

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-507239

(P2004-507239A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/705	C O 7 K 14/705	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28	C O 7 K 16/28	4 B O 5 0
C O 7 K 16/40	C O 7 K 16/40	4 B O 6 3
C O 7 K 19/00	C O 7 K 19/00	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-522235 (P2002-522235)	(71) 出願人	591032596
(86) (22) 出願日	平成13年8月13日 (2001.8.13)		メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ ト ベシユレンクテル ハフトング
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月18日 (2003.2.18)		Merck Patent Gesell schaft mit beschræ nkter Haftung
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/009326		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
(87) 国際公開番号	W02002/016561		Frankfurter Str. 25 0, D-64293 Darmstadt , Federal Republic o f Germany
(87) 国際公開日	平成14年2月28日 (2002.2.28)		
(31) 優先権主張番号	00117781.5	(74) 代理人	100123788
(32) 優先日	平成12年8月18日 (2000.8.18)		弁理士 宮崎 昭夫
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MFQ-111、新規ヒトGTP加水分解酵素様タンパク質

(57) 【要約】

MFQ-111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MFQ-111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ポリペプチド。

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；

(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；

20

(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；

(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

30

(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；

(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

40

(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。

【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、

50

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、

10

(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

20

(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を含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】

30

【0001】

(発明の分野)

本発明は、以降、時に、「新規ヒト G T P a s e (M F Q - 1 1 1) 」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)

医薬探索プロセスは、現在、「機能的ゲノミクス」、すなわち、ハイ・スループットな、ゲノムまたは遺伝子に基づく生物学を取り込むことで、根本的な革新を経験しつつある。治療の標的として、遺伝子および遺伝子産物を同定する手段として、この方法は、急速に、「ポジショナル・クローニング」に基づく従前の方法に取って代わりつつある。表現型、すなわち、生物学的機能または遺伝子的疾患を同定し、その後、その遺伝子地図の位置に基づいて、その原因となる遺伝子の探知がなされる。

40

【0003】

機能的ゲノミクスは、ハイ・スループットな DNA 配列決定技術、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。

50

【0004】

多くの医学的に重要な生物学的プロセスは、G-タンパク質および/または二次メッセンジャー、例えば、cAMPが関与しているシグナル伝達経路に関係をもっているタンパク質によって媒介されていることは、十分に確立されている(Lefkowitz, Nature, 1991, 351:353~354)。本明細書中では、これらのタンパク質は、G-タンパク質とともに経路に関係しているタンパク質、またはPPG-タンパク質と呼ばれる。これらのタンパク質のいくつかの例には、アドレナリン作動剤およびドーパミンに対するもの等(Kobilka, B. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84:46~50; Kobilka, B. K. et al., Science, 1987, 238:650~656; Bunzow, J. R. et al., Nature, 1988, 336:783~787)のGPC受容体、G-タンパク質自体、エフェクター・タンパク質、例えば、ホスホリパーゼC、アデニルシクラーゼおよびホスホジエステラーゼ、ならびにアクチュエーター・タンパク質、例えば、プロテインキナーゼAおよびプロテインキナーゼC(Simon, M. I. et al., Science, 1991, 252:802~8)が含まれる。

10

【0005】

例えば、シグナル伝達の1つの形態において、ホルモン結合の作用は、細胞内における、酵素、アデニレート・シクラーゼの活性化である。ホルモンによる酵素の活性化は、ヌクレオチドGTPの存在に依存している。GTPもまた、ホルモン結合に影響を及ぼしている。G-タンパク質は、ホルモン受容体をアデニレート・シクラーゼと連結する。G-タンパク質は、ホルモン受容体によって活性化された際、GTPを結合型GDPへと変換することが示されている。その際、GTP担持体は、活性化されたアデニレート・シクラーゼと結合する。G-タンパク質自体によって触媒されるGTPのGDPへの加水分解は、G-タンパク質をその基底型の不活性体へと戻す。

20

【0006】

したがって、GTP加水分解の割合は、シグナル経路の生物学的活性および非活性の期間を決定する。GTPaseスーパーファミリーは、G-タンパク質シグナル・トランスドューサー、もっとも顕著にはras遺伝子の生成物であり細胞分裂を調節する、を含有する(Linder, M. E., et al., Scientific American, 56:56)。ホルモン及び感覚刺激のための最も重要な細胞表面の受容体は、例えば、GTPase標的のGTP結合状態の形成を促進することにより細胞外刺激を細胞内の応答に変換する。該ファミリーのそれぞれのタンパク質は、正確に設計された分子のスイッチでありそれはそのアフィニティーを他の巨大分子に変換することができる。GTPとの結合によりオンをし、GTPをGDPに加水分解することによりオフにする、該スイッチのメカニズムは驚くほど多用途を有しており、異なったGTPaseが膜貫通シグナルを分類及び増幅し、タンパク質の合成及び転移を指示し、細胞質を通して商法の輸送を導き、そして、細胞の増殖及び分化をコントロールする。突然変異および微生物の毒の標的として、GTPaseはガンおよび感染性疾患の病因として中心的な役割を有している(Bourne, H. R., et al., 1991, Nature, 349:117)。

30

40

【0007】

Rasは、細胞表面からその核に生物学的情報を形質導入するGTPaseを結合する小さなグアニンヌクレオチドである。成長シグナルを、チロシン・キナーゼ受容体からマイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)に伝達する能力は、正常な細胞における増殖およびガン細胞における調整不能の成長を導くシグナル経路の中心である。実際、その活動およびGTP結合状態におけるRasをロックする突然変異は、悪性形質転換を導き、そしてこの突然変異はヒトのガンにおいてもっとも見られる突然変異である(Barbacid, M., Annu. Rev. Biochem., 1987, 56:779; McCormick, F., Nature, 1993, 363:15-16)。低分子量GTP結合タンパク質のRasファミリーは、広範囲にわたる細胞のプロセスにおいて関係

50

付けられており、それは細胞の成長および分化、細胞内の小胞の輸送、核原形質の輸送、および細胞骨格の再組織化を含む (Bourne, H. R., et al., 1990, Nature, 348:125; Zerial, M., et al., Guidebook to the Small GTPase, Oxford University Press, New York (1995))。

【0008】

本願発明のもう一つの特徴は、7個の推定的な膜貫通ドメインを有していることで特徴付けられている、G-タンパク質共役型受容体の膜タンパク質遺伝子スーパーファミリーに関する。該ドメインは、細胞外ならびに細胞質内ループによって連結された膜貫通 - ヘリックスを表していると考えられる。G-タンパク質共役型受容体には、ホルモン、ウイルス、増殖因子ならびに神経の受容体などの、幅広い生物学的に活性な受容体が含まれる。

10

【0009】

G-タンパク質共役型受容体 (一方では、7TM受容体として知られている) は、少なくとも8個の分散された親水性ループを連結している、約20~30アミノ酸からなるこれらの7個の保存された疎水性領域を含んでいることで特徴付けられている。G-タンパク質に対する共役型受容体ファミリーには、精神病的ならびに神経学的な不調を治療するために使用されている神経遮断薬と結合する、ドーパミン受容体が含まれる。このファミリーの一員の他の例には、それらに限られないものの、カルシトニン、アドレナリン作動性、エンドセリン、cAMP、アデノシン、ムスカリン作動性、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、トロンピン、キニン、卵胞刺激ホルモン、オプシン類、内皮細胞分化遺伝子-1、ロドプシン類、オドラントならびにサイトメガロウイルスの受容体が含まれる。

20

【0010】

ほとんどのG-タンパク質共役型受容体は、機能的なタンパク質構造を安定化させると考えられる、ジスルフィド結合を形成する、各1個の保存されたシステイン残基を最初の2つの細胞外ループそれぞれに有している。7個の膜貫通領域は、TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6およびTM7と名付けられている。TM3は、シグナル伝達と関係があるとされている。

【0011】

G-タンパク質共役型受容体は、細胞内において、様々な細胞内酵素、イオンチャネルおよび輸送因子に対して、ヘテロ三量体となるG-タンパク質によって連結されることもある (Johnson et al., Endoc. Rev., 1989, 10:317~331参照)。種々のG-タンパク質のサブユニットは、細胞内の様々な生物学的機能を調節する、特定のエフェクターを選択的に刺激する。G-タンパク質共役型受容体の細胞質残基のリン酸化は、幾つかのG-タンパク質共役型受容体のG-タンパク質共役を調節する上での重要な機構として同定されている。G-タンパク質共役型受容体は、哺乳動物宿主内において、多数の部位で見出されている。

30

【0012】

(発明の概要)

本発明は、MFQ-111、特に、MFQ-111ポリペプチドおよびポリヌクレオチド、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、脳卒中、心臓肥大、心疾患、虚血、不整脈、狭心症、高血圧症、低血圧症、動脈硬化症、再狭窄、急性及び慢性の炎症、リウマチ、関節炎、多硬化症、腸疾患、糖尿病、ガン、細菌、真菌、原生動物およびウイルス感染症、特にHIV-1またはHIV-2によって引き起こされる感染症、などの感染症；痛み；肥満；拒食症；過食症；喘息；パーキンソン病；尿閉；骨粗鬆症；心筋梗塞；潰瘍；アレルギー；良性の前立腺肥大；片頭痛；嘔吐；不安、統合失調症、躁鬱病、鬱病、譫妄、痴呆および重症な精神遅延を含む、精神病的ならびに神経学的な不調；ハンチントン病、ジル・ド・ラ・ツレット症候群などのジスキネジーを含む、特定の疾患 (以降、「本発明の疾患」

40

50

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、MFQ-111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MFQ-111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。

【0013】

(発明の説明)

第1の形態において、本発明はMFQ-111ポリペプチドに関する。かかるポリペプチドには、

(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。

【0014】

本発明のポリペプチドは、MFQ-111ファミリーのポリペプチドの一員であると考えられる。サブトラクティブなハイブリッド法を用いて、ラット脳卒中モデル(MCAO)から差動的に発現する遺伝子を同定することが可能なため、それらは興味をもたれている。この手法により、2つの集団のmRNA(もしくはcDNA)を比較することができ、さらに1つの集団において発現もしくは過剰発現している遺伝子のクローンを別の集団から得ることができる。本発明者らは、この手法を用いて、差動的に発現しているcDNA(テスター)を含む脳卒中発症2時間後に抽出されたmRNA由来のcDNAを供した。偽動物から抽出されたcDNAは、対照cDNA(ドライバー)として用いられた。

【0015】

ポジティブ・クローンは逆方向のノーザン分析を用いて認識された。サブトラクティブ・ライブラリー由来のポジティブ・クローンは、ナイロン膜上にのみブロットニングされ、偽ラットの脳から抽出されたmRNA由来の2本鎖cDNAとハイブリダイズし、卒中発作から8時間後に動物2を手術した。クローンA3/G12は、差動的に表現された遺伝子として同定された。これらのクローンの挿入サイズは、333bpであった。BLASTX(J.Mol.Biol., 1990, 215, 403-410)アルゴリズムを用いて配列の分析を行った結果、タンパク質レベルでのラットtulp2遺伝子との高い同一性を示した。ヒト・ホモログ・タンパク質は、マニュアル・アライメントにより推定された。

【0016】

ラットtulp1 mRNA(AF041106)およびラットtulp2 mRNA(AF041107)は、以前にHirao, KおよびTakai, Yによって、ラットlin-10を用いて酵母二重ハイブリット・スクリーニングにより同定されたtuberin様タンパク質として表現されている。筆者は、いくつかの新規神経細胞に関連するタンパク質として、よく表している(JBC, 1998, 273:3470-3475; JBC, 1998, 273:21105-21110; JBC, 1998, 273:2

10

20

30

40

50

6269 - 26272 ; JBC、1999、274 : 11889 - 11896 ; JBC、1999、274 : 27463 - 27466)。にもかかわらず、ヒト tulip 様タンパク質はまだ表されていない。より最近になって、Tateno, M 及び Hayashi Zaki, Y は、SNAG リプレッサー・ファミリーの新規一員として、マウス tulip 1 (AB032400) を表した。

【0017】

新規 MFQ - 111 遺伝子は、Pfam (Nucleic Acids Res.、1999、27 : 260 - 262) のようなタンパク質・ドメイン・データベースを用いて、明白な Rap - GAP ドメイン及び7つの推定的な膜貫通ドメインを明らかにした。新規ヒトタンパク質は従って7 - TM タンパク質スーパーファミリーの予期できぬ要素及び小さな GTPase ファミリーを含む。

10

【0018】

Tubelin は、中枢神経系疾患における重要な役割を有する、ドメイン Rap - GAP とともに、Ras スーパーファミリーの小 GTPase タンパク質として、最近表されている (Ultrastruc. Pathol.、2000、24 : 93 - 98)。小 GTPase の Ras エフェクター・ドメインを有するタンパク質は、シグナルにおいて役割を果たしており、細胞増殖の調節因子である。

【0019】

論理的根拠

該 MFQ - 111 の生物学的性質を、以降、「MFQ - 111 の生物学的活性」、または「MFQ - 111 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 MFQ - 111 の生物学的活性を示す。

20

【0020】

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、ならびに保存的または非保存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。

【0021】

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ポリペプチドが含まれる。好ましいフラグメントは、MFQ - 111 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。

30

【0022】

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。

40

【0023】

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

50

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。

【0024】

さらなる形態において、本発明は、MFQ-111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ポリヌクレオチド；

10

(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；

(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ポリヌクレオチド；

20

(h) 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；

(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、または含んでなるポリヌクレオチド；

(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

30

が含まれる。

【0025】

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ポリヌクレオチドが含まれる。

【0026】

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(SNP)を有するポリヌクレオチドを含む多型体が含まれる。

40

【0027】

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。

【0028】

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

50

;

(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

(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。

【0029】

配列番号：1のポリヌクレオチド配列は、*R. norvegicus tulip1* (AF041106)、*R. norvegicus tulip2* (AF041107)、*M. musculus tulip1* (AB032400)、*H. sapiens cDNA DKFZp566D133* (HSM800380)との相同性を示す。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。配列番号：2のポリペプチドは、*R. norvegicus Tulip2* (AAB97076)、*R. norvegicus Tulip1* (AAB97075)、*H. sapiens KIAA1272* (BAA8586)との相同性および/または構造的類似性を有する、MFQ-111ファミリーの他のタンパク質と類縁している。

10

20

【0030】

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MFQ-111活性を有する。

【0031】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒト脳の細胞中の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（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

【0032】

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

【0033】

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MFQ-111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。

【0034】

MFQ-111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℃、一晚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。

【0035】

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、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。

【0036】

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。

【0037】

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。

10

【0038】

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) および 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、スクレイブ負荷、パリスティック導入または感染が含まれる。

20

【0039】

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。

【0040】

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。

30

40

【0041】

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

50

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。

【0042】

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。

10

【0043】

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。

20

【0044】

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MFQ-111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)。

30

【0045】

MFQ-111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、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

【0046】

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

50

、RNAase保護、ノーザン・ブ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。かかるアッセイ方法には、放射免疫アッセイ、競合的結合アッセイ、ウエスタン・ブロット分析およびELISAアッセイが含まれる。

【0047】

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。

【0048】

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。

【0049】

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., Muselet 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、ヒト第14染

10

20

30

40

50

色体にマッピングされる。

【0050】

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。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。

10

【0051】

本願発明のポリペプチドは、脳、扁桃、小脳、幼児脳、心臓、胎盤、肺、胎児肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、T細胞、胎児の生きている脾臓、子宮内膜腫瘍、精巣腫瘍、乳ガン、肺ガン、直腸線ガン、膵臓線ガンにおいて発現する。

20

【0052】

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。

【0053】

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。

30

40

【0054】

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。

【0055】

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。

50

【0056】

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、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。

【0057】

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、上記の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。

【0058】

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、混合物を形成させる工程、混合物におけるMFQ-111活性を測定する工程、および混合物のMFQ-111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。

【0059】

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。

10

【0060】

既に記載したような、Fc部分およびMFQ-111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)。

【0061】

1つのスクリーニング技術は、受容体の活性化によって引き起こされる細胞外pHの変化または細胞内カルシウムの変化を測定するシステムにおける、本発明の受容体を発現している細胞(例えば、トランスフェクションされたCHO細胞)の利用を含んでいる。この技術では、化合物を、本発明の受容体ポリペプチドを発現している細胞と接触させることができる。そして、可能性を有する化合物が受容体を活性化するか、あるいは阻害するかを決定するために、二次メッセンジャーの応答、例えば、シグナル伝達、pH変化またはカルシウム濃度の変化を測定する。

20

【0062】

別の方法は、受容体により媒介されるcAMPおよび/またはアデニレート・シクラーゼの蓄積に対する阻害または刺激を測定することによって、受容体阻害剤についてスクリーニングすることを含んでいる。かかる方法は、受容体を細胞表面で発現させるために、真核生物細胞を本発明の受容体でトランスフェクションすることを含んでいる。その後、細胞は、本発明の受容体の存在下で、可能性のあるアンタゴニストに曝される。そして、cAMPの蓄積量が測定される。可能性のあるアンタゴニストが受容体に結合し、従って、受容体への結合を阻害する場合には、受容体により媒介されるcAMP、またはアデニレート・シクラーゼ、活性のレベルは、低下または増大される。

30

【0063】

本発明の受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストを検出するための別の方法は、米国特許第5,482,835号に記載されているような、酵母に基づく技術である。

【0064】

1つのスクリーニング技術は、受容体の活性化によって引き起こされる細胞外pHの変化または細胞内カルシウムの変化を測定するシステムにおける、本発明の受容体を発現している細胞(例えば、トランスフェクションされたCHO細胞)の利用を含んでいる。この技術では、化合物を、本発明の受容体ポリペプチドを発現している細胞と接触させることができる。そして、可能性を有する化合物が受容体を活性化するか、あるいは阻害するかを決定するために、二次メッセンジャーの応答、例えば、シグナル伝達、pH変化またはカルシウム濃度の変化を測定する。

40

【0065】

別の方法は、受容体により媒介されるcAMPおよび/またはアデニレート・シクラーゼの蓄積に対する阻害または刺激を測定することによって、受容体阻害剤についてスクリー

50

ニングすることを含んでいる。かかる方法は、受容体を細胞表面で発現させるために、真核生物細胞を本発明の受容体でトランスフェクションすることを含んでいる。その後、細胞は、本発明の受容体の存在下で、可能性のあるアンタゴニストに曝される。そして、cAMPの蓄積量が測定される。可能性のあるアンタゴニストが受容体に結合し、従って、受容体への結合を阻害する場合には、受容体により媒介されるcAMP、またはアデニレート・シクラーゼ、活性のレベルは、低下または増大される。

【0066】

本発明の受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストを検出するための別の方法は、米国特許第5,482,835号に記載されているような、酵母に基づく技術である。

【0067】

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。

【0068】

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、¹²⁵I）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。

【0069】

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。

【0070】

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MFQ-111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、MFQ-111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

10

20

30

40

50

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。

【0071】

上記の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。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。

【0072】

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。

【0073】

(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。

【0074】

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、Fabフラグメントをも包含し、Fab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。

【0075】

「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。

【0076】

「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

10

20

30

40

50

も包含する。

【0077】

「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、ビオチン化、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；World、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.、*「タンパク質修飾および非タンパク質補助因子の分析」*、*Meth. Enzymol.*、182、626~646、1990；Rattan et al.、*「タンパク質合成：翻訳後修飾およびエージング」*、*Ann. NY Acad. Sci.*、663、48~62、1992参照）。

【0078】

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。

【0079】

「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。

10

【0080】

「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。

【0081】

「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。

20

【0082】

「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(ASA)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、多型な塩基から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。

30

【0083】

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。

【0084】

「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。

40

【0085】

「%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

50

)、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、限定された長さによって、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。

【0086】

「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。

【0087】

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 (D evereux 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。

【0088】

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)。

【0089】

好ましくは、BLOSUM62 アミノ酸置換行列 (Henikoff S and Henikoff J G, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89, 1091

5 ~ 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。

【0090】

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、前記のように、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。

【0091】

「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。

【0092】

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。

【0093】

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、 $n_a \cdot x_a - (x_a \cdot I)$

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。

【0094】

「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。

【0095】

「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-MFQ-111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MFQ-111を形成させるために、Fc-MFQ-111または該MFQ-111の断片の機能的発現を行う上で好都合である。Fc-MFQ-111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MFQ-111をコードするDNAまたはその断片を含んでなる。ある用途では、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。

【0096】

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。

【0097】

(実施例)

実施例 1

哺乳動物細胞での発現

本発明の受容体は、ヒト胚性腎臓293(HEK293)細胞または接着性dhfr⁻CHO細胞のいずれかで発現される。受容体の発現を最大にするために、典型的には、pCDNAまたはpCDNA3ベクターへの挿入に先立って、5'および3'の非翻訳領域(UTR)の全てが、該受容体cDNAから除かれる。細胞は、リポフェクチンによって個々の受容体cDNAでトランスフェクションされ、そして、400mg/mlのG418の存在下で選抜される。3週間の選抜の後、個々のクローンは、採集され、また、さらなる分析のために展開される。ベクターのみでトランスフェクションされたHEK293またはCHO細胞は陰性コントロールとして役立つ。個々の受容体を安定的に発現している細胞系統を単離するために、約24のクローンを、典型的には選択し、そして、ノーザン・ブロット分析によって分析される。受容体のmRNAは、一般には、分析されたG418耐性クローンの約50%において、検出が可能である。

【0098】

実施例 2

結合アッセイおよび機能的アッセイ用のリガンド・バンク

600を超える推定的な受容体リガンドのバンクを、スクリーニングのために集めた。このバンクは、ヒトの7回膜貫通型(7TM)受容体を介して作用することが知られている、伝達物質、ホルモンおよびケモカイン;ヒトの7TM受容体、哺乳動物の対応体が未だ同定されていない非哺乳動物の生物学的に活性なペプチドに対する、推定的なアゴニストとなるかもしれない天然に存在する化合物;ならびに、天然では見出されていないが、知

10

20

30

40

50

られていない天然のリガンドとともに 7 T M 受容体を活性化する化合物、で構成されている。このバンクは、機能的な（すなわち、カルシウム、c A M P、微量生理機能測定計、卵母細胞電気生理学など、下記参照）ならびに結合アッセイの両方を使用して、既知のリガンドに対する受容体を最初にスクリーニングするために使用される。

【 0 0 9 9 】

実施例 3

リガンド結合アッセイ

リガンド結合アッセイは、受容体の薬理を確認するための直接的な方法を提供し、また、ハイ・スループットな形態に応用可能である。受容体に対する精製されたリガンドは、結合性研究のために、高比活性（50 ~ 2000 Ci / mmol）に放射化標識される。その後、放射化標識のプロセスが、その受容体に対するリガンドの活性を低下させていないことの評価がなされる。緩衝液、イオン、pH、および塩基などの他の調節因子に関するアッセイ条件は、膜ならびに全細胞の受容体源双方ともに、使用可能なシグナル対ノイズ比を設定するために最適化される。これらのアッセイでは、特異的な受容体結合は、結合されている総放射能 - 過剰な未標識の競合リガンドの存在下で測定された放射能、として定義される。可能な場合には、1つより多くの競合リガンドが、残存する非特異的な結合を明らかにするために利用される。

10

【 0 1 0 0 】

実施例 4

アフリカツメガエル (Xenopus) 卵母細胞における機能的アッセイ

本発明の受容体 cDNA をコードしている線状化プラスミドテンプレートに由来するキャップ化 RNA 転写物を、標準的な手法に従って、RNA ポリメラーゼを用いてインビトロ (in vitro) で合成する。インビトロ転写物を、0.2 mg / ml の最終濃度で、水中に懸濁する。卵巣葉をメスの成体カエルから取り出す。第 V 期の濾胞除去卵母細胞を取得し、そして、RNA 転写物 (10 ng / 卵母細胞) を、顕微注入装置を使用して、50 nl ボーラス中に注入する。アゴニスト曝露に反応する個々のアフリカツメガエル卵母細胞からの電流を測定するために、2つの電極電圧クランプを使用する。記録は、Ca²⁺ を含まない Barth 培地において室温で行われる。該アフリカツメガエルの系は、活性化するリガンドについて、既知のリガンドならびに組織 / 細胞抽出物をスクリーニングするために使用することができる。

20

30

【 0 1 0 1 】

実施例 5

微量生理機能測定アッセイ

広範な二次メッセンジャー系の活性化は、細胞からの少量の酸の放出を引き起こす。生成された酸は、主として、細胞内のシグナル伝達過程にエネルギーを供給するために必要となる、増大した代謝活性の結果である。細胞周囲の培地における pH 変化は、非常に小さいものの、C Y T O S E N S O R 微量生理機能測定計 (M o l e c u l a r D e v i c e s L t d . , M e n l o P a r k , C A) によって検出可能である。従って、C Y T O S E N S O R は、本発明の G - タンパク質共役型受容体などの、エネルギーを利用している細胞内シグナル伝達経路と結びついている、受容体の活性化を検出することができる。

40

【 0 1 0 2 】

実施例 6

抽出物 / 細胞上清のスクリーニング

今のところ、依然として、同族の活性化リガンド (アゴニスト) が判っていない、非常に多くの哺乳動物受容体が存在している。すなわち、これらの受容体に対する活性化リガンドは、これまでに同定されている、リガンド・バンク内には含まれていないかもしれない。従って、本発明の 7 T M 受容体はまた、天然のリガンドを同定するために、組織抽出物に対して、(カルシウム、c A M P、微量生理機能測定計、卵母細胞電気生理学など、機能的スクリーンを利用して) 機能的スクリーニングがなされる。陽性の機能的な応答を示

50

す抽出物は、活性化リガンドが単離、同定されるまで、順次分画化することができる。

【0103】

実施例7

カルシウムおよびcAMPの機能的アッセイ

HEK293細胞において発現された7TM受容体は、PLCの活性化、ならびにカルシウムの動員および/またはcAMPの刺激もしくは阻害と、機能的に結びついていることが示されている。受容体でトランスフェクションされた、あるいは、ベクターのみのコントロールの細胞における、HEK293細胞内のカルシウムの基底レベルは、100nM~200nMの正常な範囲内にあることが実測された。組換え受容体を発現しているHEK293細胞は、fura2を負荷して、そして、同日中に、アゴニストにより誘導されるカルシウムの動員について、150を超える選択されたリガンドまたは組織/細胞抽出物を評価する。同様に、組換え受容体を発現しているHEK293細胞を、標準的なcAMP定量アッセイを使用して、cAMP産生の刺激または阻害について評価する。カルシウムの一時的な変化またはcAMPの変動を示すアゴニストは、その応答が、受容体を発現しているトランスフェクションされた細胞に、独特であるか否かが決定するため、ベクターのみのコントロール細胞において、試験される。

10

【0104】

実施例8

MFQ-111のPCR増幅

ヒトtulipホモログのPCR増幅：MFQ-111配列を確認するために、1組の特定PCRプライマー（配列番号：3及び配列番号：4参照）が推定上の配列を基にデザインされた：

20

MFQ-111上部：5'-3'プライマー01（配列番号：3）

MFQ-111下部：5'-3'プライマー02（配列番号：4）

3'

予想される523bp断片は、ヒト脳cDNAサンプル（Clontech Ref：7187-1；Clontech社からヒトMTCパネルIの全脳サンプル）から増幅され、そしてその配列はInvitrogen製のpCRIIベクターにおける正確なサイズのPCRバンドをクローンした後確認された。

30

【0105】

図1

特定MFQ-111バンドのPCR増幅

列：

- 1 G3PDHコントロール
- 2 ヒト脳cDNAからのTulipホモログ増幅（7187-1）
- 3 脳cDNAからのTulipホモログ増幅（MTCパネルより）
- 4 陰性コントロール
- 5 陰性コントロール
- 6 100bpラダー。

40

【0106】

PCR条件：95℃で9分間、95℃で30秒間、54℃で50秒間、72℃で60秒間、そして72℃で60秒間を34サイクル、そして最後の伸張ステップとして、72℃で5分間をTaq Goldポリメラーゼを使用した（Perkin Elmer製）。

【0107】

図2

組織分布

- 1 100bpラダー
- 2 心臓
- 3 脳（全脳）
- 4 胎盤

50

5	肺	
6	肝臓	
7	骨格筋	
8	腎臓	
9	膵臓	
10	脾臓	
11	胸腺	
12	前立腺	
13	精巣	
14	卵巣	10
15	小腸	
16	大腸	
17	末梢血白血球	
18	1 kb ラダー	
19	ヒト脳 cDNA から M F Q - 1 1 1 増幅 (陽性コントロール)	
20	G 3 P D H の増幅 (陽性コントロール)。	

【0108】

M F Q - 1 1 1 は小腸及び正常な大腸においては発現しない。発現レベルは、脾臓および末梢血白血球においては非常に弱い。

【0109】

20

図3

ヒト腫瘍における発現

同様の P C R 戦略が、C l o n t e c h 製ヒト腫瘍多組織 c D N A パネル (R e f K 1 4 2 2 - 1) を用いていくつかの基準化されたヒト腫瘍組織における興味のある遺伝子の発現レベルを測定する。

列

1	100 pb ラダー	
2	ヒト乳ガン	
3	ヒト肺ガン	
4	ヒト大腸ガン	30
5	ヒト肺ガン	
6	ヒト前立腺ガン	
7	ヒト大腸腺ガン	
8	ヒト卵巣ガン	
9	ヒト膵臓腺ガン	
10	1 kb ラダー	
11	ヒト脳 cDNA からの M F Q - 1 1 1 増幅 (陽性コントロール)	
12	G 3 P D H の増幅 (陽性コントロール)	
13	プライマー M F Q - 1 1 1 (陰性コントロール)	
14	プライマー G 3 P D H (陰性コントロール)	40
15	100 pb ラダー。	

【0110】

M F Q - 1 1 1 は腫瘍においては高い発現はない。いくつかの肺ガンおよび前立腺ガンにおいては発現していない。

【図面の簡単な説明】

【図1】特定 M F Q - 1 1 1 バンドの P C R 増幅を示す。

【図2】組織分布を示す。

【図3】ヒト腫瘍における発現を示す。

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/16561 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 9/00 (74) Common Representative: MERCK PATENT GMBH, Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (21) International Application Number: PCT/EP01/09326
- (22) International Filing Date: 13 August 2001 (13.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00117781.5 18 August 2000 (18.08.2000) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MASA ALVAREZ, Marc [ES/ES]; cf. Josep Miral nº 21, 2^a3a, E-08020 Barcelona (ES); RODÉS GUBERN, Blanca [ES/ES]; cf. Jaume Font, 3 2^a, F. 08549 Sant Climent de Llobregat (ES); MESSÈGIER PÉAPOUCH, Rannu [ES/ES]; cf. Pascadors, 25A, E-08330 Premià de Mar (ES); ROSSELL VIVES, Elisabet [ES/ES]; cf. Erosque, Granados, 43 3^a, E-08008 Barcelona (ES); PIULATS XANCO, Jaume [ES/ES]; Messen Quim Mallofré, 2, 6c 1a, E-08030 Barcelona (ES).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OL, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that 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 02/16561 A2

(54) Title: MFQ-111, A NOVEL HUMAN GLYPASE LIKE PROTEIN

(57) Abstract: MFQ 111 polypeptides and polynucleotides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques are disclosed. Also disclosed are methods for utilizing MFQ 111 polypeptides and polynucleotides in diagnostic assays.

MFQ-111, a novel human GTPase like protein**Field of the Invention**

5 This invention relates to newly identified polypeptides and polynucleotides encoding such polypeptides sometimes hereinafter referred to as „novel human GTPase (MFQ-111)“, 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

The drug discovery process is currently undergoing a fundamental revolution as it embraces "functional genomics", that is, high throughput genome- or gene-based biology. This approach as a means to identify genes and gene products as therapeutic targets is rapidly superceding earlier approaches based on "positional cloning". A phenotype, that is a biological function or genetic disease, would be identified and this would then be tracked back to the responsible gene, based on its genetic map position.

20 Functional genomics relies heavily on high-throughput DNA sequencing technologies 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 characterize further genes and their related polypeptides/proteins, as targets for drug discovery.

25 It is well established that many medically significant biological processes are mediated by proteins participating in signal transduction pathways that involve G-proteins and/or second messengers, e.g., cAMP (Lefkowitz, Nature, 1991, 351:353-354). Herein these proteins are referred to as proteins participating in pathways with G-proteins or PPG proteins. Some
30 examples of these proteins include the GPC receptors, such as those for adrenergic agents and dopamine (Kobilka, B.K., et al., Proc. Natl Acad. Sci., USA, 1987, 84:46-50; Kobilka, B.K., et al., Science, 1987, 238:650-656; Bunzow, J.R., et al., Nature, 1988, 336:783-787), G-proteins

themselves, effector proteins, e.g., phospholipase C, adenylyl cyclase, and phosphodiesterase, and actuator proteins, e.g., protein kinase A and protein kinase C (Simon, M.I., et al., Science, 1991, 252:802-8).

5 For example, in one form of signal transduction, the effect of hormone binding is the activation of the enzyme, adenylyl cyclase, inside the cell. Enzyme activation by hormones is dependent on the presence of the nucleotide GTP. GTP also influences hormone binding. A G-protein connects the hormone receptor to adenylyl cyclase. G-protein was shown to exchange GTP for bound GDP when activated by a hormone receptor.
10 The GTP-carrying form then binds to activated adenylyl cyclase. Hydrolysis of GTP to GDP, catalyzed by the G-protein itself, returns the G-protein to its basal, inactive form.

Thus the rate of GTP hydrolysis determines the duration between biological activation of the signal pathway and deactivation. The GTPase superfamily
15 comprises G protein signal transducers most notably the products of ras genes that, regulates the rate of cell division (Linder, M. E., et al., 1992, Scientific American, 56:56). Many important cell-surface receptors for hormones and sensory stimuli, for example, transduce extracellular stimuli into cellular responses by promoting formation of the GTP bound state of their GTPase targets. Each protein in the family is a precisely engineered
20 molecular switch that can change its affinities for other macromolecules. Turned on by binding GTP and off by hydrolysing GTP to GDP, the switch mechanism is remarkably versatile, enabling different GTPases to sort and amplify transmembrane signals, direct the synthesis and translocation of
25 proteins, guide vesicular traffic through the cytoplasm, and control proliferation and differentiation of cells. As targets of mutation and microbial toxins, GTPases have pivotal roles in the pathogenesis of cancer and infectious diseases (Bourne, H. R., et al., 1991, Nature, 349:117).

Ras is a small guanine nucleotide binding GTPase that transduces
30 biological information from the cell surface to the nucleus. Its ability to transfer growth signals from receptor tyrosine kinases to a mitogen activated protein kinase (MAPK) cascade puts it in the heart of signaling pathways that cause proliferation in normal cells and uncontrolled growth in cancer cells. Indeed, mutations that lock Ras in its active, GTP-bound state
35 lead to malignant transformation and are among the most frequently identified mutations in human cancers (Barbacid, M., Annu. Rev. Biochem.,

1987, 56:779; McCormick, F., *Nature*, 1993, 363:15-16). The Ras family of low molecular weight GTP-binding proteins has been implicated in a wide range of cellular processes, including cell growth and differentiation, intracellular vesicular trafficking, nucleocytoplasmic transport, and cytoskeletal reorganization (Bourne, H. R., et al., 1990, *Nature*, 348:125; Zerial, M., et al., *Guidebook to the Small GTPases*, Oxford University Press, New York (1995).

Another feature of the invention relates to the membrane protein gene superfamily of G-protein coupled receptors characterized as having seven putative transmembrane domains. The domains are believed to represent transmembrane α -helices connected by extracellular or cytoplasmic loops. G-protein coupled receptors include a wide range of biologically active receptors, such as hormones, viral, growth factors and neuroreceptors.

G-protein coupled receptors (otherwise known as 7TM receptors) have been characterized as including these seven conserved hydrophobic stretches of about 20 to 30 amino acids, connecting at least eight divergent hydrophilic loops. The G-protein family of coupled receptors includes dopamine receptors which bind to neuroleptic drugs used for treating psychotic and neurological disorders. Other examples of members of this family include, but are not limited to, calcitonin, adrenergic, endothelin, cAMP, adenosine, muscarinic, acetylcholine, serotonin, histamine, thrombin, kinin, follicle stimulating hormone, opsins, endothelial differentiation gene-1, rhodopsins, odorant, and cytomegalovirus receptors.

Most G-protein coupled receptors have single conserved cysteine residues in each of the first two extracellular loops which form disulfide bonds that are believed to stabilize functional protein structure. The 7 transmembrane regions are designated as TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, and TM7. TM3 has been implicated in signal transduction.

G-protein coupled receptors can be intracellularly coupled by heterotrimeric G-proteins to various intracellular enzymes, ion channels and transporters (see, Johnson et al., *Endoc. Rev.*, 1989, 10:317-331). Different G-protein α -subunits preferentially stimulate particular effectors to modulate various biological functions in a cell. Phosphorylation of cytoplasmic residues of G-protein coupled receptors have been identified as an important mechanism for the regulation of G-protein coupling of some G-protein coupled

receptors. G-protein coupled receptors are found in numerous sites within a mammalian host.

Summary of the Invention

5 The present invention relates to MFQ-111, in particular MFQ-111 polypeptides and 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 cerebral stroke, heart hypertrophy, heart failure, ischemia, 10 arrhythmia, angina pectoris, hypertension, hypotension, atherosclerosis, restenosis, chronic and acute inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, bowel disease, diabetes, cancer, infections such as bacterial, fungal, protozoan and viral infections, particularly infections caused by HIV-1 or HIV-2, pain, obesity, anorexia, bulimia, asthma, Parkinson's disease, 15 urinary retention, osteoporosis, myocardial infarction, ulcers, allergies, benign prostatic hypertrophy, migraine, vomiting, psychotic and neurological disorders including anxiety, schizophrenia, manic depression, depression, delirium, dementia, and severe mental retardation, and dyskinesias, such as Huntington's disease or Gilles de la Tourette's syndrome, hereinafter referred to as "diseases of the invention". In a 20 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 MFQ-111 imbalance with the identified compounds. In a still further aspect, the invention 25 relates to diagnostic assays for detecting diseases associated with inappropriate MFQ-111 activity or levels.

Description of the Invention

30 In a first aspect, the present invention relates to MFQ-111 polypeptides. Such polypeptides include:

(a) an polypeptide encoded by a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO:1;

(b) a 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) a polypeptide comprising the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;

5 (d) a 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

10 (f) a 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).

Polypeptides of the present invention are believed to be members of the MFQ-111 family of polypeptides. They are therefore of interest because using the subtractive hybridization technique it is possible to identify differentially expressed genes from a rat stroke model (MCAO). This technology permits to compare two populations of mRNA (or cDNA) and obtain clones of genes that are expressed or overexpressed in one population from another. We use this technology with cDNA derived from mRNA extracted after 2 hours of stroke that contains differentially expressed cDNA (tester). cDNA extracted from sham animals was used as reference cDNA (driver).

25 The positive clones were confirmed using a reverse northern analysis. The positive clones derived from the subtracted library were dot-blotted onto nylon membranes and hybridized with second strand cDNA derived from mRNA extracted from brain of sham rats and operated animals 2 and 8 hours after stroke. The clone A3/G12 was identified as differential expressed gene. The insert size of these clone was 333 bp. Analyzing the sequence using BLAST X (J Mol Biol, 1990, 215, 403-410) algorithm the results showed high homology with rat tulip 2 gene at protein level. The human homologous protein was deduced doing manual alignments.

30 Rat tulip 1 mRNA (AF041106) and rat tulip 2 mRNA (AF041107) have been described previously by Hirao, K and Takai, Y as a tuberin-like protein identified through the yeast two-hybrid screening using rat lin-10

as a bait. The authors have as well described some novel neuronal related proteins (JBC, 1998, 273:3470-3475; JBC, 1998, 273:21105-21110; JBC, 1998, 273:26269-26272; JBC, 1999, 274:11889-11896; JBC, 1999, 274:27463-27466). Nevertheless a human tulip like protein has not been described yet. More recently Tateno, M and Hayashizaki, Y describes the mouse tulip 1 (AB032400) as a novel member of SNAG repressor family.

The new MFQ-111 gene reveals, using a protein domains database such as Pfam (Nucleic Acids Res., 1999, 27:260-262), a clear Rap-GAP domain and seven putative transmembrane domains. The new human protein thus comprises unexpected elements of the 7-TM protein super family and the small GTPases family.

Tuberin is recently described as a small GTPase protein of the Ras superfamily with a domain Rap-GAP that has an important role in central nervous system disease (Ultrastruc. Pathol., 2000, 24:93-98). The proteins that have the Ras effector domain of small GTPases plays a role in signaling and are regulators of cell proliferation (Curr Opp Cell Biol, 2000, 12:157-165).

20 RATIONALE

The biological properties of the MFQ-111 are hereinafter referred to as "biological activity of MFQ-111" or "MFQ-111 activity". Preferably, a polypeptide of the present invention exhibits at least one biological activity of MFQ-111.

25 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, 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.

Preferred fragments of polypeptides of the present invention include a 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 a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous amino acids truncated or deleted from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. Preferred fragments are biologically active fragments that mediate the biological activity of MFQ-111, 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 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 MFQ-111 polynucleotides. Such polynucleotides include:

- (a) a 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) a polynucleotide comprising the polynucleotide of SEQ ID NO:1;

- (c) a polynucleotide having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polynucleotide of SEQ ID NO:1;
- (d) the polynucleotide of SEQ ID NO:1;
- 5 (e) a 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) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2;
- 10 (g) a 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) a polynucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2;
- (i) a 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;
- 15 (j) a polynucleotide having or comprising a polynucleotide sequence encoding 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; and
- 20 polynucleotides that are fragments and variants of the above mentioned polynucleotides or that are complementary to above mentioned polynucleotides, over the entire length thereof.
- Preferred fragments of polynucleotides of the present invention include a polynucleotide comprising a nucleotide sequence having at least 15, 30, 50 or 100 contiguous nucleotides from the sequence of SEQ ID NO: 1, or a polynucleotide comprising a sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous nucleotides truncated or deleted from the sequence of SEQ ID NO: 1.
- 25
- 30 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).

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 RNA transcripts of the DNA sequences of the present invention. Accordingly, there is provided an RNA polynucleotide that:

(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;

(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.

The polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1 shows homology with *R.norvegicus* tulip 1 (AF041106), *R.norvegicus* tulip 2 (AF041107), *M.musculus* tulip1 (AB032400), *H.sapien* cDNA DKFZp566D133 (HSM800380). 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 NO:2. The polypeptide of the SEQ ID NO:2 is related to other proteins of the MFG-111 family, having homology and/or structural similarity with *R.norvegicus* Tulip 2 (AAB97076), *R.norvegicus* Tulip1 (AAB97075), *H.sapiens* KIAA1272 (BAA8586).

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 MFQ-111 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 human brain, (see for instance, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (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 MFQ-111) 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 MFQ-111, 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. 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 (pH7.6), 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 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.

The skilled artisan will appreciate that, in many cases, a 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 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 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 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 within the amplified product (typically an adaptor 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 analysed by DNA sequencing and a full-length cDNA constructed either by joining the product directly to the existing cDNA to 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 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 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 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, microinjection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic introduction or infection.

5 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, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 and Bowes melanoma cells; and plant cells.

10 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
15 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
20 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
25 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.

35 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 characterised 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 MFQ-111 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 MFQ-111 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.

5 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 radioimmunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis and ELISA assays.

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

- 20 (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
- 25 (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.

30

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 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 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. Spilleit, D., Thomas, P., Weissenbach, J., and Goodfellow, P., (1994) A 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, Spilleit 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 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 14.

The polynucleotide sequences of the present invention are also valuable tools for tissue expression studies. Such studies allow the determination of 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 hybridisation

techniques to clones arrayed on a grid, such as cDNA microarray hybridisation (Scheena *et 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 brain, amygdala, cerebellum, infant brain, heart, placenta, lung, fetal lung, liver, skeletal muscle, kidney, pancreas, thymus, prostate, testis, ovary, T-cell, fetal liver spleen, endometrial tumor, testis tumor, breast carcinoma, lung carcinoma, colon adenocarcinoma and pancreatic adenocarcinoma.

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).

5 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.

10 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.

15 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, intramuscular, intravenous, or intradermal 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 isotonic with the blood of the recipient; and aqueous and non-aqueous sterile

20
25
30
35

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 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.

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 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 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.

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 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 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 MFQ-111 activity in the mixture, and comparing the MFQ-111 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 microtiter 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 MFQ-111 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)).

One screening technique includes the use of cells which express receptor of this invention (for example, transfected CHO cells) in a system which measures extracellular pH or intracellular calcium changes caused by receptor activation. In this technique, compounds may be contacted with cells expressing the receptor polypeptide of the present invention. A second messenger response, e.g., signal transduction, pH changes, or changes in calcium level, is then measured to determine whether the potential compound activates or inhibits the receptor.

Another method involves screening for receptor inhibitors by determining inhibition or stimulation of receptor-mediated cAMP and/or adenylate cyclase accumulation. Such a method involves transfecting a eukaryotic cell with the receptor of this invention to express the receptor on the cell surface. The cell is then exposed to potential antagonists in the presence of the receptor of this invention. The amount of cAMP accumulation is then measured. If the potential antagonist binds the receptor, and thus inhibits receptor binding, the levels of receptor-mediated cAMP, or adenylate cyclase, activity will be reduced or increased.

Another methods for detecting agonists or antagonists for the receptor of the present invention is the yeast based technology as described in U.S. Patent 5,482,835.

5 One screening technique includes the use of cells which express receptor of this invention (for example, transfected CHO cells) in a system which measures extracellular pH or intracellular calcium changes caused by receptor activation. In this technique, compounds may be contacted with cells expressing the receptor polypeptide of the present invention. A second messenger response, e.g., signal transduction, pH changes, or
10 changes in calcium level, is then measured to determine whether the potential compound activates or inhibits the receptor.

Another method involves screening for receptor inhibitors by determining inhibition or stimulation of receptor-mediated cAMP and/or adenylyate cyclase accumulation. Such a method involves transfecting a eukaryotic
15 cell with the receptor of this invention to express the receptor on the cell surface. The cell is then exposed to potential antagonists in the presence of the receptor of this invention. The amount of cAMP accumulation is then measured. If the potential antagonist binds the receptor, and thus inhibits receptor binding, the levels of receptor-mediated cAMP, or adenylyate
20 cyclase, activity will be reduced or increased.

Another methods for detecting agonists or antagonists for the receptor of the present invention is the yeast based technology as described in U.S. Patent 5,482,835.

Screening techniques

25 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
30 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 MFQ-111 gene. The art of constructing transgenic animals is well established. For example, the MFQ-111 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

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

10 which polypeptide is preferably that of SEQ ID NO:2.

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

Glossary

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

"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

20 Fab or other immunoglobulin expression library.

"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
25 its natural state is "isolated", as the term is employed herein. Moreover, a 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 single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, 10 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 RNAs containing one or more modified bases and DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons. 15 "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 modified forms of polynucleotides as typically found in nature, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of 20 viruses and cells. "Polynucleotide" also embraces relatively short polynucleotides, often referred to as oligonucleotides.

"Polypeptide" refers to any polypeptide comprising two or more amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, 25 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 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 30 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 research literature. Modifications may occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. 35 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.

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 (Derevieux 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 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 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 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 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 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, 2444-2449,1988, available as part of the Wisconsin Sequence Analysis Package).

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.

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.

"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.

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:

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

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,

\bullet 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-MFQ-111, employing an immunoglobulin Fc region as a part of a fusion protein is advantageous for performing the functional expression of Fc-MFQ-111 or fragments of -
5 MFQ-111, to improve pharmacokinetic properties of such a fusion protein when used for therapy and to generate a dimeric MFQ-111. The Fc-MFQ-111 DNA construct comprises in 5' to 3' direction, a secretion cassette, i.e. a signal sequence that triggers export from a mammalian cell, DNA
10 encoding an immunoglobulin Fc region fragment, as a fusion partner, and a DNA encoding MFQ-111 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
15 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
20 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.

25 Further Examples

Example 1: Mammalian Cell Expression

The receptors of the present invention are expressed in either human embryonic kidney 293 (HEK293) cells or adherent dhfr CHO cells. To maximize receptor expression, typically all 5' and 3' untranslated regions (UTRs) are removed from the receptor cDNA prior to insertion into a pCDN
30 or pCDNA3 vector. The cells are transfected with individual receptor cDNAs by lipofectin and selected in the presence of 400 mg/ml G418. After 3 weeks of selection, individual clones are picked and expanded for further analysis. HEK293 or CHO cells transfected with the vector alone serve as
35 negative controls. To isolate cell lines stably expressing the individual

receptors, about 24 clones are typically selected and analyzed by Northern blot analysis. Receptor mRNAs are generally detectable in about 50% of the G418-resistant clones analyzed.

5 Example 2 Ligand bank for binding and functional assays.

A bank of over 600 putative receptor ligands has been assembled for screening. The bank comprises: transmitters, hormones and chemokines known to act via a human seven transmembrane (7TM) receptor; naturally occurring compounds which may be putative agonists for a human 7TM receptor, non-mammalian, biologically active peptides for which a mammalian counterpart has not yet been identified; and compounds not found in nature, but which activate 7TM receptors with unknown natural ligands. This bank is used to initially screen the receptor for known ligands, using both functional (i.e. calcium, cAMP, microphysiometer, oocyte electrophysiology, etc, see below) as well as binding assays.

15 Example 3: Ligand Binding Assays

Ligand binding assays provide a direct method for ascertaining receptor pharmacology and are adaptable to a high throughput format. The purified ligand for a receptor is radiolabeled to high specific activity (50-2000 Ci/mmol) for binding studies. A determination is then made that the process of radiolabeling does not diminish the activity of the ligand towards its receptor. Assay conditions for buffers, ions, pH and other modulators such as nucleotides are optimized to establish a workable signal to noise ratio for both membrane and whole cell receptor sources. For these assays, specific receptor binding is defined as total associated radioactivity minus the radioactivity measured in the presence of an excess of unlabeled competing ligand. Where possible, more than one competing ligand is used to define residual nonspecific binding.

20
25
30

Example 4: Functional Assay in Xenopus Oocytes

Capped RNA transcripts from linearized plasmid templates encoding the receptor cDNAs of the invention are synthesized in vitro with RNA polymerases in accordance with standard procedures. In vitro transcripts are suspended in water at a final concentration of 0.2 mg/ml. Ovarian lobes are removed from adult female toads, Stage V defolliculated oocytes are obtained, and RNA transcripts (10 ng/oocyte) are injected in a 50 nl bolus using a microinjection apparatus. Two electrode voltage clamps are used to measure the currents from individual *Xenopus* oocytes in response to agonist exposure. Recordings are made in Ca²⁺ free Barth's medium at room temperature. The *Xenopus* system can be used to screen known ligands and tissue/cell extracts for activating ligands.

Example 5: Microphysiometric Assays

Activation of a wide variety of secondary messenger systems results in extrusion of small amounts of acid from a cell. The acid formed is largely as a result of the increased metabolic activity required to fuel the intracellular signaling process. The pH changes in the media surrounding the cell are very small but are detectable by the CYTOSENSOR microphysiometer (Molecular Devices Ltd., Menlo Park, CA). The CYTOSENSOR is thus capable of detecting the activation of a receptor which is coupled to an energy utilizing intracellular signaling pathway such as the G-protein coupled receptor of the present invention.

Example 6: Extract/Cell Supernatant Screening

A large number of mammalian receptors exist for which there remains, as yet, no cognate activating ligand (agonist). Thus, active ligands for these receptors may not be included within the ligands banks as identified to date. Accordingly, the 7TM receptor of the invention is also functionally screened (using calcium, cAMP, microphysiometer, oocyte electrophysiology, etc., functional screens) against tissue extracts to identify natural ligands. Extracts that produce positive functional responses can be sequentially subfractionated until an activating ligand is isolated identified.

Example 7: Calcium and cAMP Functional Assays

7TM receptors which are expressed in HEK 293 cells have been shown to be coupled functionally to activation of PLC and calcium mobilization and/or cAMP stimulation or inhibition. Basal calcium levels in the HEK 293 cells in receptor-transfected or vector control cells were observed to be in the normal, 100 nM to 200 nM, range. HEK 293 cells expressing recombinant receptors are loaded with fura 2 and in a single day > 150 selected ligands or tissue/cell extracts are evaluated for agonist induced calcium mobilization. Similarly, HEK 293 cells expressing recombinant receptors are evaluated for the stimulation or inhibition of cAMP production using standard cAMP quantitation assays. Agonists presenting a calcium transient or cAMP fluctuation are tested in vector control cells to determine if the response is unique to the transfected cells expressing receptor.

Example 8: PCR amplification fo MFQ-111

PCR amplification of human tulip homologue: In order to confirm the MFQ-111 sequence a pair of specific PCR primers (see SEQ ID No. 3 and 4) were designed based on the putative sequence:

MFQ-111 upper: 5'-3' Primer01 (SEQ ID No. 3)

MFQ-111 lower: 5' - 3' Primer02 (SEQ ID No. 4)

3'

The expected 523 bp fragment was amplified from a human brain cDNA sample (Clontech Ref: 7187-1; whole brain sample of Human MTC panel I from Clontech, Ref: K1420-1) and the sequence was confirmed after cloning the correct size PCR band in a pCRII vector from Invitrogen.

Figure 1

PCR amplification of specific MFQ-111 band

Lanes:

- 1- G3PDH control
- 5 2- Tulip homologue amplification from human brain
cDNA(7187-1)
- 3- Tulip homologue amplification from brain cDNA (from
MTC panel)
- 4- Negative control
- 10 5- Negative control
- 6- 100 bp ladder

The PCR conditions were : 9 min at 95 °C; 30 sec at 95°C, 50 sec at 54 °C, 60 sec at 72°C for 34 cycles and a final elongation step at 72°C for 5 min using the Taq Gold polymerase purchased from Perkin Elmer.

15

Figure 2

Tissue distribution

20 With the MFQ-111 designed primers mentioned above, and the same PCR conditions a 523 bp specific PCR band is amplified using a set of human cDNA (Human MTC panel I from Clontech, Ref K1420-1 and Human MTC panel II from Clontech, Ref K1421-1).

Specific primers for the house keeping gene G3PDH are used (G3PDH upstream: 5'-3' Primer03 (SEQ ID No. 5) and G3PDH downstream 5' - 3' Primer04 (SEQ ID No. 6) and a control.

25

Lanes:

- 1- 100 bp ladder
- 2- heart

WO 02/16561

36

PCT/EP01/09326

- 3- brain (whole)
 - 4- placenta
 - 5- lung
 - 6- liver
 - 5 7- skeletal muscle
 - 8- kidney
 - 9- pancreas
 - 10- spleen
 - 11- thymus
 - 10 12- prostate
 - 13- testis
 - 14- ovary
 - 15- small intestine
 - 16- colon
 - 15 17- peripheral blood leukocyte
 - 18- 1 kb ladder
 - 19- positive control amplification MFQ-111 from human brain cDNA
 - 20- positive control amplification of G3PDH
- 20 MFQ-111 is not expressed in small intestine and normal colon. The expression level is very weak in spleen, and in peripheral blood leukocyte.

Figure 3**Expression in Human Tumors**

The same PCR strategy is used to determine the level of expression of the gene of interest in several normalized human tumoral tissues using the human tumor multiple tissue cDNA panel from Clontech (Ref K1422-1)

Lanes:

- 1 100 pb ladder
- 2- human breast carcinoma
- 3- human lung carcinoma
- 4- human colon adenocarcinoma
- 5- human lung carcinoma
- 6- human prostatic adenocarcinoma
- 7- human colon adenocarcinoma
- 8- human ovarian carcinoma
- 9- human pancreatic adenocarcinoma
- 10- 1 Kb ladder
- 11- positive control amplification MFQ-111 from human brain cDNA
- 12- positive control amplification of G3PDH
- 13- nevasive control primers MFQ-111
- 14- negative control primers G3PDH
- 15- 100 pb ladder

MFQ-111 have not a high expression in tumors. Is not expressed in several lung carcinoma and in prostatic adenocarcinoma.

Claims

1. A 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).

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

- 15 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:
 - (a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least 95% identity to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1;
 - 20 (b) a polynucleotide having at least 95% identity to the polynucleotide of SEQ ID NO:1;
 - (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;
 - 25 (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;

WO 02/16561

39

PCT/EP01/09326

- (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;
- 5 (f) a polynucleotide which is the RNA equivalent of a polynucleotide of (a) to (e);
- (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,
- 10 over the entire length thereof.
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;
- 15 (c) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2; and
- (d) a polynucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2.
6. An expression system comprising a polynucleotide capable of producing a
- 20 polypeptide of any one of claim 1-3 when said expression vector is present in a compatible host cell.
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.
- 25
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 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.

Figure 1



Figure 2

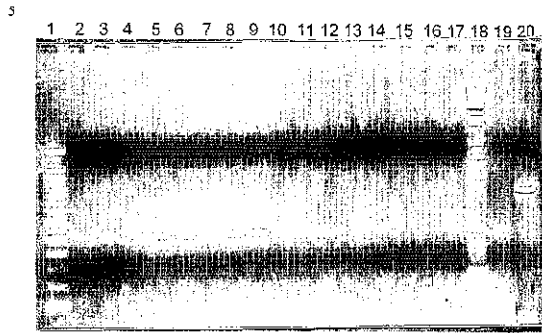
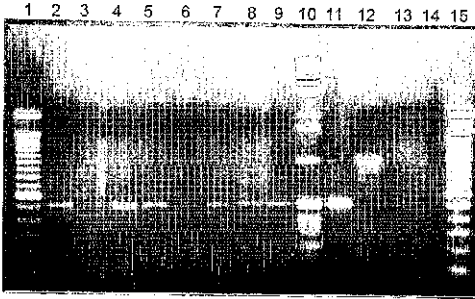


Figure 3

5



WO 02/16561

PCT/EP01/09326

1/7

SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH

5 <120> Novel small GTPase

<130> MFQ-1115Rws

<140>

10 <141>

<160> 6

<170> Patent_In Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 2586

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(2586)

25 <400> 1

atg cat tgt gga tta ctt cat att gac cag gac att gtc aat aca atc 40
Met His Cys Gly Leu Leu His Ile Asp Gln Asp Ile Val Asn Thr Ile
1 5 10 15

30 atc aaa cac tgc tca cct caa ttt ttt tca ctt ggt ttg cct ggt gcc 96
Ile Lys His Cys Ser Pro Gln Phe Phe Ser Leu Gly Leu Pro Gly Ala
20 25 30

35 aca atg ctt att atg gat ttt att gta gca gct ggt aga gtg gct tct 144
Thr Met Leu Ile Met Asp Phe Ile Val Ala Ala Gly Arg Val Ala Ser
35 40 45

40 tca gct ttt ctg aat gca cca aga gtg gaa gca caa gtt ctt ctg gga 182
Ser Ala Phe Leu Asn Ala Pro Arg Val Glu Ala Gln Val Leu Leu Gly
50 55 60

45 tct ttg gtt tgc ttt ccc aac tta tat tgt gaa ctg cct tct ctt cat 240
Ser Leu Val Cys Phe Pro Asn Leu Tyr Cys Glu Leu Pro Ser Leu His
65 70 75 80

50 ccc aac att cct gat gtt gct glg tct cag ttt aca gat gtt aag gaa 288
Pro Asn Ile Pro Asp Val Ala Val Ser Gln Phe Thr Asp Val Lys Glu
85 90 95

55 ctt ata atc aaa aat gta tta agc tgg gca aga gat gag ccc tct ggt 336
Leu Ile Ile Lys Thr Val Leu Ser Ser Ala Arg Asp Glu Pro Ser Gly
100 105 110

60 cct gca cga tgt gta gca ctt tgt agt tta ggt att tgg att tgt gaa 384
Pro Ala Arg Cys Val Ala Leu Cys Ser Leu Gly Ile Trp Ile Cys Glu
115 120 125

gaa cta gtc cat gag tct cat cat cct cea att aag gaa gct ctg aat 432
Glu Leu Val His Glu Ser His His Pro Gln Ile Lys Glu Ala Leu Asn
130 135 140

WO 02/16561

PCT/EP01/09326

2/7

gtg att tgt gtt tcc tta aag ttt act aac aae sca gta gcc cac gta 480
Val Ile Cys Val Ser Leu Lys Phe Thr Asn Lys Thr Val Ala His Val
145 150 153 160

5 got tgt aac atg ctt cac atg ctg gtt cat tat gta cct aga ctt cag 528
Ala Cys Asn Met Leu His Met Leu Val His Tyr Val Pro Arg Leu Gln
165 170 175

10 att tac cag cct gat tot ccc ttg aza att att cag atc cta ata gct 576
Ile Tyr Gln Pro Asp Ser Pro Leu Lys Ile Ile Gln Ile Leu Ile Ala
180 185 190

acc atc acc cat ctt tta cca agt sca gag gct tca tct tat gaa atg 624
Thr Ile Thr His Leu Leu Pro Ser Thr Glu Ala Ser Ser Tyr Glu Met
195 200 205

gac aag agg ttg gta gta tct tta ctt ctg tgc ctt ctg gac tgg atc 672
Asp Lys Arg Leu Val Val Ser Leu Leu Leu Cys Leu Leu Asp Trp Ile
210 215 220

20 atg gcc tta cct cta aag aca ctg ctg caa cca ttt cat gct acg gga 720
Met Ala Leu Pro Leu Lys Thr Leu Leu Gln Pro Phe His Ala Thr Gly
225 230 235 240

25 gca gaa agc gat aaa sca gaa aaa tct gtt ctg aat tgc att tat aag 768
Ala Glu Ser Asp Lys Thr Glu Lys Ser Val Leu Asn Cys Ile Tyr Lys
245 250 255

30 gtt tta cat ggg tgt gtt tat gga gct cag tgt ttt agc aat cca agg 816
Val Leu His Gly Cys Val Tyr Gly Ala Gln Cys Phe Ser Asn Pro Arg
260 265 270

tat ttt ccc atg agc ctg tct gat ttg gca tct gta gat tat gat cct 864
Tyr Phe Pro Met Ser Leu Ser Asp Leu Ala Ser Val Asp Tyr Asp Pro
275 280 285

35 ttt atg cat ttg gaa agt ctg aaa gag cct gag cct ctg cac tct cct 912
Phe Met His Leu Glu Ser Leu Lys Glu Pro Glu Pro Leu His Ser Pro
290 295 300

40 gac tca gaa cga tct tct aaa ctg cag cca gta sca gaa gtg aae act 960
Asp Ser Glu Arg Ser Ser Lys Leu Gln Pro Val Thr Glu Val Lys Thr
305 310 315 320

45 caa atg cag cat gga tta atc tct ata gca gcc cgc act gtt att aca 1008
Gln Met Gln His Gly Leu Ile Ser Ile Ala Ala Arg Thr Val Ile Thr
325 330 335

50 cat ctg gta aat cac ctg ggc cat tat cca atg agc ggt ggt cct get 1056
His Leu Val Asn His Leu Gly His Tyr Pro Met Ser Gly Gly Pro Ala
340 345 350

atg cta aca agt cag gtg tgt gaa aat cnc gac aet cat tac agt gaa 1104
Met Leu Thr Ser Gln Val Cys Glu Asn His Asp Asn His Tyr Ser Glu
355 360 365

agt act gaa ctt tot cct gaa ctg ttt gag agt cca aat atc cag ttc 1152
Ser Thr Glu Leu Ser Pro Glu Leu Phe Glu Ser Pro Asn Ile Gln Phe
370 375 380

60 ttt gty tta aat aat aca acc tta gty tcc tgt atc cag atc aga tca 1200

WO 02/16561

PCT/EP01/09326

3/7

Phe Val Leu Asn Asn Thr Thr Leu Val Ser Cys Ile Gln Ile Arg Ser
385 390 395 400

5 gaa gag aat atg cct gga gga ggt tta tct gct ggc ctt gca tca gcc 1248
Glu Glu Asn Met Pro Gly Gly Gly Leu Ser Ala Gly Leu Ala Ser Ala
405 410 415

10 aat tca aat gtc aga atc ata gta cgt gat ctc tct gga aaa tat tca 1296
Asn Ser Asn Val Arg Ile Ile Val Arg Asp Leu Ser Gly Lys Tyr Ser
420 425 430

tgg gat tct gct ata ctg tat ggc cca cct cct gta agt ggc ttg tca 1344
Trp Asp Ser Ala Ile Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Val Ser Gly Leu Ser
435 440 445

15 gaa cct aca tct ttc atg ctt tca ttg tct cac caa gag aag cca gaa 1392
Glu Pro Thr Ser Phe Met Leu Ser Leu Ser His Gln Glu Lys Pro Glu
450 455 460

20 gag cct cgg aca tct aat gaa tgc tta gaa gat ata acc gta aaa gat 1440
Glu Pro Pro Thr Ser Asn Glu Cys Leu Glu Asp Ile Thr Val Lys Asp
465 470 475 480

25 gga ctt tct ctc cag ttt aaa aga ttt aga gaa act gta cca act tgg 1488
Gly Leu Ser Leu Gln Phe Lys Arg Phe Arg Glu Thr Val Pro Thr Trp
485 490 495

30 gat aca ata aga gat gaa gaa gat gtt ctt gat gag ctc ttg caa tat 1536
Asp Thr Ile Arg Asp Glu Glu Asp Val Leu Asp Glu Leu Leu Gln Tyr
500 505 510

35 ttg ggt gtt act agt cct gaa tgc tta cag aga act gga atc tca ctt 1584
Leu Gly Val Thr Ser Pro Glu Cys Leu Gln Arg Thr Gly Ile Ser Leu
515 520 525

aat att cct gct cca caa cct gtg tgc att tot gaa aaa caa gaa aat 1632
Asn Ile Pro Ala Pro Gln Pro Val Cys Ile Ser Glu Lys Gln Glu Asn
530 535 540

40 gat gtt att aat gct atc ctt aag caa cat aca gaa gaa aaa gaa ttt 1680
Asp Val Ile Asn Ala Ile Leu Lys Gln His Thr Glu Glu Lys Glu Phe
545 550 555 560

45 gtt gag aag ccc ttt aat gac tta aac atg ana gct gtg gaa caa gat 1728
Val Glu Lys His Phe Asn Asp Leu Asn Met Lys Ala Val Glu Gln Asp
565 570 575

50 gaa cca ata cct caa aaa cct cag tca gca ttt tat tat tgc aga ttg 1776
Glu Pro Ile Pro Gln Lys Pro Gln Ser Ala Phe Tyr Tyr Cys Arg Leu
580 585 590

55 chr ctt agt ata ttg gga atg aat tcc tgg gac aaa cgg agg agc ttt 2024
Leu Leu Ser Ile Leu Gly Met Asn Ser Trp Asp Lys Arg Arg Ser Phe
595 600 605

cat ctc ctg aag aaa aat gaa aag cta ctt aqa gaa ctt agg aac ttg 1872
His Leu Leu Lys Lys Asn Glu Lys Leu Leu Arg Glu Leu Arg Asn Leu
610 615 620

60 gat tca agg cag tgc cga gag aca cac aag att gca gta ttt tat gtt 1920
Asp Ser Arg Gln Cys Arg Glu Thr His Lys Ile Ala Val Phe Tyr Val

WO 02/16561

PC/T/EP01/09326

4/7

	625	630	635	640	
	gct gaa gga cca gaa gac aaa cac tcc att ctc acc aat aca gga gga				1968
5	Ala Glu Gly Gln Glu Asp Lys His Ser Ile Leu Thr Asn Thr Gly Gly	645	650	655	
	agt caa gca tat gaa gat ttt gta gct ggt ctt ggt tgg gag gta aat				2016
10	Ser Gln Ala Tyr Glu Asp Phe Val Ala Gly Leu Gly Trp Glu Val Asn	660	665	670	
	ctt aca aac cat tgt ggt ttt atg gga gga cta caa aaa aac aaa agc				2064
15	Leu Thr Asn His Cys Gly Phe Met Gly Gly Leu Gln Lys Asn Lys Ser	675	680	685	
	acc gga ttg acc aat cca tat ttt gct acc tct aca gta gaa gta ata				2112
20	Thr Gly Leu Thr Thr Pro Tyr Phe Ala Thr Ser Thr Val Glu Val Ile	690	695	700	
	itt cac atg tca aca aga atg cct tct gat tct gat gat tct ttg acc				2160
25	Phe His Met Ser Thr Arg Met Pro Ser Asp Ser Asp Ser Leu Thr	705	710	715	720
	aaa aaa ttg aga cat ttg gga aat gat gaa gbg cac att gtt tgg tca				2208
30	Lys Lys Leu Arg His Leu Gly Asn Asp Glu Val His Ile Val Trp Ser	725	730	735	
	gag cat act aga gac tac agc aga gga att att ccc aca gaa ttt ggt				2256
35	Glu His Thr Arg Asp Tyr Arg Arg Gly Ile Ile Pro Thr Glu Phe Gly	740	745	750	
	gat gtc ctt att gta ata tat cca atg aaa aat cac atg ttc agt att				2304
40	Asp Val Leu Ile Val Ile Tyr Pro Met Lys Asn His Met Phe Ser Ile	755	760	765	
	cag ata atg aga aaa cca gag gtt ccc ttc ttt ggt ccc ctt ttt gat				2352
45	Gln Ile Met Arg Lys Pro Gln Val Pro Phe Phe Gly Pro Leu Phe Asp	770	775	780	
	ggt gct aht gty aat gga aag gtt cta ccc att atg gtt aga gca aca				2400
50	Gly Ala Ile Val Asn Gly Lys Val Leu Pro Ile Met Val Arg Ala Thr	785	790	795	800
	gct ata aat gca agc cgt got ctg aaa tot ctg att cca ttg tat caa				2448
55	Ala Ile Asn Ala Ser Arg Ala Leu Lys Ser Leu Ile Pro Leu Tyr Gln	805	810	815	
	aac ttc tat gag gag aag gca cga tac ctg caa aca atg gtc cag cac				2496
60	Asn Phe Tyr Glu Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Gln Thr Ile Val Gln His	820	825	830	
	cac tta gaa cca aca aca ttt gaa gat ttt gca gca cag gtt ttt tct				2544
65	His Leu Glu Pro Thr Thr Phe Glu Asp Phe Ala Ala Gln Val Phe Ser	835	840	845	
	caa gct ccc tac cac cat tta cca tct ggt gcc gat cat taa				2592
70	Pro Ala Pro Tyr His His Leu Pro Ser Gly Ala Asp His	850	855	860	
80	<210> 2				
	<211> 862				

WO 02/16561

PCT/EP01/09326

5/7

```

<212> FRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
5 Met His Cys Gly Leu Leu His Ile Asp Gln Asp Ile Val Asn Thr Ile
  1                               5                               10 15
Ile Lys His Cys Ser Pro Gln Phe Phe Ser Leu Gly Leu Pro Gly Ala
  20                               25                               30
10 Thr Met Leu Ile Met Asp Phe Ile Val Ala Ala Gly Arg Val Ala Ser
  35                               40                               45
Ser Ala Phe Leu Asn Ala Pro Arg Val Glu Ala Gln Val Leu Leu Gly
  50                               55                               60
Ser Leu Val Cys Phe Pro Asn Leu Tyr Cys Glu Leu Pro Ser Leu His
  65                               70                               75                               80
15 Pro Asn Ile Pro Asp Val Ala Val Ser Gln Phe Thr Asp Val Lys Glu
  85                               90                               95
Leu Ile Ile Lys Thr Val Leu Ser Ser Ala Arg Asp Glu Pro Ser Gly
  100                              105                              110
Pro Ala Arg Cys Val Ala Leu Cys Ser Leu Gly Ile Trp Ile Cys Glu
  115                              120                              125
20 Glu Leu Val His Glu Ser His His Pro Gln Ile Lys Glu Ala Leu Asn
  130                              135                              140
Val Ile Cys Val Ser Leu Lys Phe Thr Asn Lys Thr Val Ala His Val
  145                              150                              155                              160
25 Ala Cys Asn Met Leu His Met Leu Val His Tyr Val Pro Arg Leu Gln
  165                              170                              175
Ile Tyr Gln Pro Asp Ser Pro Leu Lys Ile Ile Gln Ile Leu Ile Ala
  180                              185                              190
Thr Ile Thr His Leu Leu Pro Ser Thr Glu Ala Ser Ser Tyr Glu Met
  195                              200                              205
30 Asp Lys Arg Leu Val Val Ser Leu Leu Leu Cys Leu Leu Asp Trp Ile
  210                              215                              220
Met Ala Leu Pro Leu Lys Thr Leu Leu Gln Pro Phe His Ala Thr Gly
  225                              230                              235                              240
35 Ala Glu Ser Asp Lys Thr Glu Lys Ser Val Leu Asn Cys Ile Tyr Lys
  245                              250                              255
Val Leu His Gly Cys Val Tyr Gly Ala Gln Cys Phe Ser Asn Pro Arg
  260                              265                              270
Tyr Phe Pro Met Ser Leu Ser Asp Leu Ala Ser Val Asp Tyr Asp Pro
  275                              280                              285
40 Phe Met His Leu Glu Ser Leu Lys Glu Pro Glu Pro Leu His Ser Pro
  290                              295                              300
Asp Ser Glu Arg Ser Ser Lys Leu Gln Pro Val Thr Glu Val Lys Thr
  305                              310                              315                              320
45 Gln Met Gln His Gly Leu Ile Ser Ile Ala Ala Arg Thr Val Ile Thr
  325                              330                              335
His Leu Val Asn His Leu Gly His Tyr Pro Met Ser Gly Gly Pro Ala
  340                              345                              350
Met Leu Thr Ser Gln Val Cys Glu Asn His Asp Asn His Tyr Ser Glu
  355                              360                              365
50 Ser Thr Glu Leu Ser Pro Glu Leu Phe Glu Ser Pro Asn Ile Gln Phe
  370                              375                              380
Phe Val Leu Asn Asn Thr Thr Leu Val Ser Cys Ile Gln Ile Arg Ser
  385                              390                              395                              400
55 Glu Glu Asn Met Pro Gly Gly Gly Leu Ser Ala Gly Leu Ala Ser Ala
  405                              410                              415
Asn Ser Asn Val Arg Ile Ile Val Arg Asp Leu Ser Gly Lys Tyr Ser
  420                              425                              430
Trp Asp Ser Ala Ile Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Val Ser Gly Leu Ser
  435                              440                              445
60 Glu Pro Thr Ser Phe Met Leu Ser Leu Ser His Gln Glu Lys Pro Glu

```

WO 02/16561

PCT/EP01/09326

6/7

450 455 460
 Glu Pro Pro Thr Ser Asn Glu Cys Leu Glu Asp Ile Thr Val Lys Asp
 465 470 475 480
 Gly Leu Ser Leu Gln Phe Lys Arg Phe Arg Glu Thr Val Pro Thr Trp
 5 Asp Thr Ile Arg 485 490 495
 Asp Thr Ile Arg Asp Glu Glu Asp Val Leu Asp Glu Leu Leu Gln Tyr
 500 505 510
 Leu Gly Val Thr Ser Pro Glu Cys Leu Gln Arg Thr Gly Ile Ser Leu
 515 520 525
 10 Asn Ile Pro Ala Pro Gln Pro Val Cys Ile Ser Glu Lys Gln Glu Asn
 530 535 540
 Asp Val Ile Asn Ala Ile Leu Lys Gln His Thr Glu Glu Lys Glu Phe
 545 550 555 560
 Val Glu Lys His Phe Asn Asp Leu Asn Met Lys Ala Val Glu Gln Asp
 15 Glu Pro Ile Pro Gln Lys Pro Gln Ser Ala Phe Tyr Tyr Cys Arg Leu
 565 570 575
 Leu Leu Ser Ile Leu Gly Met Asn Ser Trp Asp Lys Arg Arg Ser Phe
 580 585 590 595
 20 His Leu Leu Lys Lys Asn Glu Lys Ser Leu Arg Glu Leu Arg Asn Leu
 600 605 610
 Asp Ser Arg Gln Cys Arg Glu Thr His Lys Ile Ala Val Phe Tyr Val
 615 620 625 630
 Ala Glu Gly Gln Glu Asp Lys His Ser Ile Leu Thr Asn Thr Gly Gly
 635 640 645
 25 Ser Gln Ala Tyr Glu Asp Phe Val Ala Gly Leu Gly Trp Glu Val Asn
 650 655 660 665
 Leu Thr Asn His Cys Gly Phe Met Gly Gly Leu Gln Lys Asn Lys Ser
 670 675 680 685
 30 Thr Gly Leu Thr Thr Pro Tyr Phe Ala Thr Ser Thr Val Glu Val Ile
 690 695 700 705
 Phe His Met Ser Thr Arg Met Pro Ser Asp Ser Asp Ser Leu Thr
 710 715 720 725
 Lys Lys Leu Arg His Leu Gly Asn Asp Glu Val His Ile Val Trp Ser
 730 735 740 745
 35 Glu His Thr Arg Asp Tyr Arg Arg Gly Ile Ile Pro Thr Glu Phe Gly
 750 755 760 765
 Asp Val Leu Ile Val Ile Tyr Pro Met Lys Asn His Met Phe Ser Ile
 770 775 780 785
 40 Gln Ile Met Arg Lys Pro Glu Val Pro Phe Phe Gly Pro Leu Phe Asp
 790 795 800 805
 Gly Ala Ile Val Asn Gly Lys Val Leu Pro Ile Met Val Arg Ala Thr
 810 815 820 825
 Ala Ile Asn Ala Ser Arg Ala Leu Lys Ser Leu Ile Pro Leu Tyr Gln
 830 835 840 845
 45 Asn Phe Tyr Glu Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Gln Thr Ile Val Gln His
 850 855 860 865
 His Leu Glu Pro Thr Thr Phe Glu Asp Phe Ala Ala Gln Val Phe Ser
 870 875 880 885
 50 Pro Ala Pro Tyr His His Leu Pro Ser Gly Ala Asp His
 890 895 900 905

55 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 60 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer01

WO 02/16561

7/7

PCT/EP01/09326

<400> 3
 taaggagca gaaagcgata aaa 23
 5
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 10
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer02
 <400> 4
 15 gcccagcaga taaacctcct ccag 24
 <210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer03
 25 <400> 5
 tgaaggtcgg agtcaacgga ttgggt 25
 30 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer04
 <400> 6
 catgtgggcc atgaggtcca ccac 24

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/016561 A3(61) International Patent Classification: C12N 15/12, 15/55, C07K 14/37, C12N 9/16, C07K 16/10, 15/18, G01N 33/573, 33/68
(74) Common Representative: MERCK PATENT GMBH, Frankfurt/Strasse 250, 64293 Darmstadt, (DE).

(21) International Application Number: PCT/EP01/09326

(22) International Filing Date: 13 August 2001 (13.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date: 0117781.5, 18 August 2000 (18.08.2000) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurt/Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(72) Inventors; and

(73) Inventors/Applicants (for US only): MASA ALVAREZ, Marc [ES/ES]; cf Josep Miral nº 21, 2º 3a, E-08020 Barcelona (ES); ROIDES GUBERN, Blanca [ES/ES]; cf Jaume Font, 3 2º, E-08849 Sant Climent de Llobregat (ES); MESSEGUER PEYPOCII, Ramon [ES/ES]; C/ Pascadors, 28A, 1-48330 Premia de Mar (ES); ROSELL VIVES, Elisabet [ES/ES]; C/ Enrique Granados, 43 3º, E-08008 Barcelona (ES); PUJOLATS NANCÓ, Jaume [ES/ES]; Mossèn Quint, Mallofret, 2, 6c 1a, E-08030 Barcelona (ES).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HD, 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, PE, PG, PH, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GM, GE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SP, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report(58) Date of publication of the international search report:
7 November 2002

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



WO 02/016561 A3

(54) Title: MTQ-111, A NOVEL HUMAN GTPASE-LIKE PROTEIN

(57) Abstract: MTQ-111 polypeptides and polynucleotides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques are disclosed. Also disclosed are methods for utilizing MTQ-111 polypeptides and polynucleotides in diagnostic assays.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/09326
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N15/55 C07K14/47 C12H9/16 C07K16/40 C07K16/18 G01N33/573 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation examined (classification systems followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 02 04510 A (INCYTE GENOMICS INC ; YAO MONIQUE G (US); YUE HENRY (US); AU YOUNG) 17 January 2002 (2002-01-17) See SEQ ID NOS:5 and 12	1,4,6-11
P,X	WO 00 58473 A (CURAGEN CORP ; LEACH MARTIN (US); SHINKETS RICHARD A (US)) 5 October 2000 (2000-10-05) SEQ ID NOS:3053 and 3054; DRF1527 page 200 --- -/--	1,4,6-11
<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 claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document in question "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
17 June 2002	01 07 2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818, Saarstrasse 2 M - 12203, Vienna, Austria Tel. (+43-70) 340-2040, Tx. 31 653 epon, Fax: (+43-70) 340-3076	Authorized officer Maddox, A	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 01/09326

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
L	DATABASE GENESEQ [Online] " Human brain expressed single exon probe SEQ ID NO: 8102." Database accession no. AAK08111 XP002202339 Cited in support of the disclosure of SEQ ID NO:8102 in WO0157275 the whole document ---	4
P,X	WO 01 57275 A (CHEN WENSHENG ;HANZEL DAVID K (US); PENN SHARRON G (US); RANK DAVI) 9 August 2001 (2001-08-09) See SEQ ID NO: 8102 ---	4
X	DATABASE EMBL [Online] 2 March 2000 (2000-03-02) "Human DNA sequence from clone RP11-235C23 on chromosome 9q31.1-31.3. Contains a pseudogene similar to KIAA1272, KIAA0884 and rat Tulip-1 and 2, the FGMD gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy protein, the TAL2 gene for T-cell acute lymphocytic leukemia 2 protein, ESTs, STSS, GSSs....." Database accession no. AL158070 XP092202340 NTS 41..5813,note="ba235c23.1 (pseudogene similar to KIAA1272, KIAA0884 and rat Tulip 1 and 2)"/note="match; proteins: Tr:Q9VB98 Tr:Q9ULE8 Tr:Q42180 Sw:P47736 Tr:Q9PWA2 Tr:Q75275 Sw:P49816 Tr:Q61037 Tr:Q9WUF6 Sw:P49815 Tr:P91315 Tr:Q44090 Tr:Q9U4G6 Tr:Q94960 Tr:Q9Y408 Tr:Q9W2X2 Tr:Q9VW83 Tr:Q55007 Tr:Q55008" ---	1-11
X	DATABASE EMBL [Online] 20 May 1999 (1999-05-20) " Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp566D133 [from clone DKFZp566D133]; partial cds" Database accession no. AL050050 XP002202341 CDS <1..1148;db_xref="SPTRMBL:Q9Y408"; /note="strong similarity to rat tulip 1/2" the whole document -& DATABASE SWISSPROT [Online] 1 November 1999 (1999-11-01) "HYPOTHETICAL 43.9 KDA PROTEIN (FRAGMENT)." Database accession no. Q9Y408 XP002202342 the whole document --- ---	1-11

Form PCT/89/210 (continuation of second sheet) (July 1989)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/09326

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 20 January 1998 (1998-01-20) "Rattus norvegicus tulip 2 mRNA, complete cds." Database accession no. AF041107 XP002202343 the whole document -& DATABASE SWISSPROT [Online] 1 June 1998 (1998-06-01) "TULIP 2." Database accession no. 055008 XP002202344 abstract</p> <p>---</p>	1-11
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 15 October 1999 (1999-10-15) "Human DNA sequence from clone RP11-287B20 on chromosome 20 Contains part of gene KIAA1272 for a protein similar to rat tulip 2, ESTs, STSs and GSSs." Database accession no. AL121896 XP002202345 /db_xref="SPTREMBL:Q98QT7";/gene="bA287B20.1";product="bA287B20.1.2 (KIAA1272 similar to rat tulip proteins 1 and 2, isoform 2)"/protein_id="CAC27348.1" /db_xref="SPTREMBL:Q98QT6";/note="continued from dJ1049G11 (AL078634)";/note="match: proteins: Tr:055008 Tr:Q9Y408";/gene="bA287B20.1";/product="bA287B20.1.1 (KIAA1272 similar to rat tulip proteins 1 and 2, isoform 1)";/protein_id="CAC27349.1";/note="match: cDNAs: Em:AK002211 Em:AB032400 Em:AF041106 Em:AF041107 Em:AL050050 Em:AB033098" -& DATABASE SWISSPROT [Online] 1 June 2001 (2001-06-01) "BA287B20.1.1 (KIAA1272 SIMILAR TO RAT TULIP PROTEINS 1 AND 2, ISOFORM 1) (FRAGMENT)." Database accession no. Q98QT6 XP002202346 abstract -& DATABASE SWISSPROT [Online] 1 June 2001 (2001-06-01) "BA287B20.1.2 (KIAA1272 SIMILAR TO RAT TULIP PROTEINS 1 AND 2, ISOFORM 2) (FRAGMENT)." Database accession no. Q98QT7 XP002202347 the whole document</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1-11

Form PCT/ISA/210 (continuation of official sheet) (July 1997)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 01/89326

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant pages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 12 March 1999 (1999-03-12) "Homo sapiens mRNA; EST DKFZp434P1114_r1 (from clone DKFZp434P1114)" Database accession no. AL040683 XP002202348 the whole document	4
A	DATABASE EMBL [Online] 11 November 1999 (1999-11-11) "Homo sapiens mRNA for KIAA1272 protein, partial cds." Database accession no. AB033098 XP002202349 the whole document - & DATABASE SWISSPROT [Online] 1 May 2000 (2000-05-01) "KIAA1272 PROTEIN (FRAGMENT)." Database accession no. Q9ULE8 XP002202350 abstract	1-11
A	--- CRINO PETER B ET AL: "New developments in the neurobiology of the tuberous sclerosis complex." NEUROLOGY, vol. 53, no. 7, 22 October 1999 (1999-10-22), pages 1384-1390, XP000004619 ISSN: 0028-3878 the whole document	1-11
A	--- WO 95 18226 A (UNIV WALES MEDICINE ;UNIV ERASMUS (NL); MEDICAL RES COUNCIL (GB);) 6 July 1995 (1995-07-06) the whole document	1-11
A	--- "Tuberous scleriosis complex in flies too?" NCBI COFFEE BREAK: ARTICLE REFERENCE CB15.270700, [Online] 27 July 2000 (2000-07-27), XP002202338 Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Coffeebre ak/CB15.gigas/TuberousScleriosis.pdf> [retrieved on 2002-06-14] the whole document	1-11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 01/09326

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0204510	A	17-01-2002	AU 7184301 A	21-01-2002
			WO 0204510 A2	17-01-2002
WO 0058473	A	05-10-2000	AU 3774500 A	16-10-2000
			EP 1165784 A2	02-01-2002
			WO 0058473 A2	05-10-2000
WO 0157275	A	09-08-2001	AU 3087801 A	14-08-2001
			AU 3087901 A	14-08-2001
			AU 3088001 A	14-08-2001
			AU 3088101 A	14-08-2001
			AU 3088201 A	14-08-2001
			AU 3088301 A	14-08-2001
			AU 3275701 A	14-08-2001
			AU 3275801 A	20-11-2001
			AU 3275901 A	14-08-2001
			AU 3276001 A	14-08-2001
			AU 3311401 A	14-08-2001
			AU 3658901 A	14-08-2001
			AU 6343201 A	11-12-2001
			GB 2361238 A, B	17-10-2001
			WO 0157270 A2	09-08-2001
			WO 0157271 A2	09-08-2001
			WO 0157272 A2	09-08-2001
			WO 0157273 A2	09-08-2001
			WO 0186003 A2	15-11-2001
			WO 0157274 A2	09-08-2001
			WO 0157275 A2	09-08-2001
			WO 0157276 A2	09-08-2001
			WO 0157277 A2	09-08-2001
			WO 0157278 A2	09-08-2001
			WO 0157251 A2	09-08-2001
			WO 0157252 A2	09-08-2001
			WO 0192524 A2	06-12-2001
			US 2002048763 A1	25-04-2002
			US 2002048800 A1	25-04-2002
			GB 2360284 A, B	19-09-2001
			EP 1158049 A1	28-11-2001
			WO 0226618 A2	04-04-2002
			WO 9518226	A
AU 1322795 A	17-07-1995			
EP 0736094 A1	09-10-1996			
EP 0733110 A1	25-09-1996			
WO 9518225 A1	06-07-1995			
WO 9518226 A1	06-07-1995			
JP 9507751 T	12-08-1997			
JP 9507752 T	12-08-1997			
US 6207374 B1	27-03-2001			
US 6380360 B1	30-04-2002			
US 6232452 B1	15-05-2001			
AU 2892195 A	05-01-1996			
EP 0777728 A1	11-06-1997			
WO 9534649 A2	21-12-1995			

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 1/15	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/16	B
C 1 2 N 9/16	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/42	
C 1 2 Q 1/42	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 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(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 マーサ アルバレス、 マーレ

スペイン国 エ - 0 8 0 2 0 パルセローナ カーエ ジョウセフ ミレット 2 1 番 2 - 3 号

(72) 発明者 ロデス グベルン、 ブランカ

スペイン国 エ - 0 8 8 4 9 サント クリメント デ ジョウブレガット カーエ ハウメ フ
オント 3 番 2 号

(72) 発明者 メセゲール ペイポッシュ、 ラモン

スペイン国 エ - 0 8 3 3 0 プレミア デ マル カーエ ペスカドウレス 2 8 番地エー号

(72) 発明者 ロセル ヴィヴェス、 エリザベット

スペイン国 エ - 0 8 0 0 8 パルセローナ カーエ エンリケ グラナドス 4 3 番地 3 号

(72) 発明者 ピウラット サンコウ、 ハウメ

スペイン国 エ - 0 8 0 3 0 パルセローナ モッセン クンティ マジョウフレ 2 番 6 - 1
号

F ターム(参考) 2G045 CB01 FB02 FB03

4B024 AA01 BA11 BA63 CA04 CA09 CA12 CA20 DA02 DA03 EA04

GA13 HA11 HA13 HA14

4B050 CC01 CC04 CC05 DD11 EE01 LL01 LL03 LL05

4B063 QA01 QA05 QQ21 QQ33 QQ41 QQ43 QQ53 QQ61 QQ63 QQ79

QQ89 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR56 QR57 QR62 QR77

QR80 QS16 QS25 QS34 QS36 QX01 QX02 QX04 QX10

4B065 AA01X AA58X AA72X AA90X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA05 BA16

CA24 CA31 CA44 CA46

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 DA89

EA20 EA50 FA71 FA74

专利名称(译)	MFQ-111, 一种新型人类GTP水解酶, 如蛋白质		
公开(公告)号	JP2004507239A	公开(公告)日	2004-03-11
申请号	JP2002522235	申请日	2001-08-13
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	マーサアルバレスマーレ ロデスグベルンブランカ メセゲールペイポッシュラモン ロセルヴィヴェスエリザベット ピウラットサンコウハウメ		
发明人	マーサ アルバレス、 マーレ ロデス グベルン、 ブランカ メセゲール ペイポッシュ、 ラモン ロセル ヴィヴェス、 エリザベット ピウラット サンコウ、 ハウメ		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/40 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/16 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/55 C12Q1/02 C12Q1/42 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/573 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/4722 C12N9/16		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C07K16/28 C07K16/40 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/16.B C12Q1/02 C12Q1/42 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B050/CC01 4B050/CC04 4B050/CC05 4B050/DD11 4B050/EE01 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ21 4B063/QQ33 4B063/QQ41 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ63 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR57 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063/QX04 4B063/QX10 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA05 4B065/BA16 4B065/CA24 4B065/CA31 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	宫崎昭雄 伊藤 克博		
优先权	2000117781 2000-08-18 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了MFQ-111多肽和多核苷酸以及通过重组技术生产这种多肽的方法。还公开了在诊断测定中使用MFQ-111多肽和多核苷酸的方法。

