

(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2004-528023

(P2004-528023A)

(43) 公表日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(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 16/40	C O 7 K 16/40	4 B O 2 4
C O 7 K 19/00	C O 7 K 19/00	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-566220 (P2002-566220)	(71) 出願人	591032596
(86) (22) 出願日	平成14年1月25日 (2002.1.25)		メルク パテント ゲゼルシャフト ミツ ト ベシュレンクテル ハフトング
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月18日 (2003.8.18)		Merck Patent Gesell schaft mit beschræ nkter Haftung
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/000753		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	W02002/066507		Frankfurter Str. 25 0, D-64293 Darmstadt , Federal Republic o f Germany
(87) 国際公開日	平成14年8月29日 (2002.8.29)		
(31) 優先権主張番号	01103779.3	(74) 代理人	100123788
(32) 優先日	平成13年2月16日 (2001.2.16)		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】 120kDにおけるヒスチジン・フォスファターゼ相互作用タンパク質

(57) 【要約】

PHPIP-120のポリペプチドおよびポリヌクレオチド、ならびにかかるポリペプチドを組換え技術によって製造するための方法が開示される。また、診断アッセイにおいて、該PHPIP-120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PHP1P-120リガンドポリペプチドであり、上記(a)～(d)のPHP1P-120リガンドは、配列番号：9に記載のアミノ酸配列若しくはその変異体を含むその受容体に特異的に結合する能力を有する。 10

【請求項 2】

配列番号：2のポリペプチド配列を含んでなる、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号：2のポリペプチド配列である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

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

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

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

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

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

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

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

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

からなる群から選択されるポリヌクレオチド。

【請求項 5】

(a) 配列番号：1のポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1のポリヌクレオチド； 40

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

(d) 配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

からなる群から選択される、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

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

【請求項 7】

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

【請求項 8】

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

【請求項 9】

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

【請求項 10】

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

【請求項 11】

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

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

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

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

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

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

、からなる群から選択される方法と、

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

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、以降、時に、「新規タンパク質・ヒスチジン・ホスファターゼ・120 kD 反応パートナー (PHPIP - 120) 」と称する、新たに同定されたポリペプチド、およびかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、診断ならびに、治療において潜在的に有用なアゴニスト、アンタゴニストとなりえる化合物の同定におけるそれらの使用、ならびに、かかるポリヌクレオチドの製造に関する。

【0002】

(発明の背景)

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

【0003】

近年、最初のヒト・タンパク質・ヒスチジン・ホスファターゼ (PHP1) が同定された。その酵素はウサギ肝臓抽出物から単離され、特徴付けられた。ヒト細胞株では、PHP

10

20

30

40

50

1 は細胞質において見られる。C. elegans におけるオルソログタンパク質の機能の研究では、神経細胞の局在化を示した。PHP1 の C. elegans ホモログは、感覚運動および咽頭の感音性 MC、M3 および I2 に位置している。線虫の咽頭とヒトの心臓との類似性は示されており (PNAS 1998 95、5072-5)、従って、PHP1 およびリガンドは様々な心疾患性の病気と関連がある。

【0004】

最近の適用においては、PHP1 とタンパク質の相互作用の研究では、遺伝子配列と、リガンドであり分子レベルでは PHP1 の相互作用パートナーである遺伝子の機能とを定義するために DNA 配列技術と生物情報学 (バイオインフォマティクス) とが併用されている。

10

【0005】

(発明の概要)

PHP1 のタンパク質相互作用の研究においては、PHPIP-120 はまだ公知の相互作用のパートナーとはなっていない。

【0006】

本発明は、PHPIP-120、特に、PHPIP-120 ポリペプチドおよび PHPIP-120 ポリヌクレオチド、組換え体およびその製造方法に関する。かかるポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、それらに限定はされないものの、自閉症：脂肪酸の基礎代謝にリンクする神経細胞の細胞膜活性の不良 (Am J Med Genet. 2000 Dec 4; 96(6): 765-70)、統合失調症 (Psychiatry Q 1994 Winter; 65(4): 287-97)、周期的に起こる家族性関節炎 (Arthritis Rheum 2000 Sep; 43(9): 2041-5)、バルデー-ビードル症候群 (BBS4) (Genomics 1997 Apr 1; 41(1): 93-9)、先天性赤血球異形成貧血 III 型 (Haematologica 2000 85、753-7)、および比較ゲノム・バイブリダイゼーションの特徴が染色体 15q22-q26 および組織肉腫における最も頻繁に起こる不均衡の部位として PHPIP-240 における染色体 13q32-q34 で同定する悪性線維性組織球種 (Cancer Genet Cytogenet 1999; 111、134-8) を含む、特定の疾患 (以降、「本発明の疾患」と称する) を治療する方法に関連して、注目されている。さらなる形態において、本発明は、本発明により提供される材料を使用して、アゴニストおよびアンタゴニスト (例えば、阻害剤) を同定するための方法、ならびにその同定された化合物を用いて、PHPIP-120 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 PHPIP-120 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。

20

30

【0007】

(発明の説明)

第1の形態において、本発明は PHPIP-120 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；

40

(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；

50

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

【0008】

本発明のポリペプチドは、PHP1P-120ファミリーのポリペプチドの一員であると考えられる。それらは、ヒト・タンパク質・ヒスチジン・ホスファターゼ(PHP1)であるために、PHP1P-120は興味もたれている。哺乳類におけるヒスチジン・リン酸化は、多量体のタンパク質の複合体を介してシグナル伝達をもたらす。ヒト細胞株ではPHP1は、神経細胞の局在化において細胞質に存在する。しかしながら、他の細胞のタイプではその位置の外側においても発現する。従って、新しいリガンドは、他の疾患および特に様々な心疾患性の病気に関連する。

10

【0009】

該PHP1P-120の生物学的性質を、以降、「PHP1P-120の生物学的活性」、または「PHP1P-120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PHP1P-120の生物学的活性を示す。

【0010】

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。

20

【0011】

本発明のポリペプチドの好ましいフラグメントには、配列番号：2のアミノ酸配列に由来する、少なくとも30、50または100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチド、あるいは配列番号：2のアミノ酸配列から、少なくとも30、50または100の連続したアミノ酸が末端から除去または欠失しているアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチドが含まれる。好ましいフラグメントは、PHP1P-120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

【0012】

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

【0013】

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

【0014】

さらなる形態において、本発明は、PHP1P-120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

50

%、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

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

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

(d) 配列番号：1の単離されたポリヌクレオチド；

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

(f) 配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド； 10

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

(h) 配列番号：2のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド；

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

(j) 配列番号：2のポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するか、または含んでなる単離されたポリヌクレオチド；ならびに 20
上記のポリヌクレオチドのフラグメントおよび変異体である、またはその全長にわたって、上記のポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチドが含まれる。

【0015】

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

【0016】

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。

【0017】

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。

【0018】

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、 40

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

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

(c) 配列番号：1のDNA配列のRNA転写物を含んでなる；あるいは

(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。

【0019】

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。

【0020】

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、それらの相等的なポリペプチドおよびポリヌクレオチドと類似する生物学的な機能/性質を有することが期待される。さらに、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、少なくとも1つのPHPIP-120活性を有する。

10

【0021】

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

20

【0022】

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デニレーション・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。

30

【0023】

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

40

【0024】

50

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

10

【0025】

当業者は、多くの場合において、該ポリペプチドをコードする領域は、5'末端に至るまで完全には伸長していない点で、単離されたcDNA配列は不完全であることもあることを理解している。これは、第1鎖のcDNA合成の際に、mRNAテンプレートのDNAコピーを完成させることができない、逆転写酵素、すなわち、本来、低い「プロセシング能」(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。

20

【0026】

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。

30

40

【0027】

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。

【0028】

50

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、スクレイプ負荷、パリスティック導入または感染が含まれる。

10

【0029】

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。

【0030】

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。

20

30

【0031】

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

40

【0032】

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。

50

【0033】

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。

【0034】

診断に供する核酸は、対象の細胞、例えば、血液、尿、唾液、組織生検または剖検試料などから得ることができる。ゲノムDNAを、直接、検出のために使用してもよく、あるいは、分析に先立ち、PCR、好ましくはRT-PCR、または他の増幅技術を使用して、酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAもまた、同様な手順で使用することができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較して、増幅産物のサイズにおける変化によって検出することができる。点変異は、増幅されたDNAを、標識されたPHPIP-120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）。

【0035】

PHPIP-120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。

【0036】

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

【0037】

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

10

20

30

40

50

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。

【0038】

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。

【0039】

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染色体15q22-q23にマッピングされる。

【0040】

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。

【0041】

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

【0042】

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。

【0043】

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。

【0044】

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。

【0045】

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。

【0046】

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

10

20

30

40

50

／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。

10

【0047】

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

20

30

【0048】

該スクリーニング方法は、候補化合物に直接的または間接的に連結されている標識を利用して、該ポリペプチド、あるいは該ポリペプチドまたはその融合タンパク質を表出している細胞または膜に対する候補化合物の結合を単に測定することでもよい。代わりに、該スクリーニング方法は、標識された競合剤（例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト）に対して、候補化合物のポリペプチドに対する競合的な結合の（定性的または定量的に）測定または検出を含んでもよい。さらに、これらのスクリーニング方法では、該ポリペプチドを表出している細胞に適する検出システムを使用して、候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害によって誘起されるシグナルをもたらすか否かを調べることもよい。活性化の阻害剤は、一般には既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、そして、候補化合物の存在による、アゴニストによる活性化に対する作用を観測する。さらに、該スクリーニング方法は、候補化合物を、本発明のポリペプチドを含有する溶液と混合して、混合体を形成させる工程、混合物におけるPHPIP-120活性を測定する工程、および混合物のPHPIP-120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。

40

【0049】

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., Ana

50

1. 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。

【0050】

既に記載したような、Fc部分およびPHPIP-120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)。

【0051】

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。

【0052】

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。

【0053】

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。

【0054】

スクリーニング方法はまた、トランスジェニック技術およびPHPIP-120遺伝子の使用を含んでもよい。トランスジェニック動物を構築する手法は、十分に確立されている。例えば、受精した卵母細胞の雌性前核へのマイクロインジェクション、移植前または移植後の胚へのレトロウイルス移入、エレクトロポレーションなどによって、遺伝子操作された胚性幹細胞の宿主胚盤胞への注入を通して、PHPIP-120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

10

20

30

40

50

て、特異的な細胞または組織を対象とする、特定の細胞または組織においてのみ起きていてもよく、あるいは、動物内の全て、または実質的に全ての細胞において生じてもよい。トランスジェニック動物の手法はまた、導入された遺伝子が、本発明のポリペプチドを大量に供するために発現させられる動物全体の発現 - クローニング・システムを提供する。

【 0 0 5 5 】

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

10

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。

【 0 0 5 6 】

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。

【 0 0 5 7 】

(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。

【 0 0 5 8 】

20

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

【 0 0 5 9 】

「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。

30

【 0 0 6 0 】

「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

40

50

も包含する。

【0061】

「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; Seiffter 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）。

【0062】

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。

【0063】

「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

【0064】

「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。

【0065】

「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

【0066】

「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

【0067】

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。

【0068】

「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

【0069】

「%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。

【0070】

「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。

10

【0071】

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

20

30

【0072】

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)。

40

【0073】

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

50

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。

【0074】

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

【0075】

「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。

10

20

【0076】

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。

30

【0077】

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。

40

【0078】

「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。

50

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。

【0079】

「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-*PHP1P*-120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*PHP1P*-120を形成させるために、Fc-*PHP1P*-120または該*PHP1P*-120の断片の機能的発現を行う上で好都合である。Fc-*PHP1P*-120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*PHP1P*-120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。

10

20

【0080】

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。

【0081】

(さらなる実施例)

プラスミド構築

(すべてのプラスミドは配列表により検証された。)

pDBLeu-*PHP1*のクローニング

*PHP1*をコードするcDNAを、プライマーHis p a s e - S a l 1 - u p (配列番号: 3、プライマー1)およびHis a p a s e - N o t - l o w (配列番号: 4、プライマー2)を用いてPCR増幅を行い、ベクターpCR2.1TOPO (Invitrogen製)に連結した。続いて、ベクターを、Sal1およびNot1を用いて切断し、*PHP1*コード化断片をpDBLeuに連結した。

30

【0082】

pLexA-MCS-*PHP1*のクローニング

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

40

【0083】

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

【0084】

融合タンパク質

50

G a l 4 タンパク質および C 末端に連結された全長の P H P - 1 タンパク質配列を含む G a l 4 - P H P 1 融合タンパク質のペプチド配列が配列番号 7 に開示されている。

【 0 0 8 5 】

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

【 0 0 8 6 】

P H P 1 相互作用タンパク質を選択するための酵母ツーハイブリッドスクリーニング
酵母ツーハイブリッドスクリーニング方法は、技術的にシンプルであり非常に迅速であるため、ほんの数日で数百万ものクローンライブラリーをスクリーニング可能である。そのシステムの全ての要素は購入可能である。そのスクリーニングにおいて、G a l 4 (A A 1 - 1 4 7) ドメインおよび S B 4 0 ラージの N L A に融合される G a l 4 トランス活性化ドメイン (A A 7 6 8 - 8 8 1) を結合する D N A が、受容体ヒスチジン・フォスファターゼおよびタンパク質リガンドの相互作用により接触されている場合、H i s 3 指標遺伝子が活性化されるだけである。このスクリーニングから単離されたリガンドはヒスチジン・フォスファターゼに結合するが、その結合パートナーは第 2 の違い - L e x A ベース酵母ツーハイブリッド選択スキーム - において確認されている。もし、両方のスクリーニング手段が同時に実行されるならば、得られたリガンドは他のシステムでテストされる。

10

【 0 0 8 7 】

p D B L e u - P H P 1 をおとり構築物としておよび H E L A ベースの c D N A ライブラリーをえものとして使用する酵母ツーハイブリッドスクリーニング (P r o q u e s t , L i f e T e c h n o l o g i e s) を記載の通りに行った (セレクションは、25mM の 3 - アミノトリアゾールを含有する - T r p 、 - L e u 、 - H i s 最少培地において行われた)。相互作用は、製造者のプロトコルに記載されるように、ウラシル、トリプトファンおよびロイシンを含まない培地によって確認された。

20

【 0 0 8 8 】

P H P I P - 1 2 0 を代表する 1 つの陽性クローンが単離され、配列決定された。

【 0 0 8 9 】

L e x A ベース酵母ツーハイブリッド選択スキームを使用する P H P I P - 1 2 0 リガンドの相互作用の確認：

30

異なるセレクションスキームにおける相互作用を確認するために、M a t c h m a k e r L e x A ツーハイブリッドシステム (C l o n t e c h) を製造者の条件に従って使用した。ベクター p L e x A - M C S - P H P - 1 をおとりとして使用した。ベクター p P C 8 6 - P H P I P 1 2 0 は、G a l 4 ベースの酵母ツーハイブリッドシステムにおいて上記のように単離されたが、これをえものとして使用した。

【 0 0 9 0 】

p 5 3 およびラージ T 抗原の相互作用を S . c e r e v i s i a e s t r a i n E G Y 4 8 - p S H 1 8 - 3 2 においてはポジティブコントロールとして用いられる。

【 0 0 9 1 】

コンピューター上での分析

40

上記記載の酵母ツーハイブリッドスクリーニングにおいて同定された P H P 1 リガンドの遺伝子は染色体 1 5 q 2 2 - q 2 3 に位置している。上記同定された遺伝子は 1 0 4 7 A A 長のタンパク質をコードし、他の公知のタンパク質との重要な配列同一性を示さない。この遺伝子の部分的な配列および対応する仮想的な O R F 予測がデータバンクに収められている一方で、本研究において明らかにされたタンパク質の機能は今まで示されていなかった。

【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
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/066507 A2

- (51) **International Patent Classification:** C07K 14/47, C12N 15/12, 1/21, C07K 16/46, 16/18, G01N 33/68
- (21) **International Application Number:** PCT/EP02/00753
- (22) **International Filing Date:** 25 January 2002 (25.01.2002)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:** 01103779.3 16 February 2001 (16.02.2001) EP
- (71) **Applicant (for all designated States except US):** MERCK PATENT GMBH [DE/DU]; Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (72) **Inventors; and**
- (73) **Inventors/Applicants (for US only):** HOCK, Björn [DE/DE]; Nordstrasse 2a, 63477 Maintal (DE); DÜCKER, Klaus [DE/DE]; Eibelerstrasse 5, 64291 Darmstadt (DE); KELLNER, Roland [DE/DE]; Am Katzenpfad 10, 64646 Heppenheim (DE).
- (74) **Common Representative:** MERCK PATENT GMBH, Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (81) **Designated States (national):** AF, AG, AI, 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, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that 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 02/066507 A2

(54) **Title:** HISTIDINE PHOSPHATASE INTERACTING PROTEIN WITH 120KD(57) **Abstract:** PHP1P-120 polypeptides and polynucleotides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques are disclosed. Also disclosed are methods for utilizing PHP1P-120 polypeptides and polynucleotides in diagnostic assays.

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

Histidine Phosphatase Interacting Protein with 120kD**Field of the Invention**

5 This invention relates to newly identified polypeptides and polynucleotides encoding such polypeptides sometimes hereinafter referred to as „novel Protein Histidine Phosphatase Interacting Partner of 120kD (PHPIP-120)“, to their use in diagnosis and in identifying compounds that may be agonists, antagonists that are potentially useful in therapy, and to production of such polypeptides and polynucleotides.

10 Background of the invention

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

15 Recently, the first human protein histidine phosphatase (PHP1) has been identified. The enzyme was isolated from rabbit liver extracts and characterized. In human cell lines PHP1 is displayed in the cytoplasm. Functional studies with the orthologue protein in *C.elegans* showed a neuronal localization. The *C.elegans* homologue of PHP1 has been localized in motor- and pharyngeal sensorineurons MC, M3 and I2. The analogy from a nematode's pharynx to the human heart is described (PNAS 1998 95,5072-5) thus, PHP1 and ligand could be relevant for various cardiovascular diseases.

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

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

Summary of the Invention

Protein interaction studies with PHP1 identified the PHPIP-120 as a yet unknown interaction partners.

5 The present invention relates to PHPIP-120, in particular PHPIP-120 polypeptides and PHPIP-120 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 autism: a defect in nerve cells membrane activity linked to the fatty acid metabolim (Am J Med Genet. 2000 Dec 4;96(6):765-70), schizophrenia (Psychiatr Q 1994 Winter;65(4):287-97), familial recurrent arthritis (Arthritis Rheum 2000 Sep;43(9):2041-5), Bardet-Biedl Syndrome (BBS4) (Genomics 1997 Apr 1;41(1):93-9), congenital dyserythropoietic anemia type III (Haematologica 2000 85;753-7), and Malignant fibrous histocytomas where comparative genomic hybridization (CGH) profiles identified chromosome 15q22-q26 as well as the locus of PHPIP-240 chromosome 13q32-q34 as the most frequent imbalance in this tissue sarcoma (Cancer Genet Cytogenet 1999;111,134-8) hereinafter referred to as "diseases of the invention". In a further aspect, the invention relates to methods for identifying agonists and antagonists (*e.g.*, inhibitors) using the materials provided by the invention, and treating conditions associated with PHPIP-120 imbalance with the identified compounds. In a still further aspect, the invention relates to diagnostic assays for detecting diseases associated with inappropriate PHPIP-120 activity or levels.

25 Description of the Invention

In a first aspect, the present invention relates to PHPIP-120 polypeptides. Such polypeptides include:

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

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

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

(e) the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2; and

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

(g) fragments and variants of such polypeptides in (a) to (f).

10 Polypeptides of the present invention are members of the PHPIP-120 family of polypeptides. PHPIP-120 is therefore of interest because they are ligands for human protein histidine phosphatase (PHP1). Histidine phosphorylation in mammals is involved in signal transduction via multimeric protein complexes. In human cell lines PHP1 is displayed in the cytoplasm of cells with neuronal localization, however other cell types outside that location do express it as well. Thus the new ligand is relevant for other diseases and especially for various cardiovascular disorders.

15 The biological properties of the PHPIP-120 are hereinafter referred to as "biological activity of PHPIP-120" or "PHPIP-120 activity". Preferably, a polypeptide of the present invention exhibits at least one biological activity of PHPIP-120.

20 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 25 3, from 3 to 2, from 2 to 1 or 1 amino acids are inserted, substituted, or deleted, in any combination.

30 Preferred fragments of polypeptides of the present invention include an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous amino acids from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous amino acids truncated or deleted from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. Preferred fragments are biologically active fragments that mediate the biological activity of PHPIP-120, including those

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

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.

5 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
10 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.

15 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.

20 In a further aspect, the present invention relates to Phipp-120 polynucleotides. Such polynucleotides include:

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

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

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

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

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

10 (j) an isolated 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

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

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

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

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

30 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;

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

(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;

5 and RNA polynucleotides that are complementary thereto.

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
10 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.

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
15 polypeptides and polynucleotides of the present invention have at least one Phip-120 activity.

Polynucleotides of the present invention may be obtained using standard cloning and screening techniques from a cDNA library derived from mRNA in cells of heart, skeletal muscle, liver, kidney, brain. However Phip1 might as
20 well be isolated from other human tissues, where lower levels are found. The substrate specificity identifies a role in the biosynthesis of fatty acids via preparation of acetylCoA. Accordingly, the biosynthesis of acetylcholine is regulated in nerve cells.

(see for instance, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Polynucleotides of the invention can also be obtained from natural
25 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
30 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

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

5 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.

10 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
15 paralogs from human sources and orthologs and paralogs from species other than human) that have a high sequence similarity to SEQ ID NO:1, typically at least 95% identity. Preferred probes and primers will generally comprise at least 15 nucleotides, preferably, at least 30 nucleotides and may have at least 50, if not at least 100 nucleotides. Particularly preferred probes will have
20 between 30 and 50 nucleotides. Particularly preferred primers will have between 20 and 25 nucleotides.

A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention, including homologs from species other than human, may be obtained by a process comprising the steps of screening a library under stringent hybridization
25 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
30 solution comprising: 50% formamide, 5xSSC (150mM NaCl, 15mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5x Denhardt's solution, 10 % dextran sulfate, and 20 microgram/ml denatured, sheared salmon sperm DNA; followed by washing the filters in 0.1x SSC at about 65°C. Thus the present invention also includes isolated polynucleotides, preferably with a nucleotide
35 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.

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

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

10 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) 15 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' 20 primers, that is, primers designed to anneal within the amplified product (typically an adapter specific primer that anneals further 3' in the adaptor sequence and a gene specific primer that anneals further 5' in the known gene sequence). The products of this reaction can then be analyzed by DNA sequencing and a full-length cDNA constructed either by joining the product 25 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.

30 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 35 also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention.

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

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.,
5 Basic Methods in Molecular Biology (1986) and Sambrook *et al. (ibid)*. Preferred methods of introducing polynucleotides into host cells include, for instance, calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, transfection, micro-injection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic introduction or infection.

10 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.

15 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,
20 fowl pox viruses, pseudorabies viruses and retroviruses, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, such as cosmids and phagemids. The expression systems may contain control regions that regulate as well as engender expression. Generally, any system or vector that is able to maintain,
25 propagate or express a polynucleotide to produce a polypeptide in a host may be used. The appropriate polynucleotide sequence may be inserted into an expression system by any of a variety of well-known and routine techniques, such as, for example, those set forth in Sambrook *et al., (ibid)*. Appropriate secretion signals may be incorporated into the desired polypeptide to allow
30 secretion of the translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum, the periplasmic space or the extracellular environment. These signals may be endogenous to the polypeptide or they may be heterologous signals.

If a polypeptide of the present invention is to be expressed for use in screening assays, it is generally preferred that the polypeptide be produced at the
35 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

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

produced intracellularly, the cells must first be lysed before the polypeptide is recovered.

5 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.

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

15 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 PHLIP-120 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).

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

- 5 An array of oligonucleotides probes comprising PHPIP-120 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.
- 10 Detection of abnormally decreased or increased levels of polypeptide or mRNA expression may also be used for diagnosing or determining susceptibility of a subject to a disease of the invention. Decreased or increased expression can be measured at the RNA level using any of the methods well known in the art for the quantitation of polynucleotides, such as, for example, nucleic acid amplification, for instance PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blotting and other hybridization methods. Assay techniques that can be used to determine levels of a protein, such as a polypeptide of the present invention, in a sample derived from a host are well-known to those of skill in the art. Such assay methods include radio-immunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis and ELISA assays.
- 15 Thus in another aspect, the present invention relates to a diagnostic kit comprising:
- (a) a polynucleotide of the present invention, preferably the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, or a fragment or an RNA transcript thereof;
 - (b) a nucleotide sequence complementary to that of (a);
 - 25 (c) a polypeptide of the present invention, preferably the polypeptide of SEQ ID NO:2 or a fragment thereof; or
 - (d) an antibody to a polypeptide of the present invention, preferably to the polypeptide of SEQ ID NO:2.
- 30 It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component. Such a kit will be of use in diagnosing a disease or susceptibility to a disease, particularly diseases of the invention, amongst others.
- The polynucleotide sequences of the present invention are valuable for chromosome localisation studies. The sequence is specifically targeted to, and

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

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. Spillett, 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, Spillett D, Muselet D, Prud'Homme JF, Dib C, Auffray C, Morissette J, Weissenbach J, Goodfellow PN). To determine the chromosomal location of a gene using this panel, 93 PCRs are performed using primers designed from the gene of interest on RH DNAs. Each of these DNAs contains random human genomic fragments maintained in a hamster 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 15q22-q23.

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 hybridization techniques to clones arrayed on a grid, such as cDNA microarray hybridization (Schena *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

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

5 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.

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

15 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.

20 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).

25 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.

30 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.

35

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

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

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

5 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. Such small molecules preferably have a molecular weight below 2,000 daltons, more preferably between 300 and 1,000 daltons, and most preferably between 400 and 700 daltons. It is preferred that these small molecules are organic molecules.

15 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 PHPIP-120 activity in the mixture, and comparing the PHPIP-120 activity of the mixture to a control mixture which contains no candidate compound.

35 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).

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

5 Fusion proteins, such as those made from Fc portion and PHPIP-120 polypeptide, as hereinbefore described, can also be used for high-throughput screening assays to identify antagonists for the polypeptide of the present invention (see D. Bennett *et al.*, *J Mol Recognition*, 8:52-58 (1995); and K. Johanson *et al.*, *J Biol Chem*, 270(16):9459-9471 (1995)).

Screening techniques

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

15 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.

20 25 30 35 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.

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

Screening methods may also involve the use of transgenic technology and PHPIP-120 gene. The art of constructing transgenic animals is well established. For example, the PHPIP-120 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, 5 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 10 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 15 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

20 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
- 25 (d) an antibody to a polypeptide of the present invention;

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.

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

Glossary

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

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

Fab or other immunoglobulin expression library.

10 "Isolated" means altered "by the hand of man" from its natural state, *i.e.*, if it occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living organism is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated", as the term is employed herein. Moreover, a
15 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.

20 "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
25 may be single-stranded or, more typically, double-stranded or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, "polynucleotide" refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The term "polynucleotide" also includes DNAs or RNAs containing one or more modified bases and DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons. "Modified" bases include, for example, tritylated bases and
30 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 viruses and cells. "Polynucleotide" also embraces relatively short polynucleotides, often
35 referred to as oligonucleotides.

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

"Polypeptide" refers to any polypeptide comprising two or more amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, i.e., peptide isosteres. "Polypeptide" refers to both short chains, commonly referred to as peptides, oligopeptides or oligomers, and to longer chains, generally referred to as proteins. Polypeptides may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. "Polypeptides" include amino acid sequences modified either by natural processes, such as post-translational processing, or by chemical modification techniques that are well known in the art. Such modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature. Modifications may occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. It will be appreciated that the same type of modification may be present to the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications. Polypeptides may be branched as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched and branched cyclic polypeptides may result from post-translation natural processes or may be made by synthetic methods. Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, biotinylation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cystine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination (see, for instance, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., *Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, 1-12, in *Post-translational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter *et al.*, "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", *Meth Enzymol*, 182, 626-646, 1990, and Rattan *et al.*, "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", *Ann NY Acad Sci*, 663, 48-62, 1992).

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

"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.

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

"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.

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

5 "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.

10 Methods for comparing the identity and similarity of two or more sequences are well known in the art. Thus for instance, programs available in the Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux J et al, Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984, available from Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA), for example the programs BESTFIT and GAP, may be used to determine the % identity between two polynucleotides and the % identity and the % similarity 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.

35 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

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

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

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

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

15 "Identity Index" is a measure of sequence relatedness which may be used to compare a candidate sequence (polynucleotide or polypeptide) and a reference sequence. Thus, for instance, a candidate polynucleotide sequence having, for example, an Identity Index of 0.95 compared to a reference polynucleotide sequence is identical to the reference sequence except that the candidate polynucleotide sequence may include on average up to five differences per each 100 nucleotides of the reference sequence. Such differences are selected from the group consisting of at least one
20 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
25 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.
30

35 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,

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

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.

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

"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-PHP1P-120, employing an immunoglobulin Fc region as a part of a fusion protein is advantageous for performing the functional expression of Fc-PHP1P-120 or fragments of PHP1P-120, to improve pharmacokinetic properties of such a fusion protein when used for therapy and to generate a dimeric PHP1P-120. The Fc-PHP1P-120 DNA construct comprises in 5' to 3' direction, a secretion cassette, i.e. a signal sequence that triggers export from a mammalian cell, DNA encoding an immunoglobulin Fc region fragment, as a fusion partner, and a DNA encoding PHP1P-120 or fragments thereof. In some uses it would be desirable to be able to alter the intrinsic functional properties (complement binding, Fc-Receptor binding) by mutating the functional Fc sides while leaving the rest of the fusion protein untouched or delete the Fc part completely after expression.

All publications and references, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference in their entirety as if each individual publication or reference were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as being fully set forth. Any patent application to which this application claims priority is also incorporated by reference herein in its entirety in the manner described above for publications and references.

Further examples

25 Plasmid Constructs

(All plasmids were verified by sequencing)

Cloning of pDBLeu -- PHP1

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

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

Cloning of pLexA-MCS – PHP1

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

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

Fusionproteins

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

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

The yeast two-hybrid screening method is technically simple and very rapid such that several million of library clones can be screened in just a few days. All of the elements of the system are commercially available. In the screen, the His3 indicator gene will only be activated if the DNA binding domain of Gal4 (AA 1-147) and the Gal4 transactivation domain (AA 788-881) fused to the NLS of the SV40 large T antigen are brought into contact by the receptor Histidine Phosphatase and a protein ligand interaction. Although the ligands isolated from this screen bind to Histidine Phosphatase the binding partners have been confirmed in a second different - LexA-based Yeast-Two Hybrid selection scheme. If both screening procedures are implemented concurrently, ligands obtained may be tested in other systems.

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

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

One positive clone representing a PHPIP-120 – gene product was isolated and sequenced.

Confirmation of the PHPIP-120 ligand interaction using a LexA-based Yeast-Two Hybrid selection scheme:

5 To confirm the interaction in a different selection scheme, the Matchmaker LexA Two-Hybrid system (Clontech) was used due to manufacturers conditions. Vector pLexA-MCS-PHP1 was used as bait. Vector pPC86-PHIP120, which was isolated in the Gal4 based Yeast Two Hybrid system as described above was used as prey.

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

In silico analysis

15 The gene for the PHP1 ligand identified in above mentioned yeast-two-hybrid screen is located on human chromosome 15q22-q23.. The identified gene encodes a protein of 1047 AA length, with no significant sequence homology to other known proteins. While partial sequences of this gene and their corresponding virtual ORF predictions have already been deposited in the databank a protein function as revealed in this study has not been described previously.

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

Claims

1. A Phipip-120 ligand polypeptide selected from the group consisting of:
- (a) a polypeptide encoded by a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO:1;
 - 5 (b) a polypeptide comprising a polypeptide sequence having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
 - (c) a polypeptide having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
 - (d) the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and
 - 10 (e) fragments and variants of such polypeptides in (a) to (d),
- said Phipip-120 ligand of (a) to (d) having the ability to bind specifically to the Phip1 receptor having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:9 or a variant thereof.
- 15 2. The polypeptide of claim 1 comprising the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2.
3. The polypeptide of claim 1 which is the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2.
- 20 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;
 - (b) a polynucleotide having at least 95% identity to the polynucleotide of SEQ ID NO:1;
 - 25 (c) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
 - (d) a polynucleotide having a polynucleotide sequence encoding a polypeptide

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

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

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

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.
- 5
9. A fusion protein consisting of the Immunoglobulin Fc-region and a polypeptide any one one of claims 1-3.
10. An antibody immunospecific for the polypeptide of any one of claims 1 to 3.
- 10
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:
- 15
- (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;
- 20
- (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
- 25
- (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
- 30
- (f) producing said compound according to biotechnological or chemical standard techniques.

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH

5 <120> Protein histidine phosphatase interacting partner

<130> FHRIP120FWKWS

<140>

10 <141>

<150> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 3732

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> CDS

<222> (184)..(3327)

25

<400> 1
ccgggcttgg tgctcaactgc gacttcccgcc gcaggccccc gtcggactag gacccggccc 60

ctgagagacg ctggaggatg cggaccggga ggcggccctgg ggtagcggcg gggggagtcg 120

30

tgccgctctg caggtcagaa gttgagtgc agggccctag gaggcctcga agccttcaca 180

gag atg gca gag aag cga ccc ctg aga acc ctg ggg cct gtg atg tat 228
Met Ala Glu Lys Arg Pro Leu Arg Thr Leu Gly Pro Val Met Tyr
1 5 10 15

35

ggc aag ctg ccc cgc tta gag aca gac tcc ggg ctc gag cac agc ctg 276
Gly Lys Leu Pro Arg Leu Glu Thr Asp Ser Gly Leu Glu His Ser Leu
20 25 30

40

ccc cac tct gtt ggt aac cag gat ccc tgc acc tac aag ggg tcc tac 324
Pro His Ser Val Gly Asn Gln Asp Pro Cys Thr Tyr Lys Gly Ser Tyr
35 40 45

45

ttc tcc tgc ccc atg gca ggt act cct aag gcc gag tct gag cag ttg 372
Phe Ser Cys Pro Met Ala Gly Thr Pro Lys Ala Glu Ser Glu Gln Leu
50 55 60

50

gag tcc tgg acc cca tac cca ccc ttg tac tct acc ggt atg gca gga 420
Ala Ser Trp Thr Pro Tyr Pro Pro Leu Tyr Ser Thr Gly Met Ala Gly
65 70 75

55

ccc cca ctt cag gca gac aac ctg ctg acc aac tgc ctg ttc tac cgc 468
Pro Pro Leu Gln Ala Asp Asn Leu Leu Thr Asn Cys Leu Phe Tyr Arg
80 85 90 95

60

tcg cca gca gaa ggc cct gag aag atg cag gac tcc agc cct gtt gag 516
Ser Pro Ala Glu Gly Pro Glu Lys Met Gln Asp Ser Ser Pro Val Glu
100 105 110

65

ctc ctg ccc ttc agt ccc cag gct cac tcc tac cca ggc cca cca ctg 564
Leu Leu Pro Phe Ser Pro Gln Ala His Ser Tyr Pro Gly Pro Pro Leu
115 120 125

gca gca ccc aaa cct gtc tac cgc aac cct ctg tgc tat ggg ctc tca 612

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

Ala Ala Pro Lys Pro Val Tyr Arg Asn Pro Leu Cys Tyr Gly Leu Ser
130 135 140

5 act tgt ctg ggg gaa gga gca gtg aaq agg cca ctg gat gtt gac tgg 660
Thr Cys Leu Gly Glu Gly Ala Val Lys Arg Pro Leu Asp Val Asp Trp
145 150 155

act ctg ggg act ggg ccc ctg ttg ccc tca gct gac cca ccc tgc tct 708
10 Thr Leu Ala Thr Gly Pro Leu Leu Pro Ser Ala Asp Pro Pro Cys Ser
160 165 170 175

ctg gcc cca gct cct agc aag ggc cag act ctg gat ggc acc ttc ttg 756
15 Thr Ala Pro Ala Pro Ser Lys Gly Gln Thr Leu Asp Gly Thr Phe Leu
180 185 190

cgg ggg gtg cca gct gag ggg tcc agt aaa gac tcc tca ggg agc ttc 804
Arg Gly Val Pro Ala Glu Gly Ser Ser Lys Asp Ser Ser Gly Ser Phe
195 200 205

20 tcc cca tgc caq ccc ttc ctg gag aaa tat caq acc atc cac agc aag 852
Ser Pro Cys Gln Pro Phe Leu Lys Tyr Gln Thr Ile His Ser Thr
210 215 220

ggc ttc ctg gcc tcc agc tac aca ggt cct tac cct agg aac tcc aag 900
25 Gly Phe Leu Ala Ser Arg Tyr Thr Gly Pro Tyr Pro Arg Asn Ser Lys
225 230 235

caa gca atg tct gag ggg ccc tca agt cct tgg acc cag ctg gcc cag 948
30 Gln Ala Met Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Trp Thr Gln Leu Ala Gln
240 245 250 255

ccc ctg ggg cca ccc tgt cag gac acc ggg ccc acc cac tac cca cca 996
Pro Leu Gly Pro Pro Cys Gln Asp Thr Gly Pro Thr His Tyr Pro Pro
260 265 270

35 ccc cac cac cca cca ccc cac cct cca cag gcc ctg cct tgc cct cca 1044
Pro His His Pro Pro Pro His Pro Pro Gln Ala Leu Pro Cys Pro Pro
275 280 285

40 gcc tgt cgc cac cca gag aag cag ggc agc tac agc cca gca ctc cca 1092
Ala Cys Arg His Pro Glu Lys Gln Gly Ser Tyr Ser Pro Ala Leu Pro
290 295 300

ctg cag cct ctg ggg ggc cac aag ggg acc ggg tac cag gct ggt ggg 1140
45 Leu Gln Pro Leu Gly Gly His Lys Gly Thr Gly Tyr Gln Ala Gly Gly
305 310 315

ctg ggc agc ccc tac ctg agg cag cag gca gcc cag gca cct tac att 1188
50 Leu Gly Ser Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Ala Ala Gln Ala Pro Tyr Ile
320 325 330 335

ccc cca ctg ggg ctg gac gct tac ccc tac ccc tct gcc cct ctc cca 1236
Pro Pro Leu Gly Leu Asp Ala Tyr Pro Tyr Pro Ser Ala Pro Leu Pro
340 345 350

55 gca ccc tct cca ggc ctc aag ctg gag ccg cct ctc act cca cgg tgc 1284
Ala Pro Ser Pro Gly Leu Lys Leu Glu Pro Pro Leu Thr Pro Arg Cys
355 360 365

60 cca ttg gac ttt gcc ccc cag aca ctg agt ttt cct tat gcc cgg gat 1332
Pro Leu Asp Phe Ala Pro Gln Thr Leu Ser Phe Pro Tyr Ala Arg Asp
370 375 380

gac ctc tct ctc tat gga gca tcc cct ggg ctt gga ggg aca cca cct 1380

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

	Asp Leu Ser Leu Tyr Gly Ala Ser Pro Gly Leu Gly Gly Thr Pro Pro	
	385	390 395
5	tcc cag aac aat gtg cgg gct gtg cca cag cct ggt gcc ttc cag agg Ser Gln Asn Asn Val Arg Ala Val Pro Gln Pro Gly Ala Phe Gln Arg	1428 400 405 410 415
10	gca tgc cag cct ttg cca gcg agc cag ccc tgc tca gag cct gtg agg Ala Cys Gln Pro Leu Pro Ala Ser Gln Pro Cys Ser Glu Pro Val Arg	1476 420 425 430
15	cct gca cag gaa gcc gaa gag aag acc tgg ctg ccc agc tgc agg aaa Pro Ala Gln Glu Ala Glu Glu Lys Thr Trp Leu Pro Ser Cys Arg Lys	1524 435 440 445
20	gag aag ctc cag ccc cgg ctc agt gag cac tct ggg ccg ccc atc gtc Glu Lys Leu Gln Pro Arg Leu Ser Glu His Ser Gly Pro Pro Ile Val	1572 450 455 460
25	atc cga gac agt cca gtt ccc tgt acc ccc cca gca ctg ccc ccc tgt Ile Arg Asp Ser Pro Val Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Pro Pro Cys	1620 465 470 475
30	gcc cgg gag tgc cag tct ctt cca cag aag gag ggc gca agg cca ccc Ala Arg Glu Cys Gln Ser Leu Pro Gln Lys Glu Gly Ala Arg Pro Pro	1668 480 485 490 495
35	agc tct cca cca atg cct gtc att gac aat gtc ttc agc ctg gcc ccc Ser Ser Pro Pro Met Pro Val Ile Asp Asn Val Phe Ser Leu Ala Pro	1716 500 505 510
40	tac cgt gac tat ctg gat gtg ccg gca ccc gag gcc aca act gag cct Tyr Arg Asp Tyr Leu Asp Val Pro Ala Pro Glu Ala Thr Thr Glu Pro	1764 515 520 525
45	gac tct gcc aca gct gag cct gac tca gcc cca gcc acc agt gaa ggt Asp Ser Ala Thr Ala Glu Pro Asp Ser Ala Pro Ala Thr Ser Glu Gly	1812 530 535 540
50	cag gac aaa ggc tgc agg ggg acc ctg cct gcc cag gag ggc ccc tca Gln Asp Lys Gly Cys Arg Gly Thr Leu Pro Ala Gln Glu Gly Pro Ser	1860 545 550 555
55	ggg agt aaa ccc cta agg ggc tca ctt aag gag gag gta gcc ctg gat Gly Ser Lys Pro Leu Arg Gly Ser Leu Lys Glu Glu Val Ala Leu Asp	1908 560 565 570 575
60	ttg agt gtg agg aag ccc aca gca gag gcc tcc cct gtc aag gct tcc Leu Ser Val Arg Lys Pro Thr Ala Glu Ala Ser Pro Val Lys Ala Ser	1956 580 585 590
65	cgt tct gtg gag cat gcc aag cct act gca gcc atg gat gtg cca gat Arg Ser Val Glu His Ala Lys Pro Thr Ala Ala Met Asp Val Pro Asp	2004 595 600 605
70	gtg ggc aac atg gtg tca gat ctg cca ggc ctg aaa aag ata gac aca Val Gly Asn Met Val Ser Asp Leu Pro Gly Leu Lys Lys Ile Asp Thr	2052 610 615 620
75	gaa gca cca ggc ttg cct ggg gtg cca gtg acc aca gat gcc atg cca Glu Ala Pro Gly Leu Pro Gly Val Pro Val Thr Thr Asp Ala Met Pro	2100 625 630 635
80	agg acc aac ttc cac agc tct gtg gcc ttc atg ttc cga aag ttc aag	2148

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

	Arg Thr Asn Phe His Ser Ser Val Ala Phe Met Phe Arg Lys Phe Lys	
	640	645 650 655
5	atc ctc cgt ccg gca cct ttg cct gca gcc gtg gtc ccg tcc acg ccc Ile Leu Arg Pro Ala Pro Leu Pro Ala Ala Val Val Pro Ser Thr Pro	2196
	660 665 670	
10	acc tca gct cct gct ccc aca cag cct gca ccc acc ccc aca tct ggg Thr Ser Ala Pro Ala Pro Thr Gln Pro Ala Pro Thr Pro Thr Ser Gly	2244
	675 680 685	
15	ccc att gga ctg cgg att ctc gct caa cag ccc ttg tct gtg acc tgc Pro Ile Gly Leu Arg Ile Leu Ala Gln Gln Pro Leu Ser Val Thr Cys	2292
	690 695 700	
20	ttc agc ctg gca ctg ccc agc cct cca gcc gta gct gtg gcc tcc cct Phe Ser Leu Ala Leu Pro Ser Pro Pro Ala Val Ala Val Ala Ser Pro	2340
	705 710 715	
25	gcc cct gct cca gct cca tcc cct gct ccg gct cga gct cag gct cca Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Ala Pro	2388
	720 725 730 735	
30	gct tca gcc cgg gat cca gct cca gct cca gtt gca ggc cct Ala Ser Ala Arg Asp Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Val Ala Gly Pro	2436
	740 745 750	
35	gct cca gca tct act tca gcc cca ggg gac tcc ctg gag cag cat ttt Ala Pro Ala Ser Thr Ser Ala Pro Gly Asp Ser Leu Glu Gln His Phe	2484
	755 760 765	
40	aca gga cta cat gcg tcc ctg tgt gat gct att tct ggc tcc gtc gcc Thr Gly Leu His Ala Ser Leu Cys Asp Ala Ile Ser Gly Ser Val Ala	2532
	770 775 780	
45	cac tct cct cca gag aag att cgc gag tgg cta gag acg gct ggg ccc His Ser Pro Pro Glu Lys Leu Arg Glu Trp Leu Glu Thr Ala Gly Pro	2580
	785 790 795	
50	tgg ggc cag gct ccg tgg cag gac tgc cag ggt gtg cag ggg ctg ctg Trp Gly Gln Ala Ala Trp Gln Asp Cys Gln Gly Val Gln Gly Leu Leu	2628
	800 805 810 815	
55	gcc aag ctg ctg tct cag ctg cag cgc ttc gat cgc acc cac cgg tgc Ala Lys Leu Leu Ser Gln Leu Gln Arg Phe Asp Arg Thr His Arg Cys	2676
	820 825 830	
60	ccc ttc ccc cct ctg gtg cga gct ggc gcc atc ttc gtg ccc att cac Pro Phe Pro His Val Val Arg Ala Gly Ala Ile Phe Val Pro Ile His	2724
	835 840 845	
65	ctg gtg aag gag cgg ctc ttc cct cgg ctg cca ccc gct tct gtg gac Leu Val Lys Glu Arg Leu Phe Pro Arg Leu Pro Pro Ala Ser Val Asp	2772
	850 855 860	
70	cat gtg ctg cag gag cat cgt gtg gag ctg cgg ccc acc acg ctg tgg His Val Leu Gln Glu His Arg Val Glu Leu Arg Pro Thr Thr Leu Ser	2820
	865 870 875	
75	gag gag cgg gca ctg cgg gag ctc gcc ctg cca gcc tgc acc tea cgc Glu Glu Arg Ala Leu Arg Glu Leu Ala Leu Pro Gly Cys Thr Ser Arg	2868
	880 885 890 895	
80	atg ctg aag tta ctg gcg ctg cgc cag ctg ccg gac att tac ccc gac	2916

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

Met Leu Lys Leu Leu Ala Leu Arg Gln Leu Pro Asp Ile Tyr Pro Asp
900 905 910

5 ctt ctc ggc ctg cag tgg cgc gac tgt gta cgc cgc cag ctg ggt gac 2964
Leu Leu Gly Leu Gln Trp Arg Asp Cys Val Arg Arg Gln Leu Gly Asp
915 920 925

10 ttt gac act gag gct gga gct gtg tcc tcc tca gag ccc act gtg gcc 3012
Phe Asp Thr Glu Ala Gly Ala Val Ser Ser Ser Glu Pro Thr Val Ala
930 935 940

15 aga ggt gag cca gag agc cta gcc ctg gct cag aag tca ccg gcc ccc 3060
Arg Gly Glu Pro Glu Ser Leu Ala Leu Ala Gln Lys Ser Pro Ala Pro
945 950 955

aag gtc agg aag cca ggc agg aag cca cca acc cct ggc ccg gag aaa 3108
Lys Val Arg Lys Pro Gly Arg Lys Pro Pro Thr Pro Gly Pro Glu Lys
960 965 970 975

20 gca gag gca gct gct ggg gaa gag tcc tgt ggt gcc tcc cct acc cct 3156
Ala Glu Ala Ala Gly Glu Glu Ser Cys Gly Ala Ser Pro Thr Pro
980 985 990

25 gct acc agt gcc agc cca cct ggc ccc aca ctg aag gcc cgc ttc cgc 3204
Ala Thr Ser Ala Ser Pro Pro Gly Pro Thr Leu Lys Ala Arg Phe Arg
995 1000 1005

30 agt ctg ctg gag acc gcc tgg ctc aat ggc ctg gct ctg ccc acc tgg 3252
Ser Leu Leu Glu Thr Ala Trp Leu Asn Gly Leu Ala Leu Pro Thr Trp
1010 1015 1020

35 ggc cac aag tcc tca aga cca gac cag ccc tca ccc tgc cca cag ctg 3300
Gly His Lys Ser Ser Arg Pro Asp Gln Pro Ser Pro Cys Pro Gln Leu
1025 1030 1035

ctg gac agc cag agc cat cac ctg tag cactggttgc cagtctgtg 3347
Leu Asp Ser Gln Ser His His Leu
1040 1045

40 tgtatagcag tcaactcaca caattccctt ctgctgccc agctgcccgg gggccaagag 3407
tggatgctgg ggctgtggct gctccctgg aggggttcca tctctgacc tgtggcccat 3467

45 tcagggtggg ctgaagagcc cctgagcttt taactgtagg gtctttattg gataggacta 3527
ctccctattt ctgctctaga gaacacact gggctttgga gcccgacaga cctgggcttg 3587
aatcccgget cgtgttcttg ctgcaggacc tggccaagaa acttcacctc tctgagccc 3647

50 tcaatcccca tgtgtaaaat gggacaacgc aacctacctc acagggttgt tgtggggatg 3707
ctgctgata cataccctgt cacca 3732

55 <210> 2
<211> 1047
<212> PRT
<213> Homo sapiens

60 <400> 2
Met Ala Glu Lys Arg Pro Leu Arg Thr Leu Gly Pro Val Met Tyr Gly
1 5 10 15
Lys Leu Pro Arg Leu Glu Thr Asp Ser Gly Leu Glu His Ser Leu Pro
20 25 30

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

His Ser Val Gly Asn Gln Asp Pro Cys Thr Tyr Lys Gly Ser Tyr Phe
 35 40 45
 Ser Cys Pro Met Ala Gly Thr Pro Lys Ala Glu Ser Glu Gln Leu Ala
 50 55 60
 5 Ser Trp Thr Pro Tyr Pro Pro Leu Tyr Ser Thr Gly Met Ala Gly Pro
 65 70 75 80
 Pro Leu Gln Ala Asp Asn Leu Leu Thr Asn Cys Leu Phe Tyr Arg Ser
 85 90 95
 10 Pro Ala Glu Gly Pro Glu Lys Met Gln Asp Ser Ser Pro Val Glu Leu
 100 105 110
 Leu Pro Phe Ser Pro Gln Ala His Ser Tyr Pro Gly Pro Pro Leu Ala
 115 120 125
 Ala Pro Lys Pro Val Tyr Arg Asn Pro Leu Cys Tyr Gly Leu Ser Thr
 130 135 140
 15 Cys Leu Gly Glu Gly Ala Val Lys Arg Pro Leu Asp Val Asp Trp Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Thr Gly Pro Leu Leu Pro Ser Ala Asp Pro Pro Cys Ser Leu
 165 170 175
 20 Ala Pro Ala Pro Ser Lys Gly Gln Thr Leu Asp Gly Thr Phe Leu Arg
 180 185 190
 Gly Val Pro Ala Glu Gly Ser Ser Lys Asp Ser Ser Gly Ser Phe Ser
 195 200 205
 Pro Cys Gln Pro Phe Leu Glu Lys Tyr Gln Thr Ile His Ser Thr Gly
 210 215 220
 25 Phe Leu Ala Ser Arg Tyr Thr Gly Pro Tyr Pro Arg Asn Ser Lys Gln
 225 230 235 240
 Ala Met Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Trp Thr Gln Leu Ala Gln Pro
 245 250 255
 30 Leu Gly Pro Pro Cys Gln Asp Thr Gly Pro Thr His Tyr Pro Pro Pro
 260 265 270
 His His Pro Pro His Pro Pro Gln Ala Leu Pro Cys Pro Pro Ala
 275 280 285
 Cys Arg His Pro Glu Lys Gln Gly Ser Tyr Ser Pro Ala Leu Pro Leu
 290 295 300
 35 Gln Pro Leu Gly Gly His Lys Gly Thr Gly Tyr Gln Ala Gly Gly Leu
 305 310 315 320
 Gly Ser Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Ala Ala Gln Ala Pro Tyr Ile Pro
 325 330 335
 40 Pro Leu Gly Leu Asp Ala Tyr Pro Tyr Pro Ser Ala Pro Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ser Pro Gly Leu Lys Leu Glu Pro Pro Leu Thr Pro Arg Cys Pro
 355 360 365
 Leu Asp Phe Ala Pro Gln Thr Leu Ser Phe Pro Tyr Ala Arg Asp Asp
 370 375 380
 45 Leu Ser Leu Tyr Gly Ala Ser Pro Gly Leu Gly Gly Thr Pro Pro Ser
 385 390 395 400
 Gln Asn Asn Val Arg Ala Val Pro Gln Pro Gly Ala Phe Gln Arg Ala
 405 410 415
 50 Cys Gln Pro Leu Pro Ala Ser Gln Pro Cys Ser Glu Pro Val Arg Pro
 420 425 430
 Ala Gln Glu Ala Glu Glu Lys Thr Trp Leu Pro Ser Cys Arg Lys Glu
 435 440 445
 Lys Leu Gln Pro Arg Leu Ser Glu His Ser Gly Pro Pro Ile Val Ile
 450 455 460
 55 Arg Asp Ser Pro Val Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Pro Pro Cys Ala
 465 470 475 480
 Arg Glu Cys Gln Ser Leu Pro Gln Lys Glu Gly Ala Arg Pro Pro Ser
 485 490 495
 60 Ser Pro Pro Met Pro Val Ile Asp Asn Val Phe Ser Leu Ala Pro Tyr
 500 505 510
 Arg Asp Tyr Leu Asp Val Pro Ala Pro Glu Ala Thr Thr Glu Pro Asp
 515 520 525
 Ser Ala Thr Ala Glu Pro Asp Ser Ala Pro Ala Thr Ser Glu Gly Gln
 530 535 540

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

Asp Lys Gly Cys Arg Gly Thr Leu Pro Ala Gln Glu Gly Pro Ser Gly
 545 550 555 560
 Ser Lys Pro Leu Arg Gly Ser Leu Lys Glu Glu Val Ala Leu Asp Leu
 565 570 575
 5 Ser Val Arg Lys Pro Thr Ala Glu Ala Ser Pro Val Lys Ala Ser Arg
 580 585 590
 Ser Val Glu His Ala Lys Pro Thr Ala Ala Met Asp Val Pro Asp Val
 595 600 605
 10 Gly Asn Met Val Ser Asp Leu Pro Gly Leu Lys Lys Ile Asp Thr Glu
 610 615 620
 Ala Pro Gly Leu Pro Gly Val Pro Val Thr Thr Asp Ala Met Pro Arg
 625 630 635 640
 Thr Asn Phe His Ser Ser Val Ala Phe Met Phe Arg Lys Phe Lys Ile
 645 650 655
 15 Leu Arg Pro Ala Pro Leu Pro Ala Ala Val Val Pro Ser Thr Pro Thr
 660 665 670
 Ser Ala Pro Ala Pro Thr Gln Pro Ala Pro Thr Pro Thr Ser Gly Pro
 675 680 685
 20 Ile Gly Leu Arg Ile Leu Ala Gln Gln Pro Leu Ser Val Thr Cys Phe
 690 695 700
 Ser Leu Ala Leu Pro Ser Pro Pro Ala Val Ala Val Ala Ser Pro Ala
 705 710 715 720
 Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Ala Pro Ala
 725 730 735
 25 Ser Ala Arg Asp Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Val Ala Gly Pro Ala
 740 745 750
 Pro Ala Ser Thr Ser Ala Pro Gly Asp Ser Leu Glu Gln His Phe Thr
 755 760 765
 30 Gly Leu His Ala Ser Leu Cys Asp Ala Ile Ser Gly Ser Val Ala His
 770 775 780
 Ser Pro Pro Glu Lys Leu Arg Glu Trp Leu Glu Thr Ala Gly Pro Trp
 785 790 795 800
 Gly Gln Ala Ala Trp Gln Asp Cys Gln Gly Val Gln Gly Leu Leu Ala
 805 810 815
 35 Lys Leu Leu Ser Gln Leu Gln Arg Phe Asp Arg Thr His Arg Cys Pro
 820 825 830
 Phe Pro His Val Val Arg Ala Gly Ala Ile Phe Val Pro Ile His Leu
 835 840 845
 40 Val Lys Glu Arg Leu Phe Pro Arg Leu Pro Pro Ala Ser Val Asp His
 850 855 860
 Val Leu Gln Glu His Arg Val Glu Leu Arg Pro Thr Thr Leu Ser Glu
 865 870 875 880
 Glu Arg Ala Leu Arg Glu Leu Ala Leu Pro Gly Cys Thr Ser Arg Met
 885 890 895
 45 Leu Lys Leu Leu Ala Leu Arg Gln Leu Pro Asp Ile Tyr Pro Asp Leu
 900 905 910
 Leu Gly Leu Gln Trp Arg Asp Cys Val Arg Arg Gln Leu Gly Asp Phe
 915 920 925
 50 Asp Thr Glu Ala Gly Ala Val Ser Ser Ser Glu Pro Thr Val Ala Arg
 930 935 940
 Gly Glu Pro Glu Ser Leu Ala Leu Ala Gln Lys Ser Pro Ala Pro Lys
 945 950 955 960
 Val Arg Lys Pro Gly Arg Lys Pro Pro Thr Pro Gly Pro Glu Lys Ala
 965 970 975
 55 Glu Ala Ala Ala Gly Glu Glu Ser Cys Gly Ala Ser Pro Thr Pro Ala
 980 985 990
 Thr Ser Ala Ser Pro Pro Gly Pro Thr Leu Lys Ala Arg Phe Arg Ser
 995 1000 1005
 60 Leu Leu Glu Thr Ala Trp Leu Asn Gly Leu Ala Leu Pro Thr Trp Gly
 1010 1015 1020
 His Lys Ser Ser Arg Pro Asp Gln Pro Ser Pro Cys Pro Gln Leu Leu
 1025 1030 1035 1040
 Asp Ser Gln Ser His His Leu
 1045

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

5 <210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 10 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 1

<400> 3
 ttttctcagc catggcggtg gggacctcg 30

15 <210> 4
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 20 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2

<400> 4
 25 ttttgcggcc gtcagtagc cgtcgttagc c 31

<210> 5
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 35 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 3

<400> 5
 aattccaggt cgacctogag gggccgct 29

40 <210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 45 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 4

<400> 6
 50 tcgaaccggc cgctcagag tcgacctgg 29

<210> 7
 <211> 276
 <212> PRT
 55 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Fusionprotein:
 Gal-4 PHPL

60 <400> 7
 Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
 1 5 10 15

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

Lys Lys Leu Lys Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
 20 25 30
 5 Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro
 35 40 45
 Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu
 50 55 60
 10 Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile
 65 70 75 80
 Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu
 85 90 95
 15 Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala
 100 105 110
 Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser
 115 120 125
 20 Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu
 130 135 140
 25 Thr Val Ser Ser Arg Ser Thr Met Ala Val Ala Asp Leu Ala Leu Ile
 145 150 155 160
 Pro Asp Val Asp Ile Asp Ser Asp Gly Val Phe Lys Tyr Val Leu Ile
 165 170 175
 30 Arg Val His Ser Ala Pro Arg Ser Gly Ala Pro Ala Ala Glu Ser Lys
 180 185 190
 35 Glu Ile Val Arg Gly Tyr Lys Trp Ala Glu Tyr His Ala Asp Ile Tyr
 195 200 205
 Asp Lys Val Ser Gly Asp Met Gln Lys Gln Gly Cys Asp Cys Glu Cys
 210 215 220
 40 Leu Gly Gly Gly Arg Ile Ser His Gln Ser Gln Asp Lys Lys Ile His
 225 230 235 240
 Val Tyr Gly Tyr Ser Met Ala Tyr Gly Pro Ala Gln His Ala Ile Ser
 245 250 255
 45 Thr Glu Lys Ile Lys Ala Lys Tyr Pro Asp Tyr Glu Val Thr Trp Ala
 260 265 270
 50 Asn Asp Gly Tyr
 275
 <210> 8
 <211> 332
 55 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 60 <223> Description of Artificial Sequence: Fusionprotein
 LexA-PHP1
 <400> 8
 Met Lys Ala Leu Thr Ala Arg Gln Gln Glu Val Phe Asp Leu Ile Arg
 1 5 10 15

WO 02/066507

PCT/EP02/00753

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

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/066507 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47, C12N 15/12, 1/21, C07K 16/46, 16/18, G01N 33/68
- (21) International Application Number: PCT/EP02/00753
- (22) International Filing Date: 25 January 2002 (25.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01103779.3 16 February 2001 (16.02.2001) 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): HOCK, Björn [DE/DE]; Nordstrasse 2a, 63477 Maintal (DE); DÜCKER, Klaus [DE/DE]; Eulsterstrasse 5, 64291 Darmstadt (DE); KELLNER, Roland [DE/DE]; Am Katzenpfad 10, 64646 Heppenheim (DE).
- (74) Common Representative: MERCK PATENT GMBH; Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 24 April 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/066507 A3

(54) Title: HISTIDINE PHOSPHATASE INTERACTING PROTEIN OF 120 KD

(57) Abstract: PHPIP-120 histidine phosphatase interacting protein of 120KD polypeptides and polynucleotides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques are disclosed. Also disclosed are methods for utilizing PHPIP-120 polypeptides and polynucleotides in diagnostic assays.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/00753
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C12N15/12 C12N1/21 C07K16/46 C07K16/18 G01N33/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EPO-Internal, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE SWALL 'Online! 1 October 2000 (2000-10-01) PLUVINET ET AL.: retrieved from EB Database accession no. Q9NPN3 XP002224682 abstract -& DATABASE EMBL 'Online! 1 July 2000 (2000-07-01) PLUVINET ET AL.: retrieved from EB Database accession no. AL360143 XP002224683 abstract --- -/--	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 citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
12 December 2002	07/01/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2000, TX: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Lanzrein, M	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 02/00753

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE SWALL 'Online! 1 October 2000 (2000-10-01) ANSORGE W. ET AL.: retrieved from EBI Database accession no. Q9NTU5 XP002224684 abstract --- -& DATABASE EMBL 'Online! 15 September 1999 (1999-09-15) ANSORGE W. ET AL.: retrieved from EBI Database accession no. AL117540 XP002224685 abstract	1,4,6-11
X	DATABASE EMBL 'Online! BIRREN B. ET AL.: retrieved from EBI Database accession no. AC024552 XP002224686 abstract	4
A	WO 00 52175 A (MERCK PATENT GMBH ;KELLNER ROLAND (DE); KLUMPP SUSANNE (DE)) 8 September 2000 (2000-09-08) SEQ ID NOS 1, 2	1-11
A	LUBAN J ET AL: "THE YEAST TWO-HYBRID SYSTEM FOR STUDYING PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 6, no. 1, 1995, pages 59-64, XP000571534 ISSN: 0958-1669 page 61, right-hand column, paragraph 4 -page 62, left-hand column, paragraph 4 -----	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 02/00753	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	Publication date	Publication date
WO 0052175	A	08-09-2000	AU 3808000 A	21-09-2000	
			BR 0008607 A	02-01-2002	
			CN 1342205 T	27-03-2002	
			CZ 20013172 A3	12-12-2001	
			WO 0052175 A1	08-09-2000	
			EP 1159430 A1	05-12-2001	
			HU 0200241 A2	29-05-2002	
			JP 2002537814 A	12-11-2002	
			NO 20014261 A	03-09-2001	
			SK 12242001 A3	04-06-2002	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
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	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	G 0 1 N 33/53	M
	C 1 2 N 5/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,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,PH,PL,P T,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 ホック、 ビェールン

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

(72)発明者 デュッカー、 クラウス

ドイツ連邦共和国 6 4 2 9 1 ダルムシュタット エッテシューターシュトラッセ 5

(72)発明者 ケルナー、 ローラント

ドイツ連邦共和国 6 4 6 4 6 ヘッペンハイム アム カッツェンプファート 1 0

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 DA14 DA36 FB02 FB03

4B024 AA11 BA11 BA44 CA03 CA04 CA12 GA11 HA12 HA15

4B050 CC01 CC03 DD11 LL03

4B063 QA18 QA19 QQ33 QQ42 QQ53 QR59 QR69 QR80 QS24 QS28

QS34 QS36 QX01

4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA31 CA46

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 DA86 DA89

EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	组氨酸·磷酸酶相互作用蛋白在120 kD		
公开(公告)号	JP2004528023A	公开(公告)日	2004-09-16
申请号	JP2002566220	申请日	2002-01-25
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	ホックビエールン デュッカークラウド ケルナーローラント		
发明人	ホック、ビエールン デュッカー、クラウド ケルナー、ローラント		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/40 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/16 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/47 C07K2319/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/40 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/16.B C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/BA11 4B024/BA44 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL03 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ33 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR59 4B063/QR69 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA31 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	宫崎昭雄 伊藤 克博		
优先权	2001103779 2001-02-16 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了PHPIP-120的多肽和多核苷酸以及通过重组技术产生这种多肽的方法。还公开了在诊断测定中使用PHPIP-120多肽和多核苷酸的方法。