つだけ含むベクターpLexA-MCSを作製した。

【0084】

PHP1をコードするフラグメントを、Not1およびSal1を使用してベクターpDBLeu-PHP1から単離し、ベクターpLexA-MCSに連結して、pLexA-MCS-PHP1を作製した。すべてのベクターは配列決定により確認された。

30

【0085】

融合タンパク質

Gal4タンパク質およびC末端に連結された全長のPHP-1タンパク質配列を含むGal4-PHP1融合タンパク質のペプチド配列が配列番号7に開示されている。

【0086】

LexA-PHP-1融合タンパク質の対応するペプチド配列はLexAタンパク質配列およびC末端に連結された全長のPHP-1タンパク質配列を含む。該配列は配列番号8に開示されている。

【0087】

PHP1相互作用タンパク質を選択するための酵母ツーハイブリッドスクリーニング
酵母ツーハイブリッドスクリーニング方法は、技術的にシンプルであり非常に迅速であるため、ほんの数日で数百万ものクローンライブラリーをスクリーニング可能である。そのシステムの全ての要素は購入可能である。そのスクリーニングにおいて、Gal4(AA1-147)ドメインおよびSB40ラージのNLAに融合されるGal4トランス活性化ドメイン(AA768-881)を結合するDNAが、受容体ヒスチジン・フォスファターゼおよびタンパク質リガンドの相互作用により接触されている場合、His3指標遺伝子が活性化されるだけである。このスクリーニングから単離されたリガンドはヒスチジン・フォスファターゼに結合するが、その結合パートナーは第2の違い-LexAベース酵母ツーハイブリッド選択スキーム-において確認されている。もし、両方のスクリーニング手段が同時に実行されるならば、得られたリガンドは他のシステムでテストされる。

40

50

【0088】

pDBLeu-PHP1をおとり構築物としておよびHELAベースのcDNAライブラリーをえものとして使用する酵母ツーハイブリッドスクリーニング(Proquest、Life Technologies)を記載の通りに行った(セレクションは、25mMの3-アミノトリアゾールを含む - Trp、- Leu、- His 最少培地において行われた)。相互作用は、製造者のプロトコルに記載されるように、ウラシル、トリプトファンおよびロイシンを含まない培地によって確認された。

【0089】

PHPIP-180を代表する1つの陽性クローンが単離され、配列決定された。

【0090】

LexAベース酵母ツーハイブリッド選択スキームを使用するPHPIP-180リガンドの相互作用の確認：

異なるセレクションスキームにおける相互作用を確認するために、Matchmaker LexA ツーハイブリッドシステム(Clontech)を製造者の条件に従って使用した。ベクターpLexA-MCS-PHP-1をおとりとして使用した。ベクターpPC86-PHPIP180は、Gal4ベースの酵母ツーハイブリッドシステムにおいて上記のように単離されたが、これをえものとして使用した。

【0091】

p53およびラージT抗原の相互作用を*S.cerevisiae* strain EGY48-pSH18-32においてはポジティブコントロールとして用いられる。

【0092】

コンピューター上での分析

上記記載の酵母ツーハイブリッドスクリーニングにおいて同定されたPHP1リガンドの遺伝子はヒト染色体1p31に位置している。上記同定された遺伝子は571AA長のタンパク質をコードし、他の公知のタンパク質との重要な配列同一性を示さない。この遺伝子の部分的な配列および対応する仮想的なORF予測がデータバンクに収められている一方で、本研究において明らかにされたタンパク質の機能は今まで示されていなかった。

10

20

【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
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/006493 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/00
- (21) International Application Number: PCT/EP02/07728
- (22) International Filing Date: 11 July 2002 (11.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 011166402 13 July 2001 (13.07.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, P.O. Box, 64271 Darmstadt (DE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KELLNER, Ronald [DE/DE]; Am Karzenpfad 10, 64646 Heppenheim (DE); HOCK, Björn [DE/DE]; Nordstrasse 2a, 63477 Maintal (DE).
- (74) Common Representative: MERCK PATENT GMBH; Frankfurter Strasse 250, 64271 Darmstadt (DE).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/006493 A2

(54) Title: HISTIDINE PHOSPHATASE INTERACTING PROTEIN WITH 180KD

(57) Abstract: PIPIP-180 polypeptides and polynucleotides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques are disclosed. Also disclosed are methods for utilizing PIPIP-180 polypeptides and polynucleotides in diagnostic assays.

WO 03/006493

PCT/EP02/07728

Histidine Phosphatase Interacting Protein with 180kD**Field of the Invention**

5 This invention relates to newly identified polypeptides and polynucleotides encoding such polypeptides sometimes hereinafter referred to as „novel Protein Histidine Phosphatase Interacting Partner of 180KD (PHPIP-180)“, to their use in diagnosis and in identifying compounds that may be agonists, antagonists that are potentially useful in therapy, and to production of such polypeptides and polynucleotides.

10 Background of the Invention

Functional genomics relies heavily on high-throughput and the various tools of bioinformatics to identify gene sequences of potential interest from the many molecular biology databases now available. There is a continuing need to identify and characterise further genes and their related polypeptides/proteins, as targets for drug discovery.

15 Recently, the first human protein histidine phosphatase (PHP1) has been identified (Apperson et al.: J. Neurosci. 16: p6839, 1996). The enzyme was isolated from rabbit liver extracts and characterized. In human cell lines PHP1 is displayed in the cytoplasm. Functional studies with the orthologue protein in *C.elegans* showed a neuronal localization (Kennedy et al.: Trends Biochem. Sci, 20: p350, 1995) (Kennedy et al.: Trends Neurosci, 20: p264, 1997) (Kennedy et al.: Brain Res. Brain Res. Rev, 26: p243, 1998) (Kennedy et al.: Science, 290: p750, 2000) (Kornau et al.: Curr. Opin. Neurobiol, 7: p368, 1997). The *C.elegans* homologue of PHP1 has been localized in motor- and pharyngeal sensorineurons MC, M3 and 20 I2. The analogy from a nematode's pharynx to the human heart is described (PNAS 95,5072-5, 1998) thus, PHP1 and ligand could be relevant for various cardiovascular diseases. PHP1 is furthermore expressed in skeletal muscle, kidney, liver and brain. Additional references referring to PHP1 includes (Omkumar et al.: J. Biol.Chem, 271: p31670, 1996) (Ouyang et al.: J. Neurosci, 19: p7823, 1999) (Walikonis et al.: J. Neurosci, 20: p4069, 2000) (Walikonis et al.: J. Neurosci, 21: p423, 2001)

CONFIRMATION COPY

(Zang et al.: J. Neurosci, 19: p96, 1999. (Legouis et al.: Nature Cell Biol, 2: p415, 2000)

In the current application protein interaction studies with PHP1 have been used in combination with DNA sequencing technologies and bioinformatics to identify gene sequences and gene functions that are ligands and interaction partners of PHP-1 on a molecular level.

Summary of the Invention

Protein interaction studies with PHP1 identified the PHPIP-180 as a yet unknown interaction partner.

The present invention relates to PHPIP-180, in particular PHPIP-180 polypeptides and PHPIP-180 polynucleotides, recombinant materials and methods for their production. Such polypeptides and polynucleotides are of interest in relation to methods of treatment of certain diseases, including, but not limited to various cardiovascular diseases furthermore autism: a defect in nerve cells membrane activity linked to the fatty acid metabolism (Am J. Med. Genet. 4;96(6):765, 2000), schizophrenia (Psychiatr Q Winter;65:287, 1994), familial recurrent arthritis (Arthritis Rheum ;43:2041, 2000), Bardet-Biedl Syndrome (BBS4) (Genomics ;41:93, 1997), congenital dyserythropoietic anemia type III (Haematologica 85,753, 2000), and Malignant fibrous histiocytomas hereinafter referred to as "diseases of the invention". In a further aspect, the invention relates to methods for identifying agonists and antagonists (e.g., inhibitors) using the materials provided by the invention, and treating conditions associated with PHPIP-180 imbalance with the identified compounds. In a still further aspect, the invention relates to diagnostic assays for detecting diseases associated with inappropriate PHPIP-180 activity or levels.

Description of the Invention

In a first aspect, the present invention relates to PHPIP-180 polypeptides. Such polypeptides include:

- (a) an isolated polypeptide encoded by a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO:1;
- (b) an isolated polypeptide comprising a polypeptide sequence having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
- (c) an isolated polypeptide comprising the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
- (d) an isolated polypeptide having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
- (e) the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2; and
- (f) an isolated polypeptide having or comprising a polypeptide sequence that has an Identity Index of 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, or 0.99 compared to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
- (g) fragments and variants of such polypeptides in (a) to (f).

15

Polypeptides of the present invention are members of the Phipp-180 family of polypeptides. Phipp-180 is therefore of interest because they are ligands for human protein histidine phosphatase (PHP1). The human protein histidine phosphatase (PHP1) has been described recently (WO00/52175) and the characterization and comparison of said enzyme to protein isolated from rabbit liver extracts revealed that PHP1 was a specifically dephosphorylating ATP-citrate lyase, a key enzyme involved in the biosynthesis of acetylCoA and acetylcholine, and known to be phosphorylated at position His-764. The substrate specificity identifies a role in the biosynthesis of fatty acids via preparation of acetylCoA. Accordingly, the biosynthesis of acetylcholine is regulated in nerve cells.

Histidine phosphorylation in mammals is involved in signal transduction via multimeric protein complexes. In human cell lines PHP1-ligands are displayed in the cytoplasm. Functional studies with the orthologue protein in *C.elegans* showed an exclusively neuronal localization, however other

30

cell types outside that location do express it as well. Thus the new ligand is relevant for other diseases and especially for various cardiovascular disorders.

5 The PHPIP180-homologous protein LET-413 from *C.elegans* is described as a basolateral protein required for the assembly of adherens junctions (Legouis et al. Nature Cell Biol. 2000, 2:415). This suggests that let-413 acts as an adaptor protein involved in polarizing protein trafficking in epithelial cells. The biological properties of the PHPIP-180 are hereinafter referred to as "biological activity of PHPIP-180" or "PHPIP-180 activity".
10 Preferably, a polypeptide of the present invention exhibits at least one biological activity of PHPIP-180.

Polypeptides of the present invention also includes variants of the aforementioned polypeptides, including all allelic forms and splice variants. Such polypeptides vary from the reference polypeptide by insertions,
15 deletions, and substitutions that may be conservative or non-conservative, or any combination thereof. Particularly preferred variants are those in which several, for instance from 50 to 30, from 30 to 20, from 20 to 10, from 10 to 5, from 5 to 3, from 3 to 2, from 2 to 1 or 1 amino acids are inserted, substituted, or deleted, in any combination.

20 Preferred fragments of polypeptides of the present invention include an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous amino acids from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous amino acids truncated
25 or deleted from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. Preferred fragments are biologically active fragments that mediate the biological activity of PHPIP-180, including those with a similar activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Also preferred are those fragments that are antigenic or immunogenic in an animal, especially in a
30 human.

Fragments of the polypeptides of the invention may be employed for producing the corresponding full-length polypeptide by peptide synthesis; therefore, these variants may be employed as intermediates for producing

the full-length polypeptides of the invention. The polypeptides of the present invention may be in the form of the "mature" protein or may be a part of a larger protein such as a precursor or a fusion protein. It is often advantageous to include an additional amino acid sequence that contains secretory or leader sequences, pro-sequences, sequences that aid in purification, for instance multiple histidine residues, or an additional sequence for stability during recombinant production.

Polypeptides of the present invention can be prepared in any suitable manner, for instance by isolation from naturally occurring sources, from genetically engineered host cells comprising expression systems (*vide infra*) or by chemical synthesis, using for instance automated peptide synthesizers, or a combination of such methods. Means for preparing such polypeptides are well understood in the art.

In a further aspect, the present invention relates to Phipp-180 polynucleotides. Such polynucleotides include:

- (a) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1;
- (b) an isolated polynucleotide comprising the polynucleotide of SEQ ID NO:1;
- (c) an isolated polynucleotide having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polynucleotide of SEQ ID NO:1;
- (d) the isolated polynucleotide of SEQ ID NO:1;
- (e) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
- (f) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2;

(g) an isolated polynucleotide having a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;

(h) an isolated polynucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2;

5 (i) an isolated polynucleotide having or comprising a polynucleotide sequence that has an Identity Index of 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, or 0.99 compared to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1;

(j) an isolated polynucleotide having or comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence that has an Identity Index of
10 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, or 0.99 compared to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2; and

polynucleotides that are fragments and variants of the above mentioned polynucleotides or that are complementary to above mentioned polynucleotides, over the entire length thereof.

15 Preferred fragments of polynucleotides of the present invention include an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence having at least 15, 30, 50 or 100 contiguous nucleotides from the sequence of SEQ ID NO: 1, or an isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous nucleotides truncated or deleted from the
20 sequence of SEQ ID NO: 1.

Preferred variants of polynucleotides of the present invention include splice variants, allelic variants, and polymorphisms, including polynucleotides having one or more single nucleotide polymorphisms (SNPs).

25 Polynucleotides of the present invention also include polynucleotides encoding polypeptide variants that comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and in which several, for instance from 50 to 30, from 30 to 20, from 20 to 10, from 10 to 5, from 5 to 3, from 3 to 2, from 2 to 1 or 1 amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination.

In a further aspect, the present invention provides polynucleotides that are
30 RNA transcripts of the DNA sequences of the present invention. Accordingly, there is provided an RNA polynucleotide that:

WO 03/006493

7

PCT/EP02/07728

(a) comprises an RNA transcript of the DNA sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2;

(b) is the RNA transcript of the DNA sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2;

5 (c) comprises an RNA transcript of the DNA sequence of SEQ ID NO:1; or

(d) is the RNA transcript of the DNA sequence of SEQ ID NO:1;

and RNA polynucleotides that are complementary thereto.

10 The polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1 is a cDNA sequence that encodes the polypeptide of SEQ ID NO:2. The polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 may be identical to the polypeptide encoding sequence of SEQ ID NO:1 or it may be a sequence other than SEQ ID NO:1, which, as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, also encodes the polypeptide of SEQ ID
15 NO:2.

Preferred polypeptides and polynucleotides of the present invention are expected to have, *inter alia*, similar biological functions/properties to their homologous polypeptides and polynucleotides. Furthermore, preferred polypeptides and polynucleotides of the present invention have at least one
20 PPHP-180 activity.

Polynucleotides of the present invention may be obtained using standard cloning and screening techniques from a cDNA library derived from mRNA in cells of heart, skeletal muscle, liver, kidney, brain. However PHP1 might as well be isolated from other human tissues, where lower levels are found.

25 The substrate specificity identifies a role in the biosynthesis of fatty acids via preparation of acetylCoA. Accordingly, the biosynthesis of acetylcholine is regulated in nerve cells.

(see for instance, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

30 (1989)). Polynucleotides of the invention can also be obtained from

natural sources such as genomic DNA libraries or can be synthesized using well known and commercially available techniques.

When polynucleotides of the present invention are used for the recombinant production of polypeptides of the present invention, the polynucleotide may include the coding sequence for the mature polypeptide, by itself, or the coding sequence for the mature polypeptide in reading frame with other coding sequences, such as those encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or prepro- protein sequence, or other fusion peptide portions. For example, a marker sequence that facilitates purification of the fused polypeptide can be encoded. In certain preferred embodiments of this aspect of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, as provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.) and described in Gentz *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86:821-824, or is an HA tag. The polynucleotide may also contain non-coding 5' and 3' sequences, such as transcribed, non-translated sequences, splicing and polyadenylation signals, ribosome binding sites and sequences that stabilize mRNA.

Polynucleotides that are identical, or have sufficient identity to a polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1, may be used as hybridization probes for cDNA and genomic DNA or as primers for a nucleic acid amplification reaction (for instance, PCR). Such probes and primers may be used to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding polypeptides of the present invention and to isolate cDNA and genomic clones of other genes (including genes encoding paralogs from human sources and orthologs and paralogs from species other than human) that have a high sequence similarity to SEQ ID NO:1, typically at least 95% identity. Preferred probes and primers will generally comprise at least 15 nucleotides, preferably, at least 30 nucleotides and may have at least 50, if not at least 100 nucleotides. Particularly preferred probes will have between 30 and 50 nucleotides. Particularly preferred primers will have between 20 and 25 nucleotides.

A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention, including homologs from species other than human, may be obtained by a process comprising the steps of screening a library under stringent hybridization

conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO: 1 or a fragment thereof, preferably of at least 15 nucleotides; and isolating full-length cDNA and genomic clones containing said polynucleotide sequence. Such hybridization techniques are well known to the skilled artisan.

5 Preferred stringent hybridization conditions include overnight incubation at 42°C in a solution comprising: 50% formamide, 5xSSC (150mM NaCl, 15mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5x Denhardt's solution, 10 % dextran sulfate, and 20 microgram/ml denatured, sheared salmon sperm DNA; followed by washing the filters in 0.1x SSC at about
10 65°C. Thus the present invention also includes isolated polynucleotides, preferably with a nucleotide sequence of at least 100, obtained by screening a library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO:1 or a fragment thereof, preferably of at least 15 nucleotides.

15 The skilled artisan will appreciate that, in many cases, an isolated cDNA sequence will be incomplete, in that the region coding for the polypeptide does not extend all the way through to the 5' terminus. This is a consequence of reverse transcriptase, an enzyme with inherently low "processivity" (a measure of the ability of the enzyme to remain attached
20 to the template during the polymerisation reaction), failing to complete a DNA copy of the mRNA template during first strand cDNA synthesis.

There are several methods available and well known to those skilled in the art to obtain full-length cDNAs, or extend short cDNAs, for example those
25 based on the method of Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) (see, for example, Frohman et al., Proc Nat Acad Sci USA 85, 8998-9002, 1988). Recent modifications of the technique, exemplified by the Marathon (trade mark) technology (Clontech Laboratories Inc.) for example, have significantly simplified the search for longer cDNAs. In the
30 Marathon (trade mark) technology, cDNAs have been prepared from mRNA extracted from a chosen tissue and an 'adaptor' sequence ligated onto each end. Nucleic acid amplification (PCR) is then carried out to amplify the "missing" 5' end of the cDNA using a combination of gene specific and adaptor specific oligonucleotide primers. The PCR reaction is then repeated using 'nested' primers, that is, primers designed to anneal
35 within the amplified product (typically an adapter specific primer that

anneals further 3' in the adaptor sequence and a gene specific primer that
anneals further 5' in the known gene sequence). The products of this
reaction can then be analyzed by DNA sequencing and a full-length cDNA
constructed either by joining the product directly to the existing cDNA to
5 give a complete sequence, or carrying out a separate full-length PCR
using the new sequence information for the design of the 5' primer.

Recombinant polypeptides of the present invention may be prepared by
processes well known in the art from genetically engineered host cells
comprising expression systems. Accordingly, in a further aspect, the present
10 invention relates to expression systems comprising a polynucleotide or
polynucleotides of the present invention, to host cells which are genetically
engineered with such expression systems and to the production of
polypeptides of the invention by recombinant techniques. Cell-free
translation systems can also be employed to produce such proteins using
15 RNAs derived from the DNA constructs of the present invention.

For recombinant production, host cells can be genetically engineered to
incorporate expression systems or portions thereof for polynucleotides of the
present invention. Polynucleotides may be introduced into host cells by
methods described in many standard laboratory manuals, such as Davis et
20 al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) and Sambrook *et al. (ibid)*.
Preferred methods of introducing polynucleotides into host cells include, for
instance, calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated
transfection, transfection, micro-injection, cationic lipid-mediated
transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic
25 introduction or infection.

Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such
as *Streptococci*, *Staphylococci*, *E. coli*, *Streptomyces* and *Bacillus subtilis*
cells; fungal cells, such as yeast cells and *Aspergillus* cells; insect cells such
as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9 cells; animal cells such as CHO,
30 COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 and Bowes melanoma cells; and
plant cells.

A great variety of expression systems can be used, for instance,
chromosomal, episomal and virus-derived systems, *e.g.*, vectors derived

from bacterial plasmids, from bacteriophage, from transposons, from yeast episomes, from insertion elements, from yeast chromosomal elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses, such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, pseudorabies viruses and retroviruses, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, such as cosmids and phagemids. The expression systems may contain control regions that regulate as well as engender expression. Generally, any system or vector that is able to maintain, propagate or express a polynucleotide to produce a polypeptide in a host may be used. The appropriate polynucleotide sequence may be inserted into an expression system by any of a variety of well-known and routine techniques, such as, for example, those set forth in Sambrook *et al.*, (*ibid*). Appropriate secretion signals may be incorporated into the desired polypeptide to allow secretion of the translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum, the periplasmic space or the extracellular environment. These signals may be endogenous to the polypeptide or they may be heterologous signals.

If a polypeptide of the present invention is to be expressed for use in screening assays, it is generally preferred that the polypeptide be produced at the surface of the cell. In this event, the cells may be harvested prior to use in the screening assay. If the polypeptide is secreted into the medium, the medium can be recovered in order to recover and purify the polypeptide. If produced intracellularly, the cells must first be lysed before the polypeptide is recovered.

Polypeptides of the present invention can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography is employed for purification. Well known techniques for refolding proteins may be employed to regenerate active conformation when the polypeptide is denatured during intracellular synthesis, isolation and/or purification.

Polynucleotides of the present invention may be used as diagnostic reagents, through detecting mutations in the associated gene. Detection of a mutated form of the gene characterized by the polynucleotide of SEQ ID NO:1 in the cDNA or genomic sequence and which is associated with a dysfunction will provide a diagnostic tool that can add to, or define, a diagnosis of a disease, or susceptibility to a disease, which results from under-expression, over-expression or altered spatial or temporal expression of the gene. Individuals carrying mutations in the gene may be detected at the DNA level by a variety of techniques well known in the art.

Nucleic acids for diagnosis may be obtained from a subject's cells, such as from blood, urine, saliva, tissue biopsy or autopsy material. The genomic DNA may be used directly for detection or it may be amplified enzymatically by using PCR, preferably RT-PCR, or other amplification techniques prior to analysis. RNA or cDNA may also be used in similar fashion. Deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to the normal genotype. Point mutations can be identified by hybridizing amplified DNA to labeled Phip-180 nucleotide sequences. Perfectly matched sequences can be distinguished from mismatched duplexes by RNase digestion or by differences in melting temperatures. DNA sequence difference may also be detected by alterations in the electrophoretic mobility of DNA fragments in gels, with or without denaturing agents, or by direct DNA sequencing (see, for instance, Myers *et al.*, Science (1985) 230:1242). Sequence changes at specific locations may also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S1 protection or the chemical cleavage method (see Cotton *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85: 4397-4401).

An array of oligonucleotides probes comprising Phip-180 polynucleotide sequence or fragments thereof can be constructed to conduct efficient screening of *e.g.*, genetic mutations. Such arrays are preferably high density arrays or grids. Array technology methods are well known and have general applicability and can be used to address a variety of questions in molecular genetics including gene expression, genetic linkage, and genetic variability, see, for example, M. Chee *et al.*, Science, 274, 610-613 (1996) and other references cited therein.

Detection of abnormally decreased or increased levels of polypeptide or mRNA expression may also be used for diagnosing or determining susceptibility of a subject to a disease of the invention. Decreased or increased expression can be measured at the RNA level using any of the methods well known in the art for the quantitation of polynucleotides, such as, for example, nucleic acid amplification, for instance PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blotting and other hybridization methods. Assay techniques that can be used to determine levels of a protein, such as a polypeptide of the present invention, in a sample derived from a host are well-known to those of skill in the art. Such assay methods include radio-immunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis and ELISA assays.

Thus in another aspect, the present invention relates to a diagnostic kit comprising:

(a) a polynucleotide of the present invention, preferably the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, or a fragment or an RNA transcript thereof;

(b) a nucleotide sequence complementary to that of (a);

(c) a polypeptide of the present invention, preferably the polypeptide of SEQ ID NO:2 or a fragment thereof; or

(d) an antibody to a polypeptide of the present invention, preferably to the polypeptide of SEQ ID NO:2.

It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component. Such a kit will be of use in diagnosing a disease or susceptibility to a disease, particularly diseases of the invention, amongst others.

The polynucleotide sequences of the present invention are valuable for chromosome localisation studies. The sequence is specifically targeted to, and can hybridize with, a particular location on an individual human chromosome. The mapping of relevant sequences to chromosomes according to the present invention is an important first step in correlating those sequences with gene associated disease. Once a sequence has

5 been mapped to a precise chromosomal location, the physical position of the
sequence on the chromosome can be correlated with genetic map data.
Such data are found in, for example, V. McKusick, Mendelian Inheritance in
Man (available on-line through Johns Hopkins University Welch Medical
Library). The relationship between genes and diseases that have been
10 mapped to the same chromosomal region are then identified through linkage
analysis (co-inheritance of physically adjacent genes). Precise human
chromosomal localisations for a genomic sequence (gene fragment etc.)
can be determined using Radiation Hybrid (RH) Mapping (Walter, M.
Spillett, D., Thomas, P., Weissenbach, J., and Goodfellow, P., (1994) A
15 method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes, Nature
Genetics 7, 22-28). A number of RH panels are available from Research
Genetics (Huntsville, AL, USA) e.g. the GeneBridge4 RH panel (Hum Mol
Genet 1996 Mar;5(3):339-46 A radiation hybrid map of the human
genome. Gyapay G, Schmitt K, Fizames C, Jones H, Vega-Czarny N,
20 Spillett D, Muselet D, Prud'Homme JF, Dib C, Auffray C, Morissette J,
Weissenbach J, Goodfellow PN). To determine the chromosomal location
of a gene using this panel, 93 PCRs are performed using primers
designed from the gene of interest on RH DNAs. Each of these DNAs
contains random human genomic fragments maintained in a hamster
25 background (human / hamster hybrid cell lines). These PCRs result in 93
scores indicating the presence or absence of the PCR product of the gene
of interest. These scores are compared with scores created using PCR
products from genomic sequences of known location. This comparison is
conducted at <http://www.genome.wi.mit.edu/>. The gene of the present
invention maps to human chromosome 1p31.

The polynucleotide sequences of the present invention are also valuable
tools for tissue expression studies. Such studies allow the determination of
30 expression patterns of polynucleotides of the present invention which may
give an indication as to the expression patterns of the encoded polypeptides
in tissues, by detecting the mRNAs that encode them. The techniques used
are well known in the art and include in situ hybridization techniques to
clones arrayed on a grid, such as cDNA microarray hybridization (Schena *et*
35 *al*, Science, 270, 467-470, 1995 and Shalon *et al*, Genome Res, 6, 639-645,
1996) and nucleotide amplification techniques such as PCR. A preferred

method uses the TAQMAN (Trade mark) technology available from Perkin Elmer. Results from these studies can provide an indication of the normal function of the polypeptide in the organism. In addition, comparative studies of the normal expression pattern of mRNAs with that of mRNAs encoded by an alternative form of the same gene (for example, one having an alteration in polypeptide coding potential or a regulatory mutation) can provide valuable insights into the role of the polypeptides of the present invention, or that of inappropriate expression thereof in disease. Such inappropriate expression may be of a temporal, spatial or simply quantitative nature.

The polypeptides of the present invention are expressed in tissues of the heart, skeletal muscle, liver, kidney and brain.

A further aspect of the present invention relates to antibodies. The polypeptides of the invention or their fragments, or cells expressing them, can be used as immunogens to produce antibodies that are immunospecific for polypeptides of the present invention. The term "immunospecific" means that the antibodies have substantially greater affinity for the polypeptides of the invention than their affinity for other related polypeptides in the prior art.

Antibodies generated against polypeptides of the present invention may be obtained by administering the polypeptides or epitope-bearing fragments, or cells to an animal, preferably a non-human animal, using routine protocols. For preparation of monoclonal antibodies, any technique which provides antibodies produced by continuous cell line cultures can be used. Examples include the hybridoma technique (Kohler, G. and Milstein, C., *Nature* (1975) 256:495-497), the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor *et al.*, *Immunology Today* (1983) 4:72) and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Techniques for the production of single chain antibodies, such as those described in U.S. Patent No. 4,946,778, can also be adapted to produce single chain antibodies to polypeptides of this invention. Also, transgenic mice, or other organisms, including other mammals, may be used to express humanized antibodies.

The above-described antibodies may be employed to isolate or to identify clones expressing the polypeptide or to purify the polypeptides by affinity chromatography. Antibodies against polypeptides of the present invention may also be employed to treat diseases of the invention, amongst others.

5 Polypeptides and polynucleotides of the present invention may also be used as vaccines. Accordingly, in a further aspect, the present invention relates to a method for inducing an immunological response in a mammal that comprises inoculating the mammal with a polypeptide of the present invention, adequate to produce antibody and/or T cell immune response, including, for example, cytokine-producing T cells or cytotoxic T cells, to protect said animal from disease, whether that disease is already established within the individual or not. An immunological response in a mammal may also be induced by a method comprises delivering a polypeptide of the present invention via a vector directing expression of the polynucleotide and coding for the polypeptide *in vivo* in order to induce such an immunological response to produce antibody to protect said animal from diseases of the invention. One way of administering the vector is by accelerating it into the desired cells as a coating on particles or otherwise. Such nucleic acid vector may comprise DNA, RNA, a modified nucleic acid, or a DNA/RNA hybrid. For use a vaccine, a polypeptide or a nucleic acid vector will be normally provided as a vaccine formulation (composition). The formulation may further comprise a suitable carrier. Since a polypeptide may be broken down in the stomach, it is preferably administered parenterally (for instance, subcutaneous, intra-muscular, intravenous, or intra-dermal injection). Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions that may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes that render the formulation instonic with the blood of the recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that may include suspending agents or thickening agents. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampoules and vials and may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier immediately prior to use. The vaccine formulation may also include adjuvant systems for enhancing the immunogenicity of the formulation, such as oil-in water

10
15
20
25
30
35

systems and other systems known in the art. The dosage will depend on the specific activity of the vaccine and can be readily determined by routine experimentation.

5 Polypeptides of the present invention have one or more biological functions that are of relevance in one or more disease states, in particular the diseases of the invention hereinbefore mentioned. It is therefore useful to identify compounds that stimulate or inhibit the function or level of the polypeptide. Accordingly, in a further aspect, the present invention provides for a method of screening compounds to identify those that stimulate or
10 inhibit the function or level of the polypeptide. Such methods identify agonists or antagonists that may be employed for therapeutic and prophylactic purposes for such diseases of the invention as hereinbefore mentioned. Compounds may be identified from a variety of sources, for example, cells, cell-free preparations, chemical libraries, collections of
15 chemical compounds, and natural product mixtures. Such agonists or antagonists so-identified may be natural or modified substrates, ligands, receptors, enzymes, etc., as the case may be, of the polypeptide; a structural or functional mimetic thereof (see Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology 1(2):Chapter 5 (1991)) or a small molecule. Such small
20 molecules preferably have a molecular weight below 2,000 daltons, more preferably between 300 and 1,000 daltons, and most preferably between 400 and 700 daltons. It is preferred that these small molecules are organic molecules.

25 The screening method may simply measure the binding of a candidate compound to the polypeptide, or to cells or membranes bearing the polypeptide, or a fusion protein thereof, by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound. Alternatively, the screening method may involve measuring or detecting (qualitatively or quantitatively) the competitive binding of a candidate compound to the
30 polypeptide against a labeled competitor (*e.g.* agonist or antagonist). Further, these screening methods may test whether the candidate compound results in a signal generated by activation or inhibition of the polypeptide, using detection systems appropriate to the cells bearing the polypeptide. Inhibitors of activation are generally assayed in the presence
35 of a known agonist and the effect on activation by the agonist by the

presence of the candidate compound is observed. Further, the screening methods may simply comprise the steps of mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide of the present invention, to form a mixture, measuring a Phipip-180 activity in the mixture, and comparing the Phipip-180 activity of the mixture to a control mixture which contains no candidate compound.

Polypeptides of the present invention may be employed in conventional low capacity screening methods and also in high-throughput screening (HTS) formats. Such HTS formats include not only the well-established use of 96- and, more recently, 384-well micotiter plates but also emerging methods such as the nanowell method described by Schullek et al, *Anal Biochem.*, 246, 20-29, (1997).

Fusion proteins, such as those made from Fc portion and Phipip-180 polypeptide, as hereinbefore described, can also be used for high-throughput screening assays to identify antagonists for the polypeptide of the present invention (see D. Bennett *et al.*, *J. Mol. Recognition*, 8:52-58 (1995); and K. Johanson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270(16):9459-9471 (1995)).

Screening techniques

The polynucleotides, polypeptides and antibodies to the polypeptide of the present invention may also be used to configure screening methods for detecting the effect of added compounds on the production of mRNA and polypeptide in cells. For example, an ELISA assay may be constructed for measuring secreted or cell associated levels of polypeptide using monoclonal and polyclonal antibodies by standard methods known in the art. This can be used to discover agents that may inhibit or enhance the production of polypeptide (also called antagonist or agonist, respectively) from suitably manipulated cells or tissues.

A polypeptide of the present invention may be used to identify membrane bound or soluble receptors, if any, through standard receptor binding techniques known in the art. These include, but are not limited to, ligand binding and crosslinking assays in which the polypeptide is labeled with a radioactive isotope (for instance, ^{125}I), chemically modified (for instance,

biotinylated), or fused to a peptide sequence suitable for detection or purification, and incubated with a source of the putative receptor (cells, cell membranes, cell supernatants, tissue extracts, bodily fluids). Other methods include biophysical techniques such as surface plasmon resonance and spectroscopy. These screening methods may also be used to identify agonists and antagonists of the polypeptide that compete with the binding of the polypeptide to its receptors, if any. Standard methods for conducting such assays are well understood in the art.

Examples of antagonists of polypeptides of the present invention include antibodies or, in some cases, oligonucleotides or proteins that are closely related to the ligands, substrates, receptors, enzymes, etc., as the case may be, of the polypeptide, e.g., a fragment of the ligands, substrates, receptors, enzymes, etc.; or a small molecule that bind to the polypeptide of the present invention but do not elicit a response, so that the activity of the polypeptide is prevented.

Screening methods may also involve the use of transgenic technology and PPHP-180 gene. The art of constructing transgenic animals is well established. For example, the PPHP-180 gene may be introduced through microinjection into the male pronucleus of fertilized oocytes, retroviral transfer into pre- or post-implantation embryos, or injection of genetically modified, such as by electroporation, embryonic stem cells into host blastocysts. Particularly useful transgenic animals are so-called "knock-in" animals in which an animal gene is replaced by the human equivalent within the genome of that animal. Knock-in transgenic animals are useful in the drug discovery process, for target validation, where the compound is specific for the human target. Other useful transgenic animals are so-called "knock-out" animals in which the expression of the animal ortholog of a polypeptide of the present invention and encoded by an endogenous DNA sequence in a cell is partially or completely annulled. The gene knock-out may be targeted to specific cells or tissues, may occur only in certain cells or tissues as a consequence of the limitations of the technology, or may occur in all, or substantially all, cells in the animal. Transgenic animal technology also offers a whole animal expression-cloning system in which introduced genes are expressed to give large amounts of polypeptides of the present invention

Screening kits for use in the above described methods form a further aspect of the present invention. Such screening kits comprise:

- (a) a polypeptide of the present invention;
- (b) a membrane expressing a polypeptide of the present invention; or
- 5 (d) recombinant cell expressing a polypeptide of the present invention;
- (c) a cell) an antibody to a polypeptide of the present invention;

polypeptide is preferably that of SEQ ID NO:2.

It which will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component.

10

Glossary

The following definitions are provided to facilitate understanding of certain terms used frequently hereinbefore.

15 "Antibodies" as used herein includes polyclonal and monoclonal antibodies, chimeric, single chain, and humanized antibodies, as well as Fab fragments, including the products of an

Fab or other immunoglobulin expression library.

20 "Isolated" means altered "by the hand of man" from its natural state, *i.e.*, if it occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living organism is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated"; as the term is employed herein. Moreover, a
25 polynucleotide or polypeptide that is introduced into an organism by transformation, genetic manipulation or by any other recombinant method is "isolated" even if it is still present in said organism, which organism may be living or non-living.

5 "Polynucleotide" generally refers to any polyribonucleotide (RNA) or
polydeoxyribonucleotide (DNA), which may be unmodified or modified RNA
or DNA. "Polynucleotides" include, without limitation, single- and double-
stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded
regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is mixture of
10 single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA
and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded
or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition,
"polynucleotide" refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA
or both RNA and DNA. The term "polynucleotide" also includes DNAs or
15 RNAs containing one or more modified bases and DNAs or RNAs with
backbones modified for stability or for other reasons. "Modified" bases
include, for example, tritylated bases and unusual bases such as inosine.
A variety of modifications may be made to DNA and RNA; thus,
"polynucleotide" embraces chemically, enzymatically or metabolically
20 modified forms of polynucleotides as typically found in nature, as well as
the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells.
"Polynucleotide" also embraces relatively short polynucleotides, often
referred to as oligonucleotides.

25 "Polypeptide" refers to any polypeptide comprising two or more amino
acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds,
i.e., peptide isosteres. "Polypeptide" refers to both short chains,
commonly referred to as peptides, oligopeptides or oligomers, and to
longer chains, generally referred to as proteins. Polypeptides may contain
30 amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. "Polypeptides"
include amino acid sequences modified either by natural processes, such
as post-translational processing, or by chemical modification techniques
that are well known in the art. Such modifications are well described in
basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous
35 research literature. Modifications may occur anywhere in a polypeptide,
including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino
or carboxyl termini. It will be appreciated that the same type of
modification may be present to the same or varying degrees at several
sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many
types of modifications. Polypeptides may be branched as a result of

ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched and branched cyclic polypeptides may result from post-translation natural processes or may be made by synthetic methods. Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, biotinylation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cystine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination (see, for instance, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., *Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, 1-12, in *Post-translational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter *et al.*, "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", *Meth Enzymol*, 182, 626-646, 1990, and Rattan *et al.*, "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", *Ann NY Acad Sci*, 663, 48-62, 1992).

"Fragment" of a polypeptide sequence refers to a polypeptide sequence that is shorter than the reference sequence but that retains essentially the same biological function or activity as the reference polypeptide.

"Fragment" of a polynucleotide sequence refers to a polynucleotide sequence that is shorter than the reference sequence of SEQ ID NO:1.

"Variant" refers to a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide, but retains the essential properties thereof. A typical variant of a polynucleotide differs in nucleotide sequence from the reference polynucleotide. Changes in the nucleotide sequence of the variant may or may not alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the

reference sequence, as discussed below. A typical variant of a polypeptide differs in amino acid sequence from the reference polypeptide. Generally, alterations are limited so that the sequences of the reference polypeptide and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, insertions, deletions in any combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code. Typical conservative substitutions include Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; and Phe and Tyr. A variant of a polynucleotide or polypeptide may be naturally occurring such as an allele, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Non-naturally occurring variants of polynucleotides and polypeptides may be made by mutagenesis techniques or by direct synthesis. Also included as variants are polypeptides having one or more post-translational modifications, for instance glycosylation, phosphorylation, methylation, ADP ribosylation and the like. Embodiments include methylation of the N-terminal amino acid, phosphorylations of serines and threonines and modification of C-terminal glycines.

"Allele" refers to one of two or more alternative forms of a gene occurring at a given locus in the genome.

"Polymorphism" refers to a variation in nucleotide sequence (and encoded polypeptide sequence, if relevant) at a given position in the genome within a population.

"Single Nucleotide Polymorphism" (SNP) refers to the occurrence of nucleotide variability at a single nucleotide position in the genome, within a population. An SNP may occur within a gene or within intergenic regions of the genome. SNPs can be assayed using Allele Specific Amplification (ASA). For the process at least 3 primers are required. A common primer is used in reverse complement to the polymorphism being assayed. This common primer can be between 50 and 1500 bps from the polymorphic base. The other two (or more) primers are identical to each other except that the final 3' base wobbles to match one of the two (or more) alleles that make up the polymorphism. Two (or more) PCR reactions are then

conducted on sample DNA, each using the common primer and one of the Allele Specific Primers.

"Splice Variant" as used herein refers to cDNA molecules produced from RNA molecules initially transcribed from the same genomic DNA sequence but which have undergone alternative RNA splicing. Alternative RNA splicing occurs when a primary RNA transcript undergoes splicing, generally for the removal of introns, which results in the production of more than one mRNA molecule each of that may encode different amino acid sequences. The term splice variant also refers to the proteins encoded by the above cDNA molecules.

"Identity" reflects a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, determined by comparing the sequences. In general, identity refers to an exact nucleotide to nucleotide or amino acid to amino acid correspondence of the two polynucleotide or two polypeptide sequences, respectively, over the length of the sequences being compared.

"% Identity" - For sequences where there is not an exact correspondence, a "% identity" may be determined. In general, the two sequences to be compared are aligned to give a maximum correlation between the sequences. This may include inserting "gaps" in either one or both sequences, to enhance the degree of alignment. A % identity may be determined over the whole length of each of the sequences being compared (so-called global alignment), that is particularly suitable for sequences of the same or very similar length, or over shorter, defined lengths (so-called local alignment), that is more suitable for sequences of unequal length.

"Similarity" is a further, more sophisticated measure of the relationship between two polypeptide sequences. In general, "similarity" means a comparison between the amino acids of two polypeptide chains, on a residue by residue basis, taking into account not only exact correspondences between a between pairs of residues, one from each of the sequences being compared (as for identity) but also, where there is not an exact correspondence, whether, on an evolutionary basis, one

residue is a likely substitute for the other. This likelihood has an associated "score" from which the "% similarity" of the two sequences can then be determined.

5 Methods for comparing the identity and similarity of two or more sequences are well known in the art. Thus for instance, programs available in the Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux J et al, Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984, available from Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA), for example the programs BESTFIT and GAP, may be used to determine the % identity between two polynucleotides and the % identity and the % similarity 10 between two polypeptide sequences. BESTFIT uses the "local homology" algorithm of Smith and Waterman (J Mol Biol, 147,195-197, 1981, Advances in Applied Mathematics, 2, 482-489, 1981) and finds the best single region of similarity between two sequences. BESTFIT is more 15 suited to comparing two polynucleotide or two polypeptide sequences that are dissimilar in length, the program assuming that the shorter sequence represents a portion of the longer. In comparison, GAP aligns two sequences, finding a "maximum similarity", according to the algorithm of Needleman and Wunsch (J Mol Biol, 48, 443-453, 1970). GAP is more 20 suited to comparing sequences that are approximately the same length and an alignment is expected over the entire length. Preferably, the parameters "Gap Weight" and "Length Weight" used in each program are 50 and 3, for polynucleotide sequences and 12 and 4 for polypeptide sequences, respectively. Preferably, % identities and similarities are 25 determined when the two sequences being compared are optimally aligned.

Other programs for determining identity and/or similarity between sequences are also known in the art, for instance the BLAST family of programs (Altschul S F et al, J Mol Biol, 215, 403-410, 1990, Altschul S F 30 et al, Nucleic Acids Res., 25:389-3402, 1997, available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, USA and accessible through the home page of the NCBI at www.ncbi.nlm.nih.gov) and FASTA (Pearson W R, Methods in Enzymology, 183, 63-99, 1990; Pearson W R and Lipman D J, Proc Nat

Acad Sci USA, 85, 2444-2448, 1988, available as part of the Wisconsin Sequence Analysis Package).

5 Preferably, the BLOSUM62 amino acid substitution matrix (Henikoff S and Henikoff J G, Proc. Nat. Acad Sci. USA, 89, 10915-10919, 1992) is used in polypeptide sequence comparisons including where nucleotide sequences are first translated into amino acid sequences before comparison.

10 Preferably, the program BESTFIT is used to determine the % identity of a query polynucleotide or a polypeptide sequence with respect to a reference polynucleotide or a polypeptide sequence, the query and the reference sequence being optimally aligned and the parameters of the program set at the default value, as hereinbefore described.

15 "Identity Index" is a measure of sequence relatedness which may be used to compare a candidate sequence (polynucleotide or polypeptide) and a reference sequence. Thus, for instance, a candidate polynucleotide sequence having, for example, an Identity Index of 0.95 compared to a reference polynucleotide sequence is identical to the reference sequence except that the candidate polynucleotide sequence may include on average up to five differences per each 100 nucleotides of the reference sequence. Such differences are selected from the group consisting of at least one nucleotide deletion, substitution, including transition and transversion, or insertion. These differences may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference polynucleotide sequence or anywhere between these terminal positions, interspersed either individually among the nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. In other words, to obtain a polynucleotide sequence having an Identity Index of 0.95 compared to a reference polynucleotide sequence, an average of up to 5 in every 100 of the nucleotides of the in the reference sequence may be deleted, substituted or inserted, or any combination thereof, as hereinbefore described. The same applies *mutatis mutandis* for other values of the Identity Index, for instance 0.96, 0.97, 0.98 and 0.99.

20

25

30

Similarly, for a polypeptide, a candidate polypeptide sequence having, for example, an Identity Index of 0.95 compared to a reference polypeptide sequence is identical to the reference sequence except that the polypeptide sequence may include an average of up to five differences per each 100 amino acids of the reference sequence. Such differences are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion. These differences may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between these terminal positions, interspersed either individually among the amino acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. In other words, to obtain a polypeptide sequence having an Identity Index of 0.95 compared to a reference polypeptide sequence, an average of up to 5 in every 100 of the amino acids in the reference sequence may be deleted, substituted or inserted, or any combination thereof, as hereinbefore described. The same applies *mutatis mutandis* for other values of the Identity Index, for instance 0.96, 0.97, 0.98 and 0.99.

The relationship between the number of nucleotide or amino acid differences and the Identity Index may be expressed in the following equation:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot I),$$

in which:

n_a is the number of nucleotide or amino acid differences,

x_a is the total number of nucleotides or amino acids in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, respectively,

I is the Identity Index,

\cdot is the symbol for the multiplication operator, and

in which any non-integer product of x_a and I is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from x_a .

- "Homolog" is a generic term used in the art to indicate a polynucleotide or polypeptide sequence possessing a high degree of sequence relatedness to a reference sequence. Such relatedness may be quantified by determining the degree of identity and/or similarity between the two sequences as hereinbefore defined. Falling within this generic term are the terms "ortholog", and "paralog". "Ortholog" refers to a polynucleotide or polypeptide that is the functional equivalent of the polynucleotide or polypeptide in another species. "Paralog" refers to a polynucleotide or polypeptide that within the same species which is functionally similar.
- "Fusion protein" refers to a protein encoded by two, unrelated, fused genes or fragments thereof. Examples have been disclosed in US 5541087, 5726044. In the case of Fc-PHPIP-180, employing an immunoglobulin Fc region as a part of a fusion protein is advantageous for performing the functional expression of Fc-PHPIP-180 or fragments of PHPIP-180, to improve pharmacokinetic properties of such a fusion protein when used for therapy and to generate a dimeric PHPIP-180. The Fc-PHPIP-180 DNA construct comprises in 5' to 3' direction, a secretion cassette, i.e. a signal sequence that triggers export from a mammalian cell, DNA encoding an immunoglobulin Fc region fragment, as a fusion partner, and a DNA encoding PHPIP-180 or fragments thereof. In some uses it would be desirable to be able to alter the intrinsic functional properties (complement binding, Fc-Receptor binding) by mutating the functional Fc sides while leaving the rest of the fusion protein untouched or delete the Fc part completely after expression.
- All publications and references, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference in their entirety as if each individual publication or reference were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as being fully set forth. Any patent application to which this application claims priority is also incorporated by reference herein in its entirety in the manner described above for publications and references.

Further examples**Plasmid Constructs**

(All plasmids were verified by sequencing)

Cloning of pDBLeu – PHP1

- 5 The cDNA encoding PHP1 was amplified by PCR using the primers Hispase-Sal-up (SEQ ID NO: 3, primer 1) and Hispase-Not-low (SEQ ID NO: 4, primer 2) and ligated into vector pCR2.1TOPO (Invitrogen). Subsequently, the vector was cleaved using Sal1 and Not1 and the PHP1-encoding fragment was ligated into pDBLeu.

10 *Cloning of pLexA-MCS – PHP1*

Oligonucleotide primer 3 Y2H-MCS1 (SEQ ID NO. 5) and primer 4 SEQ ID NO. 6 Y2H-MCS2 were annealed and ligated into EcoR1 and Sal1 restigated vector pLexA (Clontech) to generate Vector pLexA-MCS containing unique EcoR1, Sal1, Xho1 and Not1 restriction sites.

- 15 A fragment encoding PHP1 was isolated from Vector pDBLeu-PHP1 using Not1 and Sal1 and ligated into Vector pLexA-MCS to generate pLexA-MCS-PHP1. All vectors were confirmed by sequencing.

Fusionproteins

- 20 The peptide sequence of the Gal4-PHP1 fusion protein is given in SEQ ID NO: 7 comprising the Gal4 protein and a C-terminally linked full length PHP-1 protein. The corresponding peptide sequence of the LexA-PHP-1 fusion protein comprised the LexA protein sequence and a C-terminally linked full length PHP-1 protein. The sequence has been disclosed in SEQ ID NO: 8.

25

Yeast-Two Hybrid Screen to select PHP1-interacting proteins.

The yeast two-hybrid screening method is technically simple and very rapid such that several million of library clones can be screened in just a

5 few days. All of the elements of the system are commercially available. In the screen, the His3 indicator gene will only be activated if the DNA binding domain of Gal4 (AA 1-147) and the Gal4 transactivation domain (AA 768-881) fused to the NLS of the SV40 large T antigen are brought into contact by the receptor Histidine Phosphatase and a protein ligand interaction. Although the ligands isolated from this screen bind to Histidine Phosphatase the binding partners have been confirmed in a second different - LexA-based Yeast-Two Hybrid selection scheme. If both screening procedures are implemented concurrently, ligands obtained may be tested in other systems.

10 A yeast Two Hybrid screen (Proquest, Life Technologies) using pDBLeu-PHP1 as bait construct and a HELA-based cDNA library as prey was performed as described (selection was performed on -Trp, -Leu, -His Minimalmedium containing 25 mM 3-Aminotriazole). Interaction was confirmed on Medium lacking Uracile, Tryptophane and Leucine as described in the manufacturers protocoll.

15 One positive clone representing a PHPIP-180 – gene product was isolated and sequenced.

20 Confirmation of the PHPIP-180 ligand interaction using a LexA-based Yeast-Two Hybrid selection scheme:

To confirm the interaction in a different selection scheme, the Matchmaker LexA Two-Hybrid system (Clontech) was used due to manufacturers conditions. Vector pLexA-MCS-PHP1 was used as bait. Vector pPC86-PHPIP120, which was isolated in the Gal4 based Yeast Two Hybrid system as described above was used as prey.

25 Interaction of p53 and large T antigen were used as positive controls in *S. cerevisiae* strain EGY48-pSH18-32.

In silico analysis

30 The gene for the PHP1 ligand identified in above mentioned yeast-two-hybrid screen is located on human chromosome 1p31.. The identified gene

WO 03/006493

31

PCT/EP02/07728

encodes a protein of 571 AA length, with no significant sequence
homology to other known proteins. While partial sequences of this gene
and their corresponding virtual ORF predictions have already been
deposited in the databank a protein function as revealed in this study has
s not been described previously.

Claims

1. A PHPIP-180 polypeptide selected from the group consisting of:
 - (a) a polypeptide encoded by a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO:1;
 - 5 (b) a polypeptide comprising a polypeptide sequence having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
 - (c) a polypeptide having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
 - (d) the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and
 - 10 (e) fragments and variants of such polypeptides in (a) to (d),
said PHPIP-180 ligand of (a) to (d) having the ability to bind specifically to Survivin or a variant thereof.

- 15 2. The polypeptide of claim 1 comprising the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2.

3. The polypeptide of claim 1 which is the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2.

4. A polynucleotide selected from the group consisting of:
 - 20 (a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least 95% identity to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1;
 - (b) a polynucleotide having at least 95% identity to the polynucleotide of SEQ ID NO:1;
 - 25 (c) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;

- (d) a polynucleotide having a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
- 5 (e) a polynucleotide with a nucleotide sequence of at least 100 nucleotides obtained by screening a library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO: 1 or a fragment thereof having at least 15 nucleotides;
- (f) a polynucleotide which is the RNA equivalent of a polynucleotide of (a) to (e);
- 10 (g) a polynucleotide sequence complementary to said polynucleotide of any one of (a) to (f), and
- (h) polynucleotides that are variants or fragments of the polynucleotides of any one of (a) to (g) or that are complementary to above mentioned polynucleotides, over the entire length thereof.
- 15
5. A polynucleotide of claim 4 selected from the group consisting of:
- (a) a polynucleotide comprising the polynucleotide of SEQ ID NO:1;
- (b) the polynucleotide of SEQ ID NO:1;
- (c) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2; and
- 20 (d) a polynucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2.
6. An expression system comprising a polynucleotide capable of producing a polypeptide of any one of claim 1-3 when said expression vector is present in a compatible host cell.
- 25

7. A recombinant host cell comprising the expression vector of claim 6 or a membrane thereof expressing the polypeptide of any one of claim 1-3.
8. A process for producing a polypeptide of any one of claim 1-3 comprising the step of culturing a host cell as defined in claim 7 under conditions sufficient for the production of said polypeptide and recovering the polypeptide from the culture medium.
9. A fusion protein consisting of the Immunoglobulin Fc-region and a polypeptide any one one of claims 1-3.
10. An antibody immunospecific for the polypeptide of any one of claims 1 to 3.
11. A method for screening to identify compounds that stimulate or inhibit the function or level of the polypeptide of any one of claim 1-3 comprising a method selected from the group consisting of:
- (a) measuring or, detecting, quantitatively or qualitatively, the binding of a candidate compound to the polypeptide (or to the cells or membranes expressing the polypeptide) or a fusion protein thereof by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound;
 - (b) measuring the competition of binding of a candidate compound to the polypeptide (or to the cells or membranes expressing the polypeptide) or a fusion protein thereof in the presence of a labeled competitor;
 - (c) testing whether the candidate compound results in a signal generated by activation or inhibition of the polypeptide, using detection systems appropriate to the cells or cell membranes expressing the polypeptide;
 - (d) mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide of any one of claims 1-3, to form a mixture, measuring activity of the polypeptide in the mixture, and comparing the activity of the mixture to a control mixture which contains no candidate compound; or

(e) detecting the effect of a candidate compound on the production of mRNA encoding said polypeptide or said polypeptide in cells, using for instance, an ELISA assay, and

(f) producing said compound according to biotechnological or chemical standard techniques.

WO 03/006493

1/11

PCT/EP02/07728

SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH
 5 <120> Histidine phosphatase interacting protein
 <130> PHPIE180RKWS
 10 <140>
 <141>
 <160> 8
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 3312
 <212> DNA
 20 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(1715)
 25 <400> 1
 ct aaa ggt gtt att tca att agc aaa agc aca gag agg ctt tcc ccc 47
 Lys Gly Val Ile Ser Ile Ser Lys Ser Thr Glu Arg Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 30 cta atg aaa gat atc aag tct aat aaa ttc aaa aag tca cag agt atc 95
 Leu Met Lys Asp Ile Lys Ser Asn Lys Phe Lys Lys Ser Gln Ser Ile
 20 25 30
 35 gat gag att gac att ggt aca tat aag gtg tat aac ata cca tta gaa
 143
 Asp Glu Ile Asp Ile Gly Thr Tyr Lys Val Tyr Asn Ile Pro Leu Glu
 35 40 45
 40 aac tat gct tct ggg agt gat cac tta gga agc cac gaa cga ccg gat
 191
 Asn Tyr Ala Ser Gly Ser Asp His Leu Gly Ser His Glu Arg Pro Asp
 50 55 60
 45 aag atg ctg gga cca gag cat ggt atg tcc agt atg tct cga agc cag
 239
 Lys Met Leu Gly Pro Glu His Gly Met Ser Ser Met Ser Arg Ser Gln
 65 70 75
 50 tca gtc cca atg ctg gat gat gag atg ctc acc tac gga agt agt aag
 287
 Ser Val Pro Met Leu Asp Asp Glu Met Leu Thr Tyr Gly Ser Ser Lys
 80 85 90 95
 55 ggg cca caa caa caa aaa gct tct atg aca aaa aaa gtc tat cag ttt
 335
 Gly Pro Gln Gln Gln Lys Ala Ser Met Thr Lys Lys Val Tyr Gln Phe
 100 105 110

WO 03/006493

2/11

PCT/EP02/07728

```

gac caa agc ttc aat cct caa gga tca gtg gaa gtg aaa gcc gaa aag
383
5 Asp Gln Ser Phe Asn Pro Gln Gly Ser Val Glu Val Lys Ala Glu Lys
115 120 125

agg ata cca ccc cct ttt caa cac aat ccc gag tac gtg caa cag gcc
431
10 Arg Ile Pro Pro Phe Gln His Asn Pro Glu Tyr Val Gln Gln Ala
130 135 140

agc aaa aac atc gcc aag gat ttg att agt cct aga gct tac aga gga
479
15 Ser Lys Asn Ile Ala Lys Asp Leu Ile Ser Pro Arg Ala Tyr Arg Gly
145 150 155

tac cca ccg atg gag caa atg ttt tca ttt tct cag cca tct gtg aat
527
20 Tyr Pro Pro Met Glu Gln Met Phe Ser Phe Ser Gln Pro Ser Val Asn
160 165 170 175

gag gat gct gtg gtg aat gcc cag ttc gca agc caa ggg gcc agg gcg
575
25 Glu Asp Ala Val Val Asn Ala Gln Phe Ala Ser Gln Gly Ala Arg Ala
180 185 190

ggc ttc ctg aga agg gcc gac tcc ctg gtg agc gcc aca gaa atg gcc
623
30 Gly Phe Leu Arg Arg Ala Asp Ser Leu Val Ser Ala Thr Glu Met Ala
195 200 205

atg ttt aga agg gtc aat gag cct cat gag ctg ccc cca act gat agg
671
35 Met Phe Arg Arg Val Asn Glu Pro His Glu Leu Pro Pro Thr Asp Arg
210 215 220

tac ggc aga ccc cca tat agg gga ggg ctg gat cgc caa agc agc gtt
719
40 Tyr Gly Arg Pro Pro Tyr Arg Gly Gly Leu Asp Arg Gln Ser Ser Val
225 230 235

aca gtg act gag tcc cag ttc ctg aaa agg aat ggc agg tat gaa gat
767
45 Thr Val Thr Glu Ser Gln Phe Leu Lys Arg Asn Gly Arg Tyr Glu Asp
240 245 250

gaa cac cct tca tat caa gaa gtg aaa gct cag gcg gga agt ttt ccg
815
50 Glu His Pro Ser Tyr Gln Glu Val Lys Ala Gln Ala Gly Ser Phe Pro
260 265 270

gtt aaa aac ctt acc caa agg agg cca ttg tct gcg aga agc tac agt
863
55 Val Lys Asn Leu Thr Gln Arg Arg Pro Leu Ser Ala Arg Ser Tyr Ser
275 280 285

aca gag agt tac ggt gcc tcc caa acc agg cca gtt tca gct agg cct
911

```

WO 03/006493

3/11

PCT/EP02/07728

Thr Glu Ser Tyr Gly Ala Ser Gln Thr Arg Pro Val Ser Ala Arg Pro
 290 295 300
 act atg gca gct ctt ttg gaa aaa ata cca tct gac tat aac ttg ggt
 5 959
 Thr Met Ala Ala Leu Leu Glu Lys Ile Pro Ser Asp Tyr Asn Leu Gly
 305 310 315
 aac tat ggt gac aag cca tca gat aac agt gat tta aag acg agg cct
 10 1007
 Asn Tyr Gly Asp Lys Pro Ser Asp Asn Ser Asp Leu Lys Thr Arg Pro
 320 325 330 335
 act cct gtg aag gga gag gag agc tgt ggt aaa atg cct gca gac tgg
 15 1055
 Thr Pro Val Lys Gly Glu Glu Ser Cys Gly Lys Met Pro Ala Asp Trp
 340 345 350
 aga caa cag ctg ctt aga cat ata gaa gct aga cgg tta gac agg acc
 20 1103
 Arg Gln Gln Leu Leu Arg His Ile Glu Ala Arg Arg Leu Asp Arg Thr
 355 360 365
 ccg tcc cag caa agc aac att tta gac aat gga caa gaa gat gta tct
 25 1151
 Pro Ser Gln Gln Ser Asn Ile Leu Asp Asn Gly Gln Glu Asp Val Ser
 370 375 380
 cct agt ggc caa tgg aat cct tat cca ctt ggg agg cgg gat gta cct
 30 1199
 Pro Ser Gly Gln Trp Asn Pro Tyr Pro Leu Gly Arg Arg Asp Val Pro
 385 390 395
 ccg gac acc att act aag aag gca ggc agc cac atc cag acg ttg atg
 35 1247
 Pro Asp Thr Ile Thr Lys Lys Ala Gly Ser His Ile Gln Thr Leu Met
 400 405 410 415
 ggg tcc caa agc ctt cag cat cgc agc cgg gag cag cag ccg tat gaa
 40 1295
 Gly Ser Gln Ser Leu Gln His Arg Ser Arg Glu Gln Gln Pro Tyr Glu
 420 425 430
 gga aat ata aac aaa gtg acc atc cag caa ttt cag tca cca ttg cct
 45 1343
 Gly Asn Ile Asn Lys Val Thr Ile Gln Gln Phe Gln Ser Pro Leu Pro
 435 440 445
 att cag atc ccc tct toa cag gcc acc cgg gga cct cag cct gga cgg
 50 1391
 Ile Gln Ile Pro Ser Ser Gln Ala Thr Arg Gly Pro Gln Pro Gly Arg
 450 455 460
 tgc tta att caa act aaa ggg caa agg agt atg gat gga tat cca gag
 55 1439
 Cys Leu Ile Gln Thr Lys Gly Gln Arg Ser Met Asp Gly Tyr Pro Glu
 465 470 475

WO 03/006493

4/11

PCT/EP02/07728

```

cag ttt tgt gtg aga ata gaa aag aat cct ggc ctt gga ttt agt atc
1487
Gln Phe Cys Val Arg Ile Glu Lys Asn Pro Gly Leu Gly Phe Ser Ile
480           485           490           495
5  agt ggt gga att agt gga caa gga aat cca ttc aaa cct tct gac aag
1535
Ser Gly Gly Ile Ser Gly Gln Gly Asn Pro Phe Lys Pro Ser Asp Lys
500           505           510
10 ggt atc ttt gtt act agg gtt cag cct gat ggg cca gca tca aac cta
1583
Gly Ile Phe Val Thr Arg Val Gln Pro Asp Gly Pro Ala Ser Asn Leu
515           520           525
15 ctg cag cct ggt gat aag atc ctt cag gca aat gga cac agt ttt gta
1631
Leu Gln Pro Gly Asp Lys Ile Leu Gln Ala Asn Gly His Ser Phe Val
530           535           540
20 cat atg gaa cat gaa aaa gct gta tta cta ctg aag agt ttc cag aac
1679
His Met Glu His Glu Lys Ala Val Leu Leu Leu Lys Ser Phe Gln Asn
545           550           555
25 aca gta gac cta gtt att caa cgt gag ctt act gtc taaatatttt
1725
Thr Val Asp Leu Val Ile Gln Arg Glu Leu Thr Val
560           565           570
30 ttataaatag tgaagatagc tctagccaga cctaatgttc aaaaataaat ttatacatag
1785
aaacaaattt tgccaattgc tggaccaatg gcaaacatta gtgccaatg tataatacta
1845
tatgttagca ctgaccatcc ttaaaaaatg ttaactctat aaatatgatg ttcatgtggt
1905
40 tatgtattag ttttaattgt cagcctctgg ctgtgcattg gtgcagtttt gttctgttt
1965
ttgttttgt ttttaatcaa ataagttct tctcaaaatg gatttcatat aatttcggag
2025
45 cncggaagca cacacaagct ctttatgaat tctgtctccc atcagaaaca ctgacctaaa
2085
gttgatatag cctttatata gaaatacaaa atataagaa ttgtaattcc cataaaatat
50 2145
ttctagcaca aggtatatgt tggcatatat acaaaaagaa tatagagaaa aacaatattt
2205
55 tcataaacta aacatctcag atagagaaaa aatatatctt aaaataagac tttactatat
2265

```

WO 03/006493

5/11

PCT/EP02/07728

```

tgaatctttt tcaataaaaa ttacatgata atgccttatg aaagtaactg tacatatggt
2325
5 ataaagtgtt tatatttggg tccatattca ttgctaagt tctcatgaca cagagtgaaa
2385
tatttcataa attagccatt tatctctggg acccaataa aaataggatg aactaattg
2445
10 tccaatgcct ttagctaatt acaatacatg cagagtttag aacagaacta aaggtcattg
2505
tagttaagtc ttttcacca caaatttaag cagtggatga tgggtggcag gaaaggtatt
2565
15 gctttatttc ttccaagttc atgttgatta taaactgtag cccctgtgat ttcttactt
2625
20 gtaaatgtgg aatttatttg tgtgttgctt aatctaattt gctgcttttt aaattattta
2685
aaacgaattt tggaaattga taaaatttat cattacgaaa gactgctggt agaaagttat
2745
25 ggtaggatgat tttaaatcct tggattttaa atatgaaact tcaaatataa tttctcagag
2805
ctgtggctca cctgtatcat taatttcaat ggctgttttt ctgggcagaa atagataaaa
2865
30 taactttttt ccaaaaaacag ttccaaggta tgtaaaatcc tgaatgcttt ttcactgaag
2925
agaagagcaa gcatgggttaa tgtagaatta tttacttttc cattgaaact atttctctgc
2985
35 ataaatgac aaaatttatt ttataatcct ttaaaatact tatctttcat attagtcaat
3045
40 aatttaatta caatattaat ttgaatttcc aggataattt ccoggagtgt gttgatgca
3105
ttatctttca taattttaca tagttctttt gttatataat gaatttactt tacatgctag
3165
45 tgtttcaagt attgtatgag gattttcaca atagtatcac tgaatgatgt caccagagct
3225
50 ctgagaataa tattttgtaag ttaactgttt tatggggaca ttgaaaatat tgtatttttg
3285
tagggctcat taaaatgagt gtcactt
3312
55 <210> 2
<211> 571
<212> PRT
```

WO 03/006493

6/11

PCT/EP02/07728

<213> Homo sapiens
 <400> 2
 5 Lys Gly Val Ile Ser Ile Ser Lys Ser Thr Glu Arg Leu Ser Pro Leu
 1 5 10 15
 Met Lys Asp Ile Lys Ser Asn Lys Phe Lys Lys Ser Gln Ser Ile Asp
 20 25 30
 10 Glu Ile Asp Ile Gly Thr Tyr Lys Val Tyr Asn Ile Pro Leu Glu Asn
 35 40 45
 Tyr Ala Ser Gly Ser Asp His Leu Gly Ser His Glu Arg Pro Asp Lys
 50 55 60
 15 Met Leu Gly Pro Glu His Gly Met Ser Ser Met Ser Arg Ser Gln Ser
 65 70 75 80
 Val Pro Met Leu Asp Asp Glu Met Leu Thr Tyr Gly Ser Ser Lys Gly
 85 90 95
 20 Pro Gln Gln Gln Lys Ala Ser Met Thr Lys Lys Val Tyr Gln Phe Asp
 100 105 110
 25 Gln Ser Phe Asn Pro Gln Gly Ser Val Glu Val Lys Ala Glu Lys Arg
 115 120 125
 Ile Pro Pro Pro Phe Gln His Asn Pro Glu Tyr Val Gln Gln Ala Ser
 130 135 140
 30 Lys Asn Ile Ala Lys Asp Leu Ile Ser Pro Arg Ala Tyr Arg Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Pro Met Glu Gln Met Phe Ser Phe Ser Gln Pro Ser Val Asn Glu
 165 170 175
 35 Asp Ala Val Val Asn Ala Gln Phe Ala Ser Gln Gly Ala Arg Ala Gly
 180 185 190
 40 Phe Leu Arg Arg Ala Asp Ser Leu Val Ser Ala Thr Glu Met Ala Met
 195 200 205
 Phe Arg Arg Val Asn Glu Pro His Glu Leu Pro Pro Thr Asp Arg Tyr
 210 215 220
 45 Gly Arg Pro Pro Tyr Arg Gly Gly Leu Asp Arg Gln Ser Ser Val Thr
 225 230 235 240
 Val Thr Glu Ser Gln Phe Leu Lys Arg Asn Gly Arg Tyr Glu Asp Glu
 245 250 255
 50 His Pro Ser Tyr Gln Glu Val Lys Ala Gln Ala Gly Ser Phe Pro Val
 260 265 270
 55 Lys Asn Leu Thr Gln Arg Arg Pro Leu Ser Ala Arg Ser Tyr Ser Thr
 275 280 285
 Glu Ser Tyr Gly Ala Ser Gln Thr Arg Pro Val Ser Ala Arg Pro Thr

WO 03/006493

8/11

PCT/EP02/07728

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 1
 5 <400> 3
 tttgtcgac catggcgggtg gcggacctcg 30

10 <210> 4
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2
 <400> 4
 20 tttgcggcc gctcagtagc cgtcgttagc c 31

<210> 5
 <211> 29
 <212> DNA
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 3
 30 <400> 5
 aattccaggt cgacctcgag gcggccgct 29

<210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 4
 40 <400> 6
 tcgaaccggc cgcctcgagg tcgacctgg 29

45 <210> 7
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 50 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Fusionprotein
 Gal-4 PHPI
 55 <400> 7
 Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
 1 5 10 15

WO 03/006493

9/11

PCT/EP02/07728

Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
 20 25 30
 5 Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro
 35 40 45
 Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu
 50 55 60
 10 Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile
 65 70 75 80
 Leu Lys Met Asp Ser Leu Glu Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu
 85 90 95
 15 Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala
 100 105 110
 20 Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser
 115 120 125
 Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu
 130 135 140
 25 Thr Val Ser Ser Arg Ser Thr Met Ala Val Ala Asp Leu Ala Leu Ile
 145 150 155 160
 Pro Asp Val Asp Ile Asp Ser Asp Gly Val Phe Lys Tyr Val Leu Ile
 165 170 175
 30 Arg Val His Ser Ala Pro Arg Ser Gly Ala Pro Ala Ala Glu Ser Lys
 180 185 190
 35 Glu Ile Val Arg Gly Tyr Lys Trp Ala Glu Tyr His Ala Asp Ile Tyr
 195 200 205
 Asp Lys Val Ser Gly Asp Met Gln Lys Gln Gly Cys Asp Cys Glu Cys
 210 215 220
 40 Leu Gly Gly Gly Arg Ile Ser His Gln Ser Gln Asp Lys Lys Ile His
 225 230 235 240
 Val Tyr Gly Tyr Ser Met Ala Tyr Gly Pro Ala Gln His Ala Ile Ser
 245 250 255
 45 Thr Glu Lys Ile Lys Ala Lys Tyr Pro Asp Tyr Glu Val Thr Trp Ala
 260 265 270
 50 Asn Asp Gly Tyr
 275
 <210> 8
 <211> 332
 55 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

WO 03/006493

10/11

PCT/EP02/07728

<223> Description of Artificial Sequence: Fusionprotein
LexA-PHP1

<400> 8
5 Met Lys Ala Leu Thr Ala Arg Gln Gln Glu Val Phe Asp Leu Ile Arg
1 5 10 15
Asp His Ile Ser Gln Thr Gly Met Pro Pro Thr Arg Ala Glu Ile Ala
20 25 30
10 Gln Arg Leu Gly Phe Arg Ser Pro Asn Ala Ala Glu Glu His Leu Lys
35 40 45
Ala Leu Ala Arg Lys Gly Val Ile Glu Ile Val Ser Gly Ala Ser Arg
15 50 55 60
Gly Ile Arg Leu Leu Gln Glu Glu Glu Gly Leu Pro Leu Val Gly
65 70 75 80
20 Arg Val Ala Ala Gly Glu Pro Leu Leu Ala Gln Gln His Ile Glu Gly
85 90 95
His Tyr Gln Val Asp Pro Ser Leu Phe Lys Pro Asn Ala Asp Phe Leu
100 105 110
25 Leu Arg Val Ser Gly Met Ser Met Lys Asp Ile Gly Ile Met Asp Gly
115 120 125
Asp Leu Leu Ala Val His Lys Thr Gln Asp Val Arg Asn Gly Gln Val
130 135 140
Val Val Ala Arg Ile Asp Asp Glu Val Thr Val Lys Arg Leu Lys Lys
145 150 155 160
35 Gln Gly Asn Lys Val Glu Leu Leu Pro Glu Asn Ser Glu Phe Lys Pro
165 170 175
Ile Val Val Asp Leu Arg Gln Gln Ser Phe Thr Ile Glu Gly Leu Ala
180 185 190
40 Val Gly Val Ile Arg Asn Gly Asp Trp Leu Glu Phe Arg Ser Thr Met
195 200 205
Ala Val Ala Asp Leu Ala Leu Ile Pro Asp Val Asp Ile Asp Ser Asp
210 215 220
Gly Val Phe Lys Tyr Val Leu Ile Arg Val His Ser Ala Pro Arg Ser
225 230 235 240
50 Gly Ala Pro Ala Ala Glu Ser Lys Glu Ile Val Arg Gly Tyr Lys Trp
245 250 255
Ala Glu Tyr His Ala Asp Ile Tyr Asp Lys Val Ser Gly Asp Met Gln
260 265 270
55 Lys Gln Gly Cys Asp Cys Glu Cys Leu Gly Gly Gly Arg Ile Ser His
275 280 285

WO 03/006493

11/11

PCT/EP02/07728

Gln Ser Gln Asp Lys Lys Ile His Val Tyr Gly Tyr Ser Met Ala Tyr
290 295 300
5 Gly Pro Ala Gln His Ala Ile Ser Thr Glu Lys Ile Lys Ala Lys Tyr
305 310 315 320
Pro Asp Tyr Glu Val Thr Trp Ala Asn Asp Gly Tyr
325 330

【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
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/006493 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47, C12N 15/12, 15/62, G01N 33/50, C07K 16/18
- (21) International Application Number: PCT/JP02/07728
- (22) International Filing Date: 11 July 2002 (11.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01116640.2 13 July 2001 (13.07.2001) JP
- (71) Applicant (for all designated States except US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, P.O. Box, 64271 Darmstadt (DE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KELLNER, Ronald [DE/DE]; Am Katzenpfad 10, 64646 Heppenheim (DE); HOCK, Björn [DE/DE]; Nordstrasse 2a, 63477 Maintal (DE).
- (74) Common Representative: MERCK PATENT GMBH; Frankfurter Strasse 250, 64271 Darmstadt (DE).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, UM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 2 October 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/006493 A3

(54) Title: HISTIDINE PHOSPHATASE INTERACTING PROTEIN WITH 180KD

(57) Abstract: PIPIP-180 polypeptides and polynucleotides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques are disclosed. Also disclosed are methods for utilizing PIPIP-180 polypeptides and polynucleotides in diagnostic assays.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/07728
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C12N15/12 C12N15/62 G01N33/50 C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 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)		
BIOSIS, EMBL, MEDLINE, WPI Data, EMBASE, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAGASE T ET AL: "PREDICTION OF THE CODING SEQUENCES OF UNIDENTIFIED HUMAN GENES. XVITHE COMPLETE SEQUENCES OF 150 NEW CDNA CLONES FROM BRAIN WHICH CODE FOR LARGE PROTEINS IN VITRO" NEW YORK TIMES, NEW YORK, NY, US, vol. 7, 2000, pages 65-73, XP000923011 The DNA and polypeptide sequences of KIAA1365 comprise the sequences of SEQ IDs N ^o 1 and 2 respectively. abstract; tables 1,2 --- ---	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** 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 ** 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. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
11 July 2003	29/07/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Loubradou, G	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/07728

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	APPERSON MICHELLE L II SOO MOON ET AL: "Characterization of densin-180, a new brain-specific synaptic protein of the O-sialoglycoprotein family." JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 16, no. 21, 1996, pages 6839-6852, XP002247309 ISSN: 0270-6474 abstract; figure 2 ---	1-11
E	WO 02 081629 A (MALYANKAR URIEL M; EDINGER SHLOMIT R ; SPYTEK KIMBERLY A (US); LI L) 17 October 2002 (2002-10-17) The DNA and polypeptide sequences of NOV7 comprise SEQ ID N°1 and 2, respectively. the whole document ---	1-11
A	STRACK STEFAN ET AL: "Association of calcium/calmodulin-dependent kinase II with developmentally regulated splice variants of the postsynaptic density protein densin-180." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 33, 18 August 2000 (2000-08-18), pages 25061-25064, XP002247310 ISSN: 0021-9258 abstract; figure 1 ---	
A	WALIKONIS RANDALL S ET AL: "Densin-180 forms a ternary complex with the alpha-subunit of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II and alpha-actinin." JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 21, no. 2, 15 January 2001 (2001-01-15), pages 423-433, XP002247311 ISSN: 0270-6474 the whole document ---	
P,A	IZAWA ICHIRO ET AL: "Densin-180 interacts with delta-catenin/neural plakophilin-related armadillo repeat protein at synapses." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 7, 15 February 2002 (2002-02-15), pages 5345-5350, XP002247312 February 15, 2002 ISSN: 0021-9258 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 02/07728

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02081629 A	17-10-2002	WO 02081625 A2	17-10-2002
		WO 02081629 A2	17-10-2002
		WO 02081498 A2	17-10-2002
		WO 02085922 A2	31-10-2002
		WO 02083841 A2	24-10-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/531	Z
G 0 1 N 33/531	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100088328

弁理士 金田 暢之

(74) 代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74) 代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72) 発明者 ケルナー、 ロウラント

ドイツ連邦共和国 6 4 6 4 6 ヘベンハイム アム カツエンプファト 1 0

(72) 発明者 ホック、 ビョーン

ドイツ連邦共和国 6 3 4 7 7 マイントル ノルトシュトラッセ 2 アー

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 DA13 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA80 CA07 GA11 HA20

4B063 QA18 QQ08 QQ53 QQ79 QQ96 QR48 QR54 QR58 QS33 QX02

4B064 AG01 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46

4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	组氨酸·磷酸酶相互作用蛋白在180 kD		
公开(公告)号	JP2005506059A	公开(公告)日	2005-03-03
申请号	JP2003512263	申请日	2002-07-11
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	ケルナーロウラント ホックビョーン		
发明人	ケルナー、ロウラント ホック、ビョーン		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/531		
CPC分类号	C07K14/47 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.A C07K14/47.ZNA C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/531.Z C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024 /BA80 4B024/CA07 4B024/GA11 4B024/HA20 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR54 4B063/QR58 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064 /AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045 /AA20 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	宫崎昭雄 伊藤 克博		
优先权	2001116640 2001-07-13 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了PHPIP-180的多肽和多核苷酸以及通过重组技术产生这种多肽的方法。还公开了在诊断测定中使用PHPIP-180多肽和多核苷酸的方法。