

(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2004-500829

(P2004-500829A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup> <b>C 1 2 N 15/09</b> <b>A 6 1 P 9/00</b> <b>A 6 1 P 9/10</b> <b>A 6 1 P 31/04</b> <b>A 6 1 P 35/00</b>	F I C 1 2 N 15/00 A 6 1 P 9/00 A 6 1 P 9/10 A 6 1 P 31/04 A 6 1 P 35/00 審査請求 未請求 予備審査請求 有	テーマコード (参考) 2 G O 4 5 4 B O 2 4 4 B O 6 3 4 B O 6 4 4 B O 6 5 (全 66 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2001-576864 (P2001-576864) (86) (22) 出願日 平成13年4月11日 (2001. 4. 11) (85) 翻訳文提出日 平成14年10月18日 (2002. 10. 18) (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/004170 (87) 国際公開番号 W02001/079269 (87) 国際公開日 平成13年10月25日 (2001. 10. 25) (31) 優先権主張番号 00107995.3 (32) 優先日 平成12年4月18日 (2000. 4. 18) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP) (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) , CA, JP, US	(71) 出願人 591032596 メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ ト ベシュレンクテル ハフトング Merck Patent Gesell schaft mit beschrae nkte r Haftung ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ ルムシュタット フランクフルター シュ トラーセ 250 Frankfurter Str. 25 O, D-64293 Darmstadt , Federal Republic o f Germany (74) 代理人 100088328 弁理士 金田 暢之	
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 新規な脂質結合タンパク質 4

## (57) 【要約】

新規な脂質結合タンパク質 4 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、新規な脂質結合タンパク質 4 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 または配列番号：3 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 または配列番号：4 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 または配列番号：4 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 または配列番号：4 のポリペプチド配列、および
- (e) (a) ~ (d) に記載のかかるポリペプチドのフラグメントおよび変異体  
からなる群から選択されるポリペプチド。

10

## 【請求項 2】

配列番号：2 または配列番号：4 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 または配列番号：4 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 または配列番号：3 のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも 95 % の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号：1 または配列番号：3 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 または配列番号：4 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 または配列番号：4 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 または配列番号：3 の配列または少なくとも 15 塩基長を有するそのフラグメントを有する、標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件下でライブラリーをスクリーニングすることによって得られる、少なくとも 100 塩基長の塩基配列を有するポリヌクレオチド；
- (f) (a) ~ (e) のポリヌクレオチドの RNA 等価体であるポリヌクレオチド；  
あるいは、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

20

30

上記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、あるいは上記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  
からなる群の一つより選択されるポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

- (a) 配列番号：1 または配列番号：3 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 または配列番号：3 の単離されたポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号：2 または配列番号：4 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 または配列番号：4 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。

40

## 【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 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】

50

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

【請求項 8】

請求項 1 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 に記載されるいずれか 1 つの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 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 m R N A 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、E L I S A 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】

【0001】

( 発明の分野 )

本発明は、以降、時に、「新規な脂質結合タンパク質 4 ( N L I B P 4 ) 」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、かかるポリペプチドおよびポリヌクレオチドの製造に関する。

【0002】

( 発明の背景 )

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

【0003】

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

#### 【0004】

##### (発明の概要)

本発明は、新規な脂質結合タンパク質 4、特に、新規な脂質結合タンパク質 4 ポリペプチドおよび新規な脂質結合タンパク質 4 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、ガン、菌血症、内毒素血症、髄膜炎球菌血症、出血性外傷、部分的肝切除、重篤な腹膜感染症、嚢胞性線維症、冠状動脈性心疾患、アテローム性動脈硬化症を含む、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、新規な脂質結合タンパク質 4 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、不適当な新規な脂質結合タンパク質 4 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。

10

#### 【0005】

##### (発明の説明)

第1の形態において、本発明は新規な脂質結合タンパク質 4 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ポリペプチド；

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

(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%の同一性を有するポリペプチド；

30

(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、または含んでなるポリペプチド；

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

#### 【0006】

本発明のポリペプチドは、リポ多糖結合タンパク質(LBP)または殺菌的/透過性増大タンパク質(BPI)などの、脂質結合タンパク質の一員であると考えられる。従って、脂質結合タンパク質は、グラム陰性細菌の外膜に見出される糖脂質である、リポ多糖(LPS)に結合する高い親和性を示すため、それらは注目されている。従って、脂質結合タンパク質は、細菌感染に対する宿主防御において、決定的な役割を果たしている。

40

#### 【0007】

さらに、脂質結合タンパク質のタンパク質ファミリーの既知メンバーの全ては、リン脂質と結合することができる。LBP、コレステリルエステル輸送タンパク質(CEPT)およびリン脂質輸送タンパク質(PLTP)は、またコレステロールおよび高密度リポタンパク質(HDL)と結合することもできる。HDLの血漿中濃度は、冠状動脈性心疾患およびアテローム性動脈硬化症と負に相関している。CEPTおよびPLTPなどの、脂質結合ならびに輸送タンパク質は、トリグリセリドの多いリポタンパク質(TRL)からHDLへのリン脂質およびコレステロールの転移を促進する。従って、該脂質結合タンパク

50

質のファミリーのメンバーは、これらの疾患の防止において、何らかの役割を果たしていると考えられる。

#### 【0008】

さらに、LBPは、それにより、抗菌性および前炎症性活性を導く、広い範囲の細胞ならびに組織応答を促進する、LPSモノマーのCD14への輸送を触媒している、肝臓によって分泌される急性期の血清タンパク質である。BPIは、多形核白血球(PMN)によって産生される456残基のカチオン性タンパク質であり、該細胞の一次顆粒内に貯蔵されている。単離されたBPIの生物学的作用は、LPSとの複合体形成に関連している。LPSを介した、BPIの生きた細菌への結合は、直ちに増殖の中断を引き起こす。細胞結合型または細胞から遊離したLPSとのBPIの複合体形成は、LPSにより誘導されるすべての宿主細胞応答を阻害する。BPI阻止性抗体は、BPI感受性細菌に対する、PMN全溶解物および炎症性体液の強力な活性を無効にする。BPIの抗菌的および抗エンドトキシン活性は、該分子のアミノ末端側の半分によって完全に発現される。BPIのこれらの性質は、BPIの組換えアミノ末端フラグメントの前臨床ならびにその後の臨床試験を、促進させてきた。動物において、ヒトBPIタンパク質製剤は、単離されたLPSの致死注射に対する保護をもたらす。健康な志願者における第I相試験、および第I/I相複合臨床試験は、完了しているか、あるいは、現在進行中であり(重篤な小児髄膜炎球菌血症、出血性外傷、部分的肝切除、重篤な腹膜炎、および嚢胞性線維症)、さらに、第III相試験(髄膜炎球菌血症および出血性外傷)も、着手されている。900人を超える、正常者および重症者の何れにおいても、安全性または免疫原性の問題には、遭遇していない。予備的な証拠は、BPIで治療されて患者においては、総合的な利点を暗示している。これらの結果は、BPI、また、本発明のような、他の脂質結合タンパク質も、命を脅かす感染症、ならびに、菌血症および内毒素血症に付随する症状の治療中に、存在価値を有していることを示唆している。

#### 【0009】

NLBP4の該アミノ酸配列は、LBP、BPIおよびCETPなどの、脂質結合タンパク質のタンパク質ファミリーの他のメンバーとの、有意な相同性を示す。NLBP4は、例えば、LBP中のプロリン-97、システイン-159、システイン-198、プロリン-236のアミノ酸と、それぞれ対応するプロリン-266、システイン-318、システイン-355、プロリン-392など、脂質結合タンパク質のタンパク質・ファミリーの他のメンバー間で保存されているいくつかのアミノ酸を含有している。さらに、NLBP4は、LBP、BPI、NLBP1、NLBP2、NLBP3およびCETPと類似している、エキソン/イントロン構成を示し、(i)該脂質結合タンパク質のタンパク質ファミリーの他のメンバーと同様に、NLBP4も、共通の始源遺伝子から進化してきていること、そして(ii)これらのタンパク質、類似する機能的性質を共有していることを示唆している。

#### 【0010】

さらなる形態は、NLBP4は、咽頭ガンなどの腫瘍組織中においてダウンレギュレーションされているという発見に関連している。この発見は、腫瘍の免疫回避機構における、新規な脂質結合タンパク質4などの脂質結合タンパク質の役割を示しており、そして、そうであれば、治療的介入のための論理的根拠を与える。

#### 【0011】

該新規な脂質結合タンパク質4の生物学的性質を、以降、「新規な脂質結合タンパク質4の生物学的活性」、または「新規な脂質結合タンパク質4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つの新規な脂質結合タンパク質4の生物学的活性を示す。

#### 【0012】

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

10

20

30

40

50

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。

#### 【0013】

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または配列番号：4のアミノ酸配列に由来する、少なくとも30、50または100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、あるいは配列番号：2または配列番号：4のアミノ酸配列から、少なくとも30、50または100の連続したアミノ酸が末端から除去または欠失しているアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドが含まれる。好ましいフラグメントは、新規な脂質結合タンパク質 4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。

10

#### 【0014】

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。

20

#### 【0015】

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。

#### 【0016】

さらなる形態において、本発明は、新規な脂質結合タンパク質 4 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、

30

(a) 配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチドに対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチド；

(d) 配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチド；

(e) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

40

(f) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(g) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；

(h) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(i) 配列番号：1または配列番号：3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

50

列を有するか、または含んでなるポリヌクレオチド；

(j) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するか、または含んでなるポリヌクレオチド；ならびに上記のポリヌクレオチドのフラグメントおよび変異体である、またはその全長にわたって、上記のポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチドが含まれる。

#### 【0017】

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または配列番号：3の配列に由来する、少なくとも15、30、50または100の連続した塩基を有する塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド、あるいは配列番号：1または配列番号：3の配列から、少なくとも30、50または100個の連続した塩基が末端から削除または欠失している配列を含んでなるポリヌクレオチドが含まれる。

#### 【0018】

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。

#### 【0019】

本発明のポリヌクレオチドには、配列番号：2または配列番号：4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。

#### 【0020】

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

(a) 配列番号：2または配列番号：4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または配列番号：4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または配列番号：3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または配列番号：3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。

#### 【0021】

配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチド配列は、殺菌的/透過性増大タンパク質(Acc.:NM\_001725)、リボ多糖結合タンパク質(Acc.:AF105067)、コレステリル・エステル輸送タンパク質(Acc.:NM\_000078)、リン脂質輸送タンパク質(Acc.:NM\_006227)との相同性を示す。配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチド配列は、配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号：2または配列番号：4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または配列番号：3のポリペプチド・コード配列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または配列番号：4のポリペプチドをコードする、配列番号：1または配列番号：3以外の配列であってもよい。配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドは、殺菌的/透過性増大タンパク質(Acc.:NP\_001716)、リボ多糖結合タンパク質(Acc.:SW:P18428)、コレステリルエステル輸送タンパク質(Acc.:NP\_000069)、リン脂質輸送タンパク質(Acc.:NP\_006218)との相同性および/または構造的類似性を有する、脂質結合タン

パク質ファミリーの他のタンパク質と類縁している。

【0022】

本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、特に、それらの相同的なポリペプチドおよびポリヌクレオチドと類似する生物学的な機能/性質を有することが期待される。さらに、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、少なくとも1つの新規な脂質結合タンパク質 4 活性を有する。

【0023】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒトの気管、喉頭、喉頭癌、口蓋、咽頭、子宮内膜、鼻上皮の細胞中の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

10

(例えば、Sambrook 他、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. (1989)を参照のこと)。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。

【0024】

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。

20

30

【0025】

配列番号: 1または配列番号: 3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または配列番号: 3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

【0026】

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または配列番号: 3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

50



んでなる工程によって取得してもよい。かかるハイブリダイゼーション技術は、当業者には周知である。好ましい厳格なハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%のデキストラン硫酸および20マイクログラム/mlの変性させた剪断サケ精子DNAを含んでなる溶液中で、42、一晚インキュベーションし、その後、0.1×SSC中で、約65にてフィルターを洗浄することが含まれる。従って、本発明にはまた、配列番号：1または配列番号：3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

#### 【0027】

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

#### 【0028】

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を参照のこと)。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。

20

30

#### 【0029】

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。

40

#### 【0030】

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

50

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。

#### 【0031】

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。

10

#### 【0032】

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

#### 【0033】

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。

#### 【0034】

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。

40

#### 【0035】

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または配列番号：3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、

50

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。該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。

#### 【0036】

診断に供する核酸は、対象の細胞、例えば、血液、尿、唾液、組織生検または剖検試料などから得ることできる。ゲノムDNAを、直接、検出のために使用してもよく、あるいは、分析に先立ち、PCR、好ましくはRT-PCR、または他の増幅技術を使用して、酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAもまた、同様な手順で使用することができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較して、増幅産物のサイズにおける変化によって検出することができる。点変異は、増幅されたDNAを、標識された新規な脂質結合タンパク質 4 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を参照のこと）。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を参照のこと）。

10

20

#### 【0037】

新規な脂質結合タンパク質 4 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。

30

#### 【0038】

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・ブロットおよび他のハイブリダイゼーション法などの、当該分野で周知の、ポリヌクレオチドの定量方法のいずれかを使用して、RNAレベルで測定することができる。宿主に由来するサンプルにおける、本発明のポリペプチドなどのタンパク質レベルを決定するために使用することができるアッセイ手法は、当業者には周知である。かかるアッセイ手法には、放射免疫アッセイ、競合的結合アッセイ、ウエスタン・ブロット分析およびELISAアッセイが含まれる。

40

#### 【0039】

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または配列番号：3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または配列番号：4のポリペプチドまたはそのフラグメント；あるいは
  - (d) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号：2または配列番号：4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。

50

## 【 0 0 4 0 】

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。

## 【 0 0 4 1 】

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 . M c K u s i c k、ヒトにおけるメンデル遺伝( J o h n s H o p k i n s 大学 W e l c h M e d i c a l L i b r a r y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、連鎖分析(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(W a l t e r , M . , S p i l l e t t , D . , T h o m a s , P . , W e i s s e n b a c h , J . および G o o d f e l l o w , P . , ( 1 9 9 4 ) , 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、N a t u r e G e n e t i c s , 7 , 2 2 ~ 2 8 )。多数のRHパネルを、R e s e a r c h G e n e t i c s ( H u n t s v i l l e , A L , 米国)から、例えば、G e n e B r i d g e 4 RHパネル( H u m . M o l . G e n e t . , 1 9 9 6 , M a r ; 5 ( 3 ) : 3 3 9 ~ 4 6 , ヒトゲノムの放射ハイブリッドマップ。G y a p a y G . , S c h m i t t K . , F i z a m e s C . , J o n e s H . , V e g a - C z a r n y N . , S p i l l e t t D . , M u s e l e t D . , P r u d ' H o m m e J . F . , D i b C . , A u f f r a y C . , M o r i s s e t t e J . , W e i s s e n b a c h , J . および G o o d f e l l o w , 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、ヒトの第20番染色体にマッピングされる。

## 【 0 0 4 2 】

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(S c h e n e e t a l . , S c i e n c e , 2 7 0 , 4 6 7 ~ 4 7 0 , 1 9 9 5 および S h a l o n e t a l . , G e n o m e R e s . , 6 , 6 3 9 ~ 6 4 5 , 1 9 9 6 )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、P e r k i n E l m e r 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。

【0043】

本発明のポリペプチドは、気管、喉頭、喉頭癌、口蓋、咽頭、子宮内膜、鼻上皮において発現している。

【0044】

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

10

【0045】

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

20

【0046】

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の使用してもよい。

【0047】

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

30

【0048】

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

40

50

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

#### 【0049】

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、上に記載したような本発明に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)を参照のこと）あるいは小分子であってもよい。

20

#### 【0050】

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、混合物における新規な脂質結合タンパク質 4 活性を測定する工程、および混合物の新規な脂質結合タンパク質 4 活性を、候補化合物を含有しないコントロール混合物と比較する工程を単に含んでなることでもよい。

30

#### 【0051】

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、Schullick et al., Anal. Biochem., 246, 20~29 (1997)に記載されている、ナノウエル法などの開発途上の方法もまた含まれる。

40

#### 【0052】

既に記載したような、Fc 部分および新規な脂質結合タンパク質 1・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

50

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) を参照のこと)。

#### 【0053】

##### スクリーニング技術

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

10

#### 【0054】

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

20

#### 【0055】

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

30

#### 【0056】

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新規な脂質結合タンパク質 4 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、新規な脂質結合タンパク質 4 遺伝子を導入することができる。特に有用なトランスジェニック動物は、その動物のゲノム内において、動物の遺伝子がヒトの等価体によって置き換えられている、所謂「ノック・イン」動物である。ノック・イン・トランスジェニック動物は、医薬探索のプロセスにおいて、化合物はヒトの標的に対して特異的であるという、標的の妥当性検証用に有用である。他の有用なトランスジェニック動物は、内因性 DNA 配列によってコードされている、本発明のポリペプチドに対する動物オルソログの発現が細胞内で部分的または完全に無効とされている、所謂「ノック・アウト」動物である。遺伝子のノック・アウトは、技術の限界の結果として、特異的な細胞または組織を対象とする、特定の細胞または組織においてのみ起きていてもよく、あるいは、動物内の全て、または実質的に全ての細胞において生じててもよい。トランスジェニック動物の手法はまた、導入された遺伝子が、本発明のポリペプチドを大量に供するために発現させられる動物全体の発現・クローニング・システムを提供する。

40

50

## 【 0 0 5 7 】

上に記載された方法において使用されるスクリーニング・キットは、本発明のさらなる形態をなす。かかるスクリーニング・キットは、

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

を含んでなり、好ましくは、前記のポリペプチドは、配列番号： 2 または配列番号： 4 のものである。

## 【 0 0 5 8 】

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 9 】

## (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 6 0 】

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 6 1 】

「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。

## 【 0 0 6 2 】

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

## 【 0 0 6 3 】

「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

10

20

30

40

50



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、ピオチン化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、クロス・リンク形成、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 $\alpha$ -カルボキシル化、グリコシル化、GPI・アンカー形成、ヒドロキシ化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸のタンパク質へのトランスファー・RNA媒介付加、ならびユビキチン化が含まれる(例えば、*Proteins - Structures and Molecular Properties*, 第2版、T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; *World, F.*, 翻訳後のタンパク質修飾: 全体像および展望、1~12、*Post-translational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson 編, Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., 「タンパク質修飾および非タンパク質補助因子の分析」、*Meth. Enzymol.*, 182, 626~646, 1990; Rattan et al., 「タンパク質合成: 翻訳後修飾およびエージェンシング」、*Ann. NY Acad. Sci.*, 663, 48~62, 1992を参照のこと)。

10

20

30

#### 【0064】

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または配列番号: 3の基準配列よりも短いポリヌクレオチド配列をいう。

#### 【0065】

「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

40

50

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

#### 【0066】

「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。

#### 【0067】

「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。

#### 【0068】

「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。該プロセスには、少なくとも3つのプライマーが必要とされる。共通プライマーが、アッセイされる多型に対して、逆方向に相補となるように使用される。この共通プライマーは、多様な塩基から50bpから1500bpの間で隔たったものとできる。それ以外の2つ（またはそれ以上）のプライマーは、最後の3'塩基が、多型を構成する2つ（またはそれ以上）の対立遺伝子の1つと一致するように変化している点を除いて、互いに同一である。そして、それぞれ、共通プライマーおよび1つの対立遺伝子特異的プライマーを使用して、2つ（またはそれ以上）のPCR反応を、サンプルDNAについて行う。

20

#### 【0069】

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。

30

#### 【0070】

「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ならって、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

#### 【0071】

「%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ならって、決定してもよく（所謂、全体的なアラインメント）、同じ長さまたは非常に類似する長さの配列に対して、特に適している；あるいは、より短い、限定された長さにならって、決定してもよく（所謂、局所的なアラインメント）

50

、不ぞろいな長さの配列において、より好適である。

#### 【0072】

「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。

#### 【0073】

2つ以上の配列の同一性および類似性を比較するための方法は、当該分野では周知となっている。従って、例えば、ウイスコンシン配列分析パッケージ バージョン 9.1 (D evereux J. et al., Nucleic Acids Res., 12, 387~395, 1984; Genetic Computer Group, Madison, Wisconsin, 米国) 中の利用可能なプログラム、例えば、BESTFIT およびGAP プログラムを、2つのポリヌクレオチド間の%同一性、ならびに2つのポリペプチド配列間の%同一性および%類似性を決定するために使用してもよい。BESTFITは、SmithおよびWatermanの「局所的相同性」アルゴリズム (J. Mol. Biol., 147, 195~197, 1981, Advances in Applied Mathematics, 2, 482~489, 1981) を使用して、2つの配列間における、類似性の最も良い1つの領域を見出す。BESTFITは、長さが類似していない2つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列の比較に対してより適しており、該プログラムは、より短い配列は、より長いものの一部を表すことを仮定している。一方、GAPは、Neddlleman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。

#### 【0074】

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)。

#### 【0075】

好ましくは、BLOSUM62 アミノ酸置換行列 (Henikoff S and Henikoff JG, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 8

10

20

30

40

50

9, 10915 ~ 10919, 1992) を、比較の前に、ヌクレオチド配列をアミノ酸配列に予め翻訳する場合をも含み、ポリペプチド配列の比較において使用する。

#### 【0076】

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、前に記載したように、検討と基準とする配列とは、最適にアライメントされ、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。

#### 【0077】

「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。

#### 【0078】

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。

#### 【0079】

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 ならびに配列番号：3、あるいは配列番号：2 ならびに配列番号：4 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。

#### 【0080】

「ホモログ」は、基準の配列に対して、高度の配列関連性を有するポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列を示すために、当該分野で使用されている一般的な用語である。

かかる関連性は、既に定義されているように、2つの配列間の同一性および/または類似性の程度を決定することによって、定量化することもできる。この総称的な用語には、「オルソログ」および「パラログ」の用語が含まれる。「オルソログ」は、別の種中における、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの機能的等価体であるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。「パラログ」は、機能的に類似している、同じ種内にあるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。

【0081】

「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、同第5726044号に開示されている。Fc-NLIP4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NLIP4を形成させるために、Fc-NLIP4またはNLIP4断片の機能的発現を行う上で好都合である。Fc-NLIP4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NLIP4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

【0082】

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。

## 【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  
25 October 2001 (25.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 01/79269 A2**

- (51) International Patent Classification: C07K 14/00 [DE/DE]: Asterweg 3, 70771 Leinfelden (DE).  
DÜCKER, Klaus [DE/DE]: Euterstrasse 3, 64291  
Darmstadt (DE).
- (21) International Application Number: PCT/EP01/04170
- (22) International Filing Date: 11 April 2001 (11.04.2001) (74) Common Representative: MERCK PATENT GMBH,  
Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (25) Filing Language: English (81) Designated States (national): CA, JP, US.
- (26) Publication Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE,  
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, TR).
- (30) Priority Data: 00107995.3 18 April 2000 (18.04.2000) EP  
Published:  
without international search report and to be republished  
upon receipt of that report
- (71) Applicant (for all designated States except US): MERCK  
PATENT GMBH [DE/DE]: Frankfurter Strasse 250,  
64293 Darmstadt (DE).
- (72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicants (for US only): GRELL, Matthias
- 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 01/79269 A2

(54) Title: NEW LIPID BINDING PROTEIN 4

(57) Abstract: New Lipid Binding Protein 4 polypeptides and polynucleotides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques are disclosed. Also disclosed are methods for utilizing New Lipid Binding Protein 4 polypeptides and polynucleotides in diagnostic assays.

WO 01/79269

- 1 -

PCT/EP01/04170

**New Lipid Binding Protein 4****Field of the Invention**

This invention relates to newly identified polypeptides and polynucleotides encoding such polypeptides sometimes hereinafter referred to as „New Lipid Binding Protein 4 (NLBP4)“, 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.

**Background of the Invention**

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

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

**Summary of the Invention**

The present invention relates to New Lipid Binding Protein 4, in particular New Lipid Binding Protein 4 polypeptides and New Lipid Binding Protein 4 polynucleotides, recombinant materials and methods for their production. Such polypeptides and polynucleotides are of interest in relation to methods

WO 01/79269

- 2 -

PCT/EP01/04170

of treatment of certain diseases, including, but not limited to, cancer, bacteremia, endotoxemia, meningococemia, hemorrhagic trauma, partial hepatectomy, severe peritoneal infections, cystic fibrosis, coronary heart disease, arteriosclerosis 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 New Lipid Binding Protein 4 imbalance with the identified compounds. In a still further aspect, the invention relates to diagnostic assays for detecting diseases associated with inappropriate New Lipid Binding Protein 4 activity or levels.

#### Description of the Invention

In a first aspect, the present invention relates to New Lipid Binding Protein 4 polypeptides. Such polypeptides include:

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

Polypeptides of the present invention are believed to be members of the Lipid Binding Proteins, such as lipopolysaccharide-binding protein (LBP) or bactericidal/permeability-increasing protein (BPI). They are therefore of



WO 01/79269

- 3 -

PCT/EP01/04170

interest because lipid binding proteins show high-affinity binding to lipopolysaccharide (LPS), a glycolipid found in the outer membrane of gram negative bacteria. Accordingly, lipid binding proteins play a decisive role in the host defense against bacterial infections.

Further, all of the known members of the protein family of lipid binding proteins are able to bind phospholipids. LBP, cholesteryl ester transfer protein (CETP) and phospholipid-transfer protein (PLTP) can also bind cholesterol and high-density lipoproteins (HDL). HDL plasma levels are inversely correlated with coronary heart disease and atherosclerosis. Lipid binding and transfer proteins, such as CETP and PLTP, facilitate the transfer of phospholipids and cholesterol from triglyceride-rich lipoproteins (TRL) into HDL. Accordingly, members of the family of lipid binding proteins are thought to play a role in the prevention of these disease.

Further, LBP is an acute phase serum protein secreted by the liver that catalyses the transfer of LPS monomers to CD14 thereby facilitating a broad spectrum of cellular and tissue responses leading to antibacterial and proinflammatory activities. BPI is a 456-residue cationic protein produced by polymorphonuclear leukocytes (PMN) and is stored in the primary granules of these cells. The biological effects of isolated BPI are linked to complex formation with LPS. Binding of BPI to live bacteria via LPS causes immediate growth arrest. Complex formation of BPI with cell-associated or cell-free LPS inhibits all LPS-induced host cell responses. BPI-blocking antibodies abolish the potent activity of whole PMN lysates and inflammatory fluids against BPI-sensitive bacteria. The antibacterial and the anti-endotoxin activities of BPI are fully expressed by the amino terminal half of the molecule. These properties of BPI have prompted preclinical and subsequent clinical testing of recombinant amino-terminal fragments of BPI. In animals, human BPI protein products protect against lethal injections of isolated LPS. Phase I trials in healthy human volunteers and multiple Phase I/II clinical trials have been completed or are in progress (severe pediatric meningococemia, hemorrhagic trauma, partial hepatectomy, severe peritoneal infections, and cystic fibrosis) and phase III trials (meningococemia and hemorrhagic trauma) have been initiated. In none of >900 normal and severely ill individuals have issues of safety or immunogenicity been encountered. Preliminary evidence points to overall benefit in BPI-treated patients. These results suggest that BPI, but also other lipid binding protein such as the present

WO 01/79269

- 4 -

PCT/EP01/04170

invention, may have a place in the treatment of life-threatening infections and conditions associated with bacteremia and endotoxemia.

The amino acid sequence of NLBP4 shows significant homology to other members of the protein family of lipid binding proteins such as LBP, BPI and CETP. NLBP4 contains several amino acids which are conserved between the other members of the protein family of lipid binding proteins such as Prolin-266, Cystein-318, Cystein-355, Prolin-392, which corresponds e.g. to the amino acids Prolin-97, Cystein-159, Cystein-196, Prolin-236 in LBP, respectively. Further, NLBP4 shows a similar exon/intron organisation to LBP, BPI, NLBP1, NLBP2, NLBP3, and CETP, suggesting that (i) NLBP4 like other members of the protein family of lipid binding proteins, has evolved from a common primordial gene and (ii) that these proteins share similar functional properties.

A further aspect relates to the finding that NLBP1 is downregulated in tumor tissues, e.g. in larynx carcinomas. This finding indicates a role of lipid binding proteins such as New Lipid Binding Protein 4 in mechanisms of immune escape of the tumor and as such gives a rationale for therapeutic interventions.

The biological properties of the New Lipid Binding Protein 4 are hereinafter referred to as "biological activity of New Lipid Binding Protein 4" or "New Lipid Binding Protein 4 activity". Preferably, a polypeptide of the present invention exhibits at least one biological activity of New Lipid Binding Protein 4.

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

Preferred fragments of polypeptides of the present invention include a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous amino acids from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or a polypeptide comprising an amino acid

WO 01/79269

- 5 -

PCT/EP01/04170

sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous amino acids truncated or deleted from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. Preferred fragments are biologically active fragments that mediate the biological activity of New Lipid Binding Protein 4, including those with a similar activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Also preferred are those fragments that are antigenic or immunogenic in an animal, especially in a human.

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

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

In a further aspect, the present invention relates to New Lipid Binding Protein 4 polynucleotides. Such polynucleotides include:

(a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO: 3;

(b) a polynucleotide comprising the polynucleotide of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO: 3;

(c) a polynucleotide having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polynucleotide of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO: 3;

WO 01/79269

- 6 -

PCT/EP01/04170

(d) the polynucleotide of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO: 3;

(e) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO: 4;

5 (f) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO: 4;

(g) a polynucleotide having a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO: 4;

10 (h) a polynucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO: 4;

(i) a polynucleotide having or comprising a polynucleotide sequence that has an Identity Index of 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, or 0.99 compared to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO: 3;

15 (j) a polynucleotide having or comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence that has an Identity Index of 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, or 0.99 compared to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO: 4; and

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

Preferred fragments of polynucleotides of the present invention include a polynucleotide comprising an nucleotide sequence having at least 15, 30, 50 or 100 contiguous nucleotides from the sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, or a polynucleotide comprising an sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous nucleotides truncated or deleted from the sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3.

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).

WO 01/79269

- 7 -

PCT/EP01/04170

Polynucleotides of the present invention also include polynucleotides encoding polypeptide variants that comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 and in which several, for instance from 50 to 30, from 30 to 20, from 20 to 10, from 10 to 5, from 5 to 3, from 3 to 2, from 2 to 1 or 1 amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination.

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

(a) comprises an RNA transcript of the DNA sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(b) is the RNA transcript of the DNA sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(c) comprises an RNA transcript of the DNA sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3; or

(d) is the RNA transcript of the DNA sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3;

and RNA polynucleotides that are complementary thereto.

The polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 shows homology with bactericidal/permeability-increasing protein (Acc.: NM\_001725); lipopolysaccharide-binding protein (Acc.: AF105067); cholesteryl ester transfer protein (Acc.: NM\_000078); phospholipid transfer protein (Acc.: NM\_006227). The polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 is a cDNA sequence that encodes the polypeptide of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. The polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 may be identical to the polypeptide encoding sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 or it may be a sequence other than SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, which, as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, also encodes the polypeptide of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. The polypeptide of the SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 is related to other proteins of the Lipid Binding Proteins family, having homology and/or

WO 01/79269

- 8 -

PCT/EP01/04170

structural similarity with bactericidal/permeability-increasing protein (Acc.: NP\_001716); lipopolysaccharide-binding protein (Acc.:P18428); cholesterol ester transfer protein (Acc.: NP\_000069); phospholipid transfer protein (Acc.: NP\_006218).

5 Preferred polypeptides and polynucleotides of the present invention are expected to have, *inter alia*, similar biological functions/properties to their homologous polypeptides and polynucleotides. Furthermore, preferred polypeptides and polynucleotides of the present invention have at least one New Lipid Binding Protein 4 activity.

10

Polynucleotides of the present invention may be obtained using standard cloning and screening techniques from a cDNA library derived from mRNA in cells of human trachea, larynx, larynx carcinoma, palate, pharynx, endometrium, olfactory epithelium, (see for instance, Sambrook *et al.*,  
15 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Polynucleotides of the invention can also be obtained from natural sources such as genomic DNA libraries or can be synthesized using well known and commercially available techniques.

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

Polynucleotides that are identical, or have sufficient identity to a polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO: 3, may be used as hybridization probes for cDNA and genomic DNA or as primers for a nucleic acid amplification reaction (for instance, PCR). Such probes and primers may be used to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding polypeptides of the present invention and to isolate cDNA and genomic clones of other genes (including genes encoding paralogs from human sources and orthologs and paralogs from species other than human) that have a high sequence similarity to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO: 3, typically at least 95% identity. Preferred probes and primers will generally comprise at least 15 nucleotides, preferably, at least 30 nucleotides and may have at least 50, if not at least 100 nucleotides. Particularly preferred probes will have between 30 and 50 nucleotides. Particularly preferred primers will have between 20 and 25 nucleotides.

A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention, including homologs from species other than human, may be obtained by a process comprising the steps of screening a library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 or a fragment thereof, preferably of at least 15 nucleotides; and isolating full-length cDNA and genomic clones containing said polynucleotide sequence. Such hybridization techniques are well known to the skilled artisan. Preferred stringent hybridization conditions include overnight incubation at 42°C in a solution comprising: 50% formamide, 5xSSC (150mM NaCl, 15mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH7.6), 5x Denhardt's solution, 10 % dextran sulfate, and 20 microgram/ml denatured, sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 0.1x SSC at about 65°C. Thus the present invention also includes isolated polynucleotides, preferably with a nucleotide sequence of at least 100, obtained by screening a library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO: 3 or a fragment thereof, preferably of at least 15 nucleotides.

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.

There are several methods available and well known to those skilled in the art to obtain full-length cDNAs, or extend short cDNAs, for example those based on the method of Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) (see, for example, Frohman et al., Proc Nat Acad Sci USA 85, 8998-9002, 1988). Recent modifications of the technique, exemplified by the Marathon (trade mark) technology (Clontech Laboratories Inc.) for example, have significantly simplified the search for longer cDNAs. In the Marathon (trade mark) technology, cDNAs have been prepared from mRNA extracted from a chosen tissue and an 'adaptor' sequence ligated onto each end. Nucleic acid amplification (PCR) is then carried out to amplify the "missing" 5' end of the cDNA using a combination of gene specific and adaptor specific oligonucleotide primers. The PCR reaction is then repeated using 'nested' primers, that is, primers designed to anneal within the amplified product (typically an adaptor specific primer that anneals further 3' in the adaptor sequence and a gene specific primer that anneals further 5' in the known gene sequence). The products of this reaction can then be analysed by DNA sequencing and a full-length cDNA constructed either by joining the product directly to the existing cDNA to give a complete sequence, or carrying out a separate full-length PCR using the new sequence information for the design of the 5' primer.

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



WO 01/79269

- 11 -

PCT/EP01/04170

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

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.

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

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

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

Polynucleotides of the present invention may be used as diagnostic reagents, through detecting mutations in the associated gene. Detection of a mutated form of the gene characterised by the polynucleotide of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 in the cDNA or genomic sequence and which is associated with a dysfunction will provide a diagnostic tool that can add to, or define, a diagnosis of a disease, or susceptibility to a disease, which results from under-expression, over-expression or altered spatial or temporal expression of the gene. Individuals carrying mutations in the gene may be detected at the DNA level by a variety of techniques well known in the art.

Nucleic acids for diagnosis may be obtained from a subject's cells, such as from blood, urine, saliva, tissue biopsy or autopsy material. The genomic DNA may be used directly for detection or it may be amplified enzymatically by using PCR, preferably RT-PCR, or other amplification techniques prior to analysis. RNA or cDNA may also be used in similar fashion. Deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to the normal genotype. Point mutations can be identified by hybridizing amplified DNA to labeled New Lipid Binding Protein 4 nucleotide sequences. Perfectly matched sequences can be distinguished

WO 01/79269

- 13 -

PCT/EP01/04170

from mismatched duplexes by RNase digestion or by differences in melting temperatures. DNA sequence difference may also be detected by alterations in the electrophoretic mobility of DNA fragments in gels, with or without denaturing agents, or by direct DNA sequencing (see, for instance, Myers *et al.*, Science (1985) 230:1242). Sequence changes at specific locations may also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S1 protection or the chemical cleavage method (see Cotton *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85: 4397-4401).

An array of oligonucleotide probes comprising New Lipid Binding Protein 4 polynucleotide sequence or fragments thereof can be constructed to conduct efficient screening of *e.g.*, genetic mutations. Such arrays are preferably high density arrays or grids. Array technology methods are well known and have general applicability and can be used to address a variety of questions in molecular genetics including gene expression, genetic linkage, and genetic variability, see, for example, M.Chee *et al.*, Science, 274, 610-613 (1996) and other references cited therein.

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

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

(a) a polynucleotide of the present invention, preferably the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, or a fragment or an RNA transcript thereof;

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

WO 01/79269

- 4 -

PCT/EP01/04170

(c) a polypeptide of the present invention, preferably the polypeptide of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO: 4 or a fragment thereof; or

(d) an antibody to a polypeptide of the present invention, preferably to the polypeptide of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO: 4.

5 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.

10 The polynucleotide sequences of the present invention are valuable for chromosome localisation studies. The sequence is specifically targeted to, and can hybridize with, a particular location on an individual human chromosome. The mapping of relevant sequences to chromosomes according to the present invention is an important first step in correlating  
15 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  
20 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. Spillet, D., Thomas, P., Weissenbach, J., and Goodfellow, P.,  
25 (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, Spillet 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  
30 DNAs. Each of these DNAs contains random human genomic fragments

WO 01/79269

- 15 -

PCT/EP01/04170

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 20.

The polynucleotide sequences of the present invention are also valuable tools for tissue expression studies. Such studies allow the determination of expression patterns of polynucleotides of the present invention which may give an indication as to the expression patterns of the encoded polypeptides in tissues, by detecting the mRNAs that encode them. The techniques used are well known in the art and include in situ hybridisation techniques to clones arrayed on a grid, such as cDNA microarray hybridisation (Scherer *et al*, Science, 270, 467-470, 1995 and Shalon *et al*, Genome Res, 6, 639-645, 1996) and nucleotide amplification techniques such as PCR. A preferred method uses the TAQMAN (Trade mark) technology available from Perkin Elmer. Results from these studies can provide an indication of the normal function of the polypeptide in the organism. In addition, comparative studies of the normal expression pattern of mRNAs with that of mRNAs encoded by an alternative form of the same gene (for example, one having an alteration in polypeptide coding potential or a regulatory mutation) can provide valuable insights into the role of the polypeptides of the present invention, or that of inappropriate expression thereof in disease. Such inappropriate expression may be of a temporal, spatial or simply quantitative nature.

The polypeptides of the present invention are expressed in trachea, larynx, larynx carcinoma, palate, pharynx, endometrium, olfactory epithelium.

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

WO 01/79269

- 16 -

PCT/EP01/04170

polypeptides of the invention than their affinity for other related polypeptides in the prior art.

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

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

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

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

WO 01/79269

- 17 -

PCT/EP01/04170

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 as a vaccine, a polypeptide or a nucleic acid vector will be normally provided as a vaccine formulation (composition). The formulation may further comprise a suitable carrier. Since a polypeptide may be broken down in the stomach, it is preferably administered parenterally (for instance, subcutaneous, intramuscular, intravenous, or intradermal injection). Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions that may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that may include suspending agents or thickening agents. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampoules and vials and may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier immediately prior to use. The vaccine formulation may also include adjuvant systems for enhancing the immunogenicity of the formulation, such as oil-in water systems and other systems known in the art. The dosage will depend on the specific activity of the vaccine and can be readily determined by routine experimentation.

Polypeptides of the present invention have one or more biological functions that are of relevance in one or more disease states, in particular the diseases of the invention hereinbefore mentioned. It is therefore useful to identify compounds that stimulate or inhibit the function or level of the polypeptide. Accordingly, in a further aspect, the present invention provides for a method of screening compounds to identify those that stimulate or inhibit the function or level of the polypeptide. Such methods identify agonists or antagonists that may be employed for therapeutic and prophylactic purposes for such diseases of the invention as hereinbefore mentioned. Compounds may be identified from a variety of sources, for example, cells, cell-free preparations, chemical libraries, collections of chemical compounds, and natural product mixtures. Such agonists or antagonists so-identified may be natural or modified substrates, ligands, receptors, enzymes, etc., as the case may be, of the polypeptide; a

structural or functional mimetic thereof (see Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology 1(2):Chapter 5 (1991)) or a small molecule.

The screening method may simply measure the binding of a candidate compound to the polypeptide, or to cells or membranes bearing the polypeptide, or a fusion protein thereof, by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound. Alternatively, the screening method may involve measuring or detecting (qualitatively or quantitatively) the competitive binding of a candidate compound to the polypeptide against a labeled competitor (e.g. agonist or antagonist). Further, these screening methods may test whether the candidate compound results in a signal generated by activation or inhibition of the polypeptide, using detection systems appropriate to the cells bearing the polypeptide. Inhibitors of activation are generally assayed in the presence of a known agonist and the effect on activation by the agonist by the presence of the candidate compound is observed. Further, the screening methods may simply comprise the steps of mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide of the present invention, to form a mixture, measuring a New Lipid Binding Protein 4 activity in the mixture, and comparing the New Lipid Binding Protein 4 activity of the mixture to a control mixture which contains no candidate compound.

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

Fusion proteins, such as those made from Fc portion and New Lipid Binding Protein 4 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)).



WO 01/79269

- 19 -

PCT/EP01/04170

## Screening techniques

5 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  
10 production of polypeptide (also called antagonist or agonist, respectively) from suitably manipulated cells or tissues.

A polypeptide of the present invention may be used to identify membrane bound or soluble receptors, if any, through standard receptor binding techniques known in the art. These include, but are not limited to, ligand  
15 binding and crosslinking assays in which the polypeptide is labeled with a radioactive isotope (for instance,  $^{125}\text{I}$ ), chemically modified (for instance, biotinylated), or fused to a peptide sequence suitable for detection or purification, and incubated with a source of the receptor (cells, cell membranes, cell supernatants, tissue extracts, bodily fluids). Other  
20 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.

25 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  
30 the present invention but do not elicit a response, so that the activity of the polypeptide is prevented.

Screening methods may also involve the use of transgenic technology and New Lipid Binding Protein 4 gene. The art of constructing transgenic  
35 animals is well established. For example, the New Lipid Binding Protein 4 gene may be introduced through microinjection into the male

WO 01/79269

- 20 -

PCT/EP01/04170

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

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

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

which polypeptide is preferably that of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO: 4.

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

#### Glossary

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

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

Fab or other immunoglobulin expression library.

5 "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  
10 its natural state is "isolated", as the term is employed herein. Moreover, a polynucleotide or polypeptide that is introduced into an organism by transformation, genetic manipulation or by any other recombinant method is "isolated" even if it is still present in said organism, which organism may be living or non-living.

15 "Polynucleotide" generally refers to any polyribonucleotide (RNA) or polydeoxribonucleotide (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  
20 mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, "polynucleotide" refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The term "polynucleotide" also  
25 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 unusual bases such as inosine. A variety of modifications may be made to DNA and RNA; thus, "polynucleotide" embraces chemically, enzymatically or  
30 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 referred to as oligonucleotides.

35 "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.

5 "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.

10 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.

15 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

20 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

25 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).

30

35

"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 or SEQ ID NO:3.

"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.

5 "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  
10 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  
15 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  
20 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  
25 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.

30 "% 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  
35 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.

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  
10 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.

15 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  
20 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  
25 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  
30 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  
35 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.

WO 01/79269

- 26 -

PCT/EP01/04170

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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) and FASTA (Pearson W R, Methods in Enzymology, 183, 63-99, 1990; Pearson W R and Lipman D J, Proc Nat Acad Sci USA, 85, 2444-2448, 1988, available as part of the Wisconsin Sequence Analysis Package).

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

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

"Identity Index" is a measure of sequence relatedness which may be used to compare a candidate sequence (polynucleotide or polypeptide) and a reference sequence. Thus, for instance, a candidate polynucleotide sequence having, for example, an Identity Index of 0.95 compared to a reference polynucleotide sequence is identical to the reference sequence except that the candidate polynucleotide sequence may include on average up to five differences per each 100 nucleotides of the reference sequence. Such differences are selected from the group consisting of at least one nucleotide deletion, substitution, including transition and transversion, or insertion. These differences may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference polynucleotide sequence or anywhere between these terminal positions, interspersed either individually among the nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. In other words, to obtain a polynucleotide sequence having an Identity Index of 0.95 compared to a reference polynucleotide sequence, an average of up to 5



WO 01/79269

- 27 -

PCT/EP01/04170

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.

5 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  
10 are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion. These differences may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between these terminal positions, interspersed either  
15 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,  
20 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  
25 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 and  
30 SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO: 4, respectively,

$I$  is the Identity Index ,

$\bullet$  is the symbol for the multiplication operator, and

WO 01/79269

- 28 -

PCT/EP01/04170

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

"Homolog" is a generic term used in the art to indicate a polynucleotide or polypeptide sequence possessing a high degree of sequence relatedness to a reference sequence. Such relatedness may be quantified by determining the degree of identity and/or similarity between the two sequences as hereinbefore defined. Falling within this generic term are the terms "ortholog", and "paralog". "Ortholog" refers to a polynucleotide or polypeptide that is the functional equivalent of the polynucleotide or polypeptide in another species. "Paralog" refers to a polynucleotide or polypeptide that within the same species which is functionally similar.

"Fusion protein" refers to a protein encoded by two, unrelated, fused genes or fragments thereof. Examples have been disclosed in US 5541087, 5726044. In the case of Fc-NLBP4, employing an immunoglobulin Fc region as a part of a fusion protein is advantageous for performing the functional expression of Fc-NLBP4 or fragments of NLBP4, to improve pharmacokinetic properties of such a fusion protein when used for therapy and to generate a dimeric NLBP4. The Fc-NLBP4 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 NLBP4 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.

WO 01/79269

- 29 -

PCT/EP01/04170

**Claims**

1. An polypeptide selected from one of the groups consisting of:
- (a) a polypeptide encoded by a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3;
  - 5 (b) a polypeptide comprising a polypeptide sequence having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 2; or SEQ ID NO: 4
  - (c) a polypeptide having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4; and
  - (d) the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 and
  - 10 (e) fragments and variants of such polypeptides in (a) to (d).
2. The polypeptide as claimed in claim 1 comprising the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.
- 15 3. The polypeptide as claimed in claim 1 which is the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.
4. A polynucleotide selected from one of the groups consisting of:
- (a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least 95%  
20 identity to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3;
  - (b) a polynucleotide having at least 95% identity to the polynucleotide of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3;
  - (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 or SEQ ID NO: 4;
  - 25

WO 01/79269

- 30 -

PCT/EP01/04170

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

WO 01/79269

- 31 -

PCT/EP01/04170

8. A process for producing a polypeptide of claim 1 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 any one polypeptide of claim 1.

10. An antibody immunospecific for the polypeptide of any one of claims 1 to 3.

11. A method for screening to identify compounds that stimulate or inhibit the function or level of the polypeptide of claim 1 comprising a method selected from the group consisting of:

(a) measuring or, detecting, quantitatively or qualitatively, the binding of a candidate compound to the polypeptide (or to the cells or membranes expressing the polypeptide) or a fusion protein thereof by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound;

(b) measuring the competition of binding of a candidate compound to the polypeptide (or to the cells or membranes expressing the polypeptide) or a fusion protein thereof in the presence of a labeled competitor;

(c) testing whether the candidate compound results in a signal generated by activation or inhibition of the polypeptide, using detection systems appropriate to the cells or cell membranes expressing the polypeptide;

(d) mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide of claim 1, to form a mixture, measuring activity of the polypeptide in the mixture, and comparing the activity of the mixture to a control mixture which contains no candidate compound; or

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

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

30

WO 01/79269

- 1 -

PCT/EP01/04170

## SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH  
 5 <100> New lipid binding protein 4  
 <130> NMLBP4MG65  
 10 <140>  
 <141>  
 <160> 4  
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 1842  
 <212> DNA  
 20 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> 111..1842  
 25 <400> 1  
 atg tgg atg ggc tgg tat tta gct ggg ctg tct ggg gtg gct gtg tat 48  
 Met Trp Met Ala Trp Cys Val Ala Ala Leu ser Val Val Ala Val Cys  
 1 5 10 15  
 30 ggc acc ggc cca ggg aca aac acc gtc ctg agg ggg acc aca gat gtg 96  
 Gly Thr Ser His Glu Thr Asn Thr Val Leu Arg Val Thr Lys Asp Val  
 20 25 30  
 35 ttc acc att gaa att taa ggt atg ctg tgg caa agt gat gct ctg gaa 144  
 Leu Ser Asp Ala Ile Ser Gly Met Leu Glu Glu Ser Asp Ala Leu His  
 35 40 45  
 40 tcc acc tgg aga gag ttc ttc ttc ggt ggt ggt gat att acc tac aat 192  
 Ser Ala Leu Arg Glu Val Pro Leu Gly Val Gly Asp Ile Pro Tyr Asn  
 50 55 60  
 45 aac ttc cat gta cga gga acc acc cca gta tct acc aca ggc aca aca 240  
 Asp Phe His Val Arg Gly Pro Phe Pro Val Tyr Thr Asn Gly Lys Lys  
 65 70 75 80  
 50 ctt gat ggt att tac cag tat ggt cag att tgg acc acc gac aca aat 288  
 Leu Asp Gly Ile Tyr Glu Tyr Gly His Ile Glu Thr Asn Asp Asn Thr  
 85 90 95  
 55 gct cag ctg gga ggc aac taa cga tat gat ggg tta ctt gag taa gag 336  
 Ala Glu Leu Gly Gly Lys Tyr Arg Tyr Gly Glu Ile Leu Gly Ser Glu  
 100 105 110  
 60 gga acc atc agg gac ctg cga acc agt ggc tat cgc agt gac gag aat 384  
 Gly Ser Ile Arg Asp Leu Arg Asn Ser Gly Tyr Arg Ser Ala Glu Asn  
 115 120 125  
 65 gaa tat ggt ggc cca agg ggt ctg ggg aca taa agg gaa gaa cct ggg 432  
 Ala Tyr Gly Gly His Arg Gly Leu Gly Arg Tyr Arg Ala Ala Pro Val

WO 01/79269

- 2 -

PCT/EP01/04170

130 135 140  
 ggc agg att cac cgg gga gag atg cag ccc gga gaa atc ccc ccc gga 480  
 Gly Arg Leu His Arg Arg Glu Leu Gln Pro Gly Glu Ile Pro Pro Gly  
 5 145 150 155 160  
 gtc gcc act ggg ggc atg ggc cca ggt ggt ttg atg ggc act gga ggc 528  
 Val Ala Thr Gly Ala Val Gly Pro Gly Gly Leu Leu Gly Thr Gly Gly  
 10 165 170 175  
 atg atg gaa gcc gat gcc atc ctc gca gcc cca ggt ggc atg ctc ggc 576  
 Met Leu Ala Ala Asp Gly Ile Leu Ala Gly Gln Gly Gly Leu Leu Gly  
 180 185 190  
 15 gga ggt ggt ctc ctc ggt gat gga gga ctt ctt gga gga ggc ggt gtc 624  
 Gly Gly Gly Leu Leu Gly Asp Gly Gly Leu Leu Gly Thr Gly Gly Val  
 195 200 205  
 20 ctc ggc atg ctc ggc gag ggt ggt atc ctc acc acc gtc cca ggc atc 672  
 Leu Gly Val Leu Gly Gln Gly Gly Ile Leu Ser Thr Val Gln Gly Ile  
 210 215 220  
 acc ggg atg cgt atc gtc gag cca acc ctc cct ggc gtc ccc gtc ggc 720  
 Thr Gly Leu Arg Ile Val Thr Leu Thr Ser Pro Arg Val Ser Val Arg  
 225 230 235 240  
 25 ccc atg ccc ggc gtc ggc gtc tac atg acc atg lac acc cgt gtc gcc 768  
 Leu Leu Pro Gly Val Gly Val Tyr Leu Ser Leu Tyr Thr Arg Val Ala  
 245 250 255  
 30 atc aac gga aag agt ctt acr ggc ttc atg gac gtc cca gta gaa gtc 816  
 Ile Asn Gly Lys Ser Leu Ile Gly Phe Leu Asp Val Ala Val Glu Val  
 260 265 270  
 35 aac atc cca gcc aag gcc ggc atg ccc atg gac ccc acc ggt tat cct 864  
 Asn Ile Thr Ala Lys Val Arg Leu Thr Met Asp Arg Thr Gly Tyr Pro  
 275 280 285  
 40 ggc atg gtc att cag cca tct gac acc ctc ctc ggc gcc atc aac gtc 912  
 Arg Leu Val Ile Glu Arg Cys Asp Thr Leu Leu Gly Gly Ile Lys Val  
 290 295 300  
 aag atg atg cga gcc ctt ctc ccc aat ctc gtc gac aat tta gtc acc 960  
 Cys Leu Leu Arg Gly Leu Leu Pro Asn Leu Val Asp Asn Leu Val Thr  
 45 305 310 315 320  
 cga gcc atg gcc gac gtc ctc cct gac ttg ctc tgc ccc atc atc ggt 1008  
 Arg Val Leu Ala Asp Val Leu Pro Asp Leu Leu Cys Pro Ile Val Asp  
 225 330 335 340  
 50 gtc gtc atg ggt ctt gtc aac gcc aag atg ggc ctc gtc gat tat atg 1056  
 Val Val Leu Gly Leu Val Asn Asp Gln Leu Gly Leu Val Asp Ser Leu  
 345 350  
 55 att cct atg ggc ata ttg gga agt gtc aag ccc acc ttc tcc acc ctc 1104  
 Ile Pro Leu Gly Ile Leu Gly Ser Val Gln Tyr Thr Phe Ser Ser Leu  
 355 360 365  
 60 cca ctt gtc acc ggc gaa ttc atg gag atg gac ctc aac acc atg gtc 1152  
 Pro Leu Val Thr Gly Glu Phe Leu Glu Leu Asp Leu Asn Thr Leu Val  
 370 375 380

PCT/EP01/04170

5	gga gaa gct gga gga gga ccc acc gac tac cca ctg ggg tgg cca gct Gly Glu Ala Gly Gly Gly Leu Ile Asp Tyr Pro Leu Gly Trp Pro Ala 385 390 395 400	1200
	gtg tct ccc aag cag atg cca gag ctg cct ccc atg ggt gac aac acc Val Ser Pro Lys Pro Met Pro Glu Leu Pro Pro Met Gly Asp Asn Thr 405 410 415	1248
10	aag tcc caa ctg gcc atg tct gcc aac ttc ctg gcc tca gtg ctg act Lys Ser Gln Leu Ala Met Ser Ala Asn Phe Leu Gly Ser Val Leu Thr 420 425 430	1296
15	cta ctg cag aag cag cat gct cta gac ctg gat atc acc aat ggc atg Leu Leu Gln Lys Gln His Ala Leu Asp Leu Asp Ile Thr Asn Gly Met 435 440 445	1344
20	ttt gaa gag ctt cct cca ctt acc cca gcc cca ctg gga gcc ctg atc Phe Glu Glu Leu Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Leu Gly Ala Leu Ile 450 455 460	1392
25	ccc aag ctg ttc cag cag tac ccc gag tcc ccc cca ctt atc atc agg Pro Lys Val Phe Gln Gln Tyr Pro Glu Ser Cys Pro Leu Ile Ile Arg 465 470 475 480	1440
	atc cag gtg ctg aac cca cca ttt gtg atg ctg cag aag gac aac ggg Ile Gln Val Leu Asn Pro Pro Ser Val Met Leu Gln Lys Asp Lys Ala 485 490 495	1488
30	ctg gtg aag gtg tgg gcc act ccc gag gtc atg gtc tcc cag ccc aaa Leu Val Lys Val Leu Ala Thr Ala Glu Val Met Val Ser Gln Pro Lys 500 505 510	1536
35	gac ctg gag acc acc atc tgc ctc att gac gtg gac aca gaa ttc ttg Asp Leu Glu Thr Thr Ile Cys Leu Ile Asp Val Asp Thr Gln Phe Leu 515 520 525	1584
40	gcc tca ttt tcc aca gaa gga gar atg atc atg atc gat gcc aag ctg Ala Ser Phe Ser Thr Glu Gly Asp Lys Leu Met Ile Asp Ala Lys Leu 530 535 540	1632
	gac aag acc agc atc aac ctc aga acc tca aac gtg ggc aac ttt gat Glu Lys Thr Ser Leu Asn Leu Arg Thr Ser Asn Val Gly Asn Phe Asp 545 550 555 560	1680
45	att gcc ctc atg gag gtg ctg gtg gag aag att ttc gac ctg gca ttc Ile Gly Leu Met Glu Val Leu Val Gln Lys Ile Phe Asp Leu Ala Phe 565 570 575	1728
50	atg ccc gaa arg aac gct gtg ctg ggt tat ggc gtc cct ctg ccc aaa Met Pro Ala Met Asn Ala Val Leu Gly Ser Gly Val Pro Leu Pro Lys 580 585 590	1776
55	atc ctg aac atc gac ttt agc aat gca gac att gac gtg tgg gag gac Ile Leu Asn Ile Asp Phe Ser Asn Ala Asp Ile Asp Val Leu Glu Asp 595 600 605	1824
60	ctt ttg gtg atg agc cca Leu Leu Val Leu Ser Ala 610	1872



WO 01/79269

- 4 -

PCT/EP01/04170

<210> 2  
 <211> 614  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 2  
 Met Trp Met Ala Trp Cys Val Ala Ala Leu Ser Val Val Ala Val Cys  
 1 5 10 15  
 10 Gly Thr Ser His Glu Thr Asn Thr Val Leu Arg Val Thr Lys Asp Val  
 20 25 30  
 15 Leu Ser Asn Ala Ile Ser Gly Met Leu Glu Gln Ser Asp Ala Leu His  
 35 40 45  
 Ser Ala Leu Arg Glu Val Pro Leu Gly Val Gly Asp Ile Pro Tyr Asn  
 50 55 60  
 20 Asp Phe His Val Arg Gly Pro Pro Pro Val Tyr Thr Asn Gly Lys Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Asp Gly Ile Tyr Gln Tyr Gly His Ile Glu Thr Asn Asp Asn Thr  
 85 90 95  
 25 Ala Gln Leu Gly Gly Lys Tyr Arg Tyr Gly Glu Ile Leu Glu Ser Glu  
 100 105 110  
 30 Gly Ser Ile Arg Asp Leu Arg Asn Ser Gly Tyr Arg Ser Ala Glu Asn  
 115 120 125  
 Ala Tyr Gly Gly His Arg Gly Leu Gly Arg Tyr Arg Ala Ala Pro Val  
 130 135 140  
 35 Gly Arg Leu His Arg Arg Glu Leu Gln Pro Gly Glu Ile Pro Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Val Ala Thr Gly Ala Val Gly Pro Gly Gly Leu Leu Gly Thr Gly Gly  
 165 170 175  
 40 Met Leu Ala Ala Asp Gly Ile Leu Ala Gly Gln Gly Gly Leu Leu Gly  
 180 185 190  
 45 Gly Gly Gly Leu Leu Gly Asp Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Gly Val  
 195 200 205  
 Leu Gly Val Leu Gly Glu Gly Gly Ile Leu Ser Thr Val Gln Gly Ile  
 210 215 220  
 50 Thr Gly Leu Arg Ile Val Glu Leu Thr Leu Pro Arg Val Ser Val Arg  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Pro Gly Val Gly Val Tyr Leu Ser Leu Tyr Thr Arg Val Ala  
 245 250 255  
 55 Ile Asn Gly Lys Ser Leu Ile Gly Phe Leu Asp Val Ala Val Glu Val  
 260 265 270  
 60 Asn Ile Thr Ala Lys Val Arg Leu Thr Met Asp Arg Thr Gly Tyr Pro  
 275 280 285

WO 01/79269

- 5 -

PCT/EP01/04170

Arg Leu Val Ile Glu Arg Cys Asp Thr Leu Leu Gly Gly Ile Lys Val  
 290 295 300  
 Lys Leu Leu Arg Gly Leu Leu Pro Asn Leu Val Asp Asn Leu Val Thr  
 5 305 310 315 320  
 Arg Val Leu Ala Asp Val Leu Pro Asp Leu Leu Cys Pro Ile Val Asp  
 325 330 335  
 10 Val Val Leu Gly Leu Val Asn Asp Gln Leu Gly Leu Val Asp Ser Leu  
 340 345 350  
 Ile Pro Leu Gly Ile Leu Gly Ser Val Gln Tyr Thr Phe Ser Ser Leu  
 355 360 365  
 15 Pro Leu Val Thr Gly Glu Phe Leu Glu Leu Asp Leu Asn Thr Leu Val  
 370 375 380  
 Gly Glu Ala Gly Gly Gly Leu Ile Asp Tyr Pro Leu Gly Trp Pro Ala  
 20 385 390 395 400  
 Val Ser Pro Lys Pro Met Pro Glu Leu Pro Pro Met Gly Asp Asn Thr  
 405 410 415  
 25 Lys Ser Gln Leu Ala Met Ser Ala Asn Phe Leu Gly Ser Val Leu Thr  
 420 425 430  
 Leu Leu Gln Lys Gln His Ala Leu Asp Leu Asp Ile Thr Asn Gly Met  
 435 440 445  
 30 Phe Glu Glu Leu Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Leu Gly Ala Leu Ile  
 450 455 460  
 Pro Lys Val Phe Gln Gln Tyr Pro Glu Ser Cys Pro Leu Ile Ile Arg  
 35 465 470 475 480  
 Ile Gln Val Leu Asn Pro Pro Ser Val Met Leu Gln Lys Asp Lys Ala  
 485 490 495  
 40 Leu Val Lys Val Leu Ala Thr Ala Glu Val Met Val Ser Gln Pro Lys  
 500 505 510  
 Asp Leu Glu Thr Thr Ile Cys Leu Ile Asp Val Asp Thr Gln Phe Leu  
 515 520 525  
 45 Ala Ser Phe Ser Thr Glu Gly Asp Lys Leu Met Ile Asn Ala Lys Leu  
 530 535 540  
 Glu Lys Thr Ser Leu Asn Leu Arg Thr Ser Asn Val Gly Asn Phe Asp  
 50 545 550 555 560  
 Ile Gly Leu Met Glu Val Leu Val Glu Lys Ile Phe Asp Leu Ala Phe  
 565 570 575  
 55 Met Pro Ala Met Asn Ala Val Leu Gly Ser Gly Val Pro Leu Pro Lys  
 580 585 590  
 Ile Leu Asn Ile Asp Phe Ser Asn Ala Asp Ile Asp Val Leu Glu Asp  
 595 600 605  
 60 Leu Leu Val Leu Ser Ala

WO 01/79269

- 6 -

PCT/EP01/04170

610

5 <210> 3  
 <211> 1914  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1914)  
 <400> 3  
 15 atg tgg atg ggc tgg tgg ggc ggt ggg atg tct gtc atg ggt gtc tgt 48  
 Met Trp Met Ala Trp Cys Val Ala Ala Leu Ser Val Val Ala Val Cys  
 1 5 10 15  
 20 ggc acc agc cac gag acc aac aag gtc ctc aag atg aag aac gat atg 96  
 Gly Thr Ser His Gln Thr Asn Thr Val Leu Arg Val Thr Lys Asp Val  
 20 25 30  
 25 ttg acc aat ggc att tca ggc atc atg cag caa agt gat gct ctc cac 144  
 Leu Ser Asn Ala Ile Ser Gly Met Leu Gln Gln Ser Asn Ala Leu His  
 35 40 45  
 30 tgg gcc atg aga gag ggc ccc atg ggt aac gcc ggt ggt gat ggt ggt 192  
 Ser Ala Leu Arg Gln Val Pro Leu Gly Lys Ala Arg Gly Asp Gly Gly  
 50 55 60  
 35 gag cct ctc atg ggc ggt atg ctc ggt gga agt gga agt gga ggt ggt 240  
 Gly Pro Leu Leu Gly Gly Leu Leu Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly  
 65 70 75 80  
 40 gtt ggt gat att gcc tac aat gac ttc cct gtc cag gga ccc ccc cca 288  
 Val Gly Asp Ile Pro Tyr Asn Asp Phe Phe Val Arg Gly Ser Pro Pro  
 85 90 95  
 45 gta tat acc aac gtc aaa aaa ctt aat gat att tac cag tat ggt cac 336  
 Val Tyr Thr Asn Gly Lys Lys Leu Asp Gly Ile Tyr Gln Tyr Gly His  
 100 105 110  
 att gag acc aac gac aac aat gct cag atg ggg gcc aac tac cga tat 384  
 Ile Gln Thr Asn Asp Asn Thr Ala Gln Leu Gly Gly Lys Tyr Arg Tyr  
 115 120 125  
 50 ggt gag atc ctt gag tcc gag gga agc atc aag gac ctc cca aac agt 432  
 Gly Gln Ile Leu Gln Ser Gln Gly Ser Thr Arg Asn Leu Arg Asn Ser  
 130 135 140  
 55 ggc tat ctc agt gcc gag aat gaa tat gga gcc cac aag gcc ctc ggc 480  
 Gly Tyr Arg Ser Ala Gln Asn Ala Tyr Gly Gly His Arg Gly Leu Gly  
 145 150 155 160  
 60 cga tac agg gaa gaa cct gag gcc agt ctc ccc gga cga gag atg cag 528  
 Arg Tyr Arg Ala Ala Pro Val Gly Arg Leu His Arg Arg Gln Leu Gln  
 165 170 175  
 cct gga gaa atc cca cct gga att gcc cct ggc gcc gtc gcc cca ggt 576  
 Pro Gly Gln Ile Pro Pro Gly Val Ala Thr Gly Ala Val Gly Pro Gly  
 180 185 190

WO 01/79269		- 7 -		PCT/EP01/04170	
	ggg ttg ctg ggc act gga ggc atg ctg gca gct gat ggc atc ctc gca	624			
	Gly Leu Leu Gly Thr Gly Gly Met Leu Ala Ala Asp Gly Ile Leu Ala				
	194 300 205				
5	ggc caa ggt ggc ctg ctg ggc gga ggt ggt ctg ctt ggt gat gga gga	672			
	Gly Gln Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Gly Leu Leu Gly Asp Gly Gly				
	210 215 220				
10	ctt ctt gga gga ggg ggt gtc ctg ggc ctg ctg ggc gaa ggt ggc atc	720			
	Leu Leu Gly Gly Gly Gly Val Leu Gly Val Leu Gly Gln Gly Gly Ile				
	225 230 235 240				
15	ctc agc act gtc caa ggc atc acg ggg ctg cgt atc gtc gaa ctg acc	768			
	Leu Ser Thr Val Gln Gly Ile Thr Gly Leu Arg Ile Val Gln Leu Thr				
	245 250 255				
20	ctc cct cgg atg tcc gtc ggc ctg ctg ccc ggc gtc ggt gtc tac ctg	816			
	Leu Pro Arg Val Ser Val Arg Leu Leu Pro Gly Val Gly Val Tyr Leu				
	260 265 270				
	agg tta tac acc ggt gtc ggc atc aac gga aag agt ctt att ggc ttc	864			
	Ser Leu Tyr Thr Arg Val Ala Ile Asn Gly Lys Ser Leu Ile Gly Phe				
	275 280 285				
35	ctg gac ctg gca gta gaa gtc acc atc acc ggc aag ctg cgg ctg acc	912			
	Leu Arg Ile Ala Val Gln Val Asn Ile Thr Ala Lys Val Arg Leu Thr				
	290 295 300				
30	atg gac cgc aag ggt tac cct cgg ctg gtc att gaa gaa tat gac acc	960			
	Met Asp Arg Thr Gly Tyr Pro Arg Leu Val Ile Gln Arg Cys Asp Thr				
	305 310 315 320				
35	ctc cta ggc ggc atc aca ctg aag ctg ctg cgc ggc ctc ctc acc aat	1008			
	Leu Leu Gly Gly Ile Lys Val Cys Leu Leu Arg Gly Leu Leu Pro Asn				
	325 330 335				
40	ctc gtc aac aat tta gtc aac cga gtc ctg ggc ggc gtc ctg cct gac	1056			
	Leu Val Asp Asn Leu Val Asn Arg Val Leu Ala Asp Val Leu Pro Asp				
	340 345 350				
	ttg ctg tac ccc atc gtc ggt gtc gtc gtc gtc ctt gtc aat gac gac	1104			
	Leu Leu Cys Pro Ile Val Asp Val Val Leu Gly Leu Val Asn Asp Gln				
	355 360 365				
45	ctg ggc ctg gtc gat tct ctg atc cct cgc ggc aac arg gga agt gtc	1152			
	Leu Gly Leu Val Asp Ser Leu Thr Pro Leu Gly Ile Leu Gly Ser Val				
	370 375 380				
50	caa tac aac ttc tcc aga ctg cgc ctg gtc gtc aac gga gaa ttc ctg gac	1200			
	Gln Tyr Thr Phe Ser Ser Leu Pro Leu Val Thr Gly Gln Phe Leu Gln				
	385 390 395 400				
55	ctg gac ctg aac acg ctg gtc ggc gaa gct gga gga gga ctg ctg gac	1248			
	Leu Asp Leu Asn Thr Leu Val Gly Gln Ala Gly Gly Gly Leu Ile Asp				
	405 410 415				
60	tac cca ttg ggc tgg caa gct gtc tct ccc aag cgc atg cca gac ctg	1296			
	Tyr Pro Leu Gly Trp Pro Ala Val Ser Pro Lys Pro Met Pro Gln Leu				
	420 425 430				

WO 01/79269		- 8 -		PCT/EP01/04170	
	ccr ccc atg ggt gac aac acc aag tcc cag ctg gct atg tct gcc aac	1344			
	Pro Pro Met Gly Asp Asn Thr Lys Ser Gln Leu Ala Met Ser Ala Asn				
	435 440 445				
5	tcc ctg gcc tca gtg ctg act cta ctg cag aag cag cat gct cta gac	1392			
	Phe Leu Gly Ser Val Leu Thr Leu Leu Gln Lys Gln His Ala Leu Asp				
	450 455 460				
10	ctg gat atc acc aat gcc atg tcc gaa gag ttt cct cca att acc aca	1440			
	Leu Asp Ile Thr Asn Gly Met Phe Gln Gln Leu Pro Pro Leu Thr Thr				
	465 470 475 480				
	gcc acc ctg gga gcc ctg atc ccc aag gtg ttc cag cag tac ccc gag	1488			
15	Ala Thr Leu Gly Ala Leu Ile Pro Lys Val Phe Gln Gln Tyr Pro Gln				
	485 490 495				
	tcc tgc cca ctt atc acc agg atc cag ctg ctg aac cca cca tct gtg	1536			
	Ser Cys Pro Leu Ile Ile Arg Ile Gln Val Leu Asn Pro Phe Ser Val				
	500 505 510				
20	atg ctg cag aag gcc aaa gcc ctg gtg aag tta ttc gcc act gcc gag	1584			
	Met Leu Gln Lys Asp Lys Ala Leu Val Lys Val Leu Ala Thr Ala Gln				
	515 520 525				
25	gtc atg ctg tcc cag ccc aac gcc ctg gag act acc atc tgc ctg att	1632			
	Val Met Val Ser Gln Pro Lys Asp Leu Gln Thr Thr Ile Cys Leu Ile				
	530 535 540				
30	gac gtg gcc aca gcc ttc ttg gcc tca ttt tcc aca gaa gga gat aag	1680			
	Asp Val Asp Thr Gln Phe Leu Ala Ser Phe Ser Thr Gln Gly Asp Lys				
	545 550 555 560				
	ctc atg att gat gcc aag ctg gag aag acc agc ctc aac ctg aga acc	1728			
35	Leu Met Ile Asp Ala Lys Leu Gln Lys Thr Ser Leu Asn Leu Arg Thr				
	565 570 575				
	tca aac gtg gga aac ttc gat cct gcc ctg atg gag gtc ctg ttc gag	1776			
	Ser Asn Val Gly Asn Phe Asp Ile Gly Leu Met Gln Val Leu Val Gln				
	580 585 590				
40	aag att ttt gac ctg gcc ttc atg acc gaa atg aac gcc gtg ctg gat	1824			
	Lys Ile Phe Asp Leu Ala Phe Met Pro Ala Met Asn Ala Val Leu Gly				
	595 600 605				
45	tct gcc gtc cct ctg ccc aac atc ccc aac atc gcc ttt agc aat gca	1872			
	Ser Gly Val Pro Leu Pro Cys Ile Leu Asn Ile Asp Phe Ser Asn Ala				
	610 615 620				
50	gac atc gcc gtc ttc gag gcc att ttc gtc ctg agc gcc tga	1914			
	Asp Ile Asp Val Lys Gln Asp Leu Leu Val Leu Ser Ala				
	625 630 635				
55	<210> 4				
	<211> 637				
	<212> FRT				
	<213> Homo sapiens				
60	<400> 4				
	Met Trp Met Ala Trp Cys Val Ala Ala Leu Ser Val Val Ala Val Cys				
	1 5 10 15				

WO 01/79269

- 9 -

PCT/EP01/04170

Gly Thr Ser His Glu Thr Asn Thr Val Leu Arg Val Thr Lys Asp Val  
 20  
 Leu Ser Asn Ala Ile Ser Gly Met Leu Gln Gln Ser Asp Ala Leu His  
 35  
 5 Ser Ala Leu Arg Glu Val Pro Leu Gly Lys Ala Arg Gly Asp Gly Gly  
 50  
 Gly Pro Leu Leu Gly Gly Leu Leu Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly  
 65  
 Val Gly Asp Ile Pro Tyr Asn Asp Phe His Val Arg Gly Pro Pro Pro  
 80  
 10 Val Tyr Thr Asn Gly Lys Lys Leu Asp Gly Ile Tyr Gln Tyr Gly His  
 95  
 Ile Glu Thr Asn Asp Asn Thr Ala Gln Leu Gly Gly Lys Tyr Arg Tyr  
 110  
 15 Gly Glu Ile Leu Glu Ser Gly Gly Ser Ile Arg Asp Leu Arg Asn Ser  
 125  
 Gly Tyr Arg Ser Ala Glu Asn Ala Tyr Gly Gly His Arg Gly Leu Gly  
 140  
 Arg Tyr Arg Ala Ala Pro Val Gly Arg Leu His Arg Arg Gly Leu Gln  
 155  
 20 Pro Gly Glu Ile Pro Pro Gly Val Ala Thr Gly Ala Val Gly Pro Gly  
 170  
 Gly Leu Leu Gly Thr Gly Gly Met Leu Ala Ala Asp Gly Ile Leu Ala  
 185  
 25 Gly Gln Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Gly Leu Leu Gly Asp Gly Gly  
 200  
 Leu Leu Gly Gly Gly Gly Gly Val Leu Gly Glu Gly Gly Ile  
 215  
 30 Leu Ser Thr Val Gln Gly Ile Thr Gly Leu Arg Ile Val Glu Leu Thr  
 230  
 Leu Pro Arg Val Ser Val Arg Leu Leu Pro Gly Val Gly Val Tyr Leu  
 245  
 Ser Leu Tyr Thr Arg Val Ala Ile Asn Gly Lys Ser Leu Ile Gly Phe  
 260  
 35 Leu Asp Ile Ala Val Glu Val Asn Ile Thr Ala Lys Val Arg Leu Thr  
 275  
 Met Asp Arg Thr Gly Tyr Pro Arg Leu Val Ile Glu Arg Gys Asp Thr  
 290  
 Leu Leu Gly Gly Ile Cys Val Lys Leu Leu Arg Gly Leu Leu Pro Asn  
 305  
 40 Leu Val Asp Asn Leu Val Asn Arg Val Leu Ala Asp Val Leu Pro Asp  
 320  
 Leu Leu Cys Pro Ile Val Asp Val Val Leu Gly Leu Val Asn Asp Gln  
 335  
 45 Leu Gly Leu Val Asp Ser Leu Ile Pro Leu Gly Ile Leu Gly Ser Val  
 350  
 Gln Tyr Thr Phe Ser Ser Leu Pro Leu Val Thr Gly Glu Phe Leu Glu  
 365  
 Leu Asp Leu Asn Thr Leu Val Gly Glu Ala Gly Gly Gly Leu Ile Asp  
 380  
 50 Tyr Pro Leu Gly Trp Pro Ala Val Ser Pro Lys Pro Met Pro Gly Leu  
 395  
 Pro Pro Met Gly Asp Asn Thr Lys Ser Gln Leu Ala Met Ser Ala Asn  
 410  
 55 Phe Leu Gly Ser Val Leu Thr Leu Leu Gln Lys Gln His Ala Leu Asp  
 425  
 Leu Asp Ile Thr Asn Gly Met Phe Glu Glu Leu Pro Pro Leu Thr Thr  
 440  
 Ala Thr Leu Gly Ala Leu Ile Pro Lys Val Phe Gln Gln Tyr Pro Glu  
 455  
 60 Ser Cys Pro Leu Ile Ile Arg Ile Gln Val Leu Asn Pro Pro Ser Val  
 470

WO 01/79269

- 10 -

PCT/EP01/04170

500 505 510  
 Met Leu Gln Lys Asp Lys Ala Leu Val Lys Val Leu Ala Thr Ala Glu  
 515 520 525  
 Val Met Val Ser Gln Pro Lys Asp Leu Glu Thr Thr Ile Cys Leu Ile  
 530 535 540  
 5 Asp Val Asp Thr Glu Phe Leu Ala Ser Phe Ser Thr Glu Gly Asp Lys  
 545 550 555 560  
 Leu Met Ile Asp Ala Lys Leu Glu Lys Thr Ser Leu Asn Leu Arg Thr  
 565 570 575  
 10 Ser Asn Val Gly Asn Phe Asp Ile Gly Leu Met Glu Val Leu Val Glu  
 580 585 590  
 Lys Ile Phe Asp Leu Ala Phe Met Pro Ala Met Asn Ala Val Leu Gly  
 595 600 605  
 Ser Gly Val Pro Leu Pro Lys Ile Leu Asn Ile Asp Phe Ser Asn Ala  
 610 615 620  
 15 Asp Ile Asp Val Leu Glu Asp Leu Leu Val Leu Ser Ala  
 625 630 635

20

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
25 October 2001 (25.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 01/79269 A3**(51) International Patent Classification: C12N 15/12,  
C07K 14/47, C12N 15/62, C07K 16/18, G01N 33/50,  
33/68, C12Q 1/68(DE/DE): Asterweg 3, 70771 Leinfelden (DE);  
DUCKER, Klaus (DE/DE); Euesterstrasse 5, 64291  
Darmstadt (DE).

(21) International Application Number: PCT/EP01/04170

(74) Common Representative: MERCK PATENT GMBH;  
Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(22) International Filing Date: 11 April 2001 (11.04.2001)

(81) Designated States (national): CA, JP, US.

(25) Filing Language: English

(84) Designated States (regional): European patent (AT, BE,  
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC,  
NL, PT, SE, TR).

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 18 April 2000 (18.04.2000) EP  
00107995.3  
Published:  
— with international search report(71) Applicant (for all designated States except US): MERCK  
PATENT GMBH (DE/DE); Frankfurter Strasse 250,  
64293 Darmstadt (DE).(88) Date of publication of the international search report:  
7 March 2002

(72) Inventor: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GRELL, Matthias

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

WO 01/79269 A3

(54) Title: LIPID BINDING PROTEIN 4

(57) Abstract: Lipid Binding Protein 4 polypeptides and polynucleotides and methods for producing such polypeptides by recom-  
binant techniques are disclosed. Also disclosed are methods for utilizing Lipid Binding Protein 4 polypeptides and polynucleotides  
in diagnostic assays.



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/04170
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12N15/62 C07K16/18 G01N33/50 G01N33/68 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC:		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic database consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim for:
X	DEAR T.N. ET AL.: "Novel genes for potential ligand-binding proteins in subregions of the olfactory mucosa" THE EMBO JOURNAL, vol. 10, no. 10, 1991, pages 2813-2819, XP002181718 page 2816; figure 3	1, 4, 10
X	DATABASE EMBL "Online!" ID: H5167217; Accession number: H65167, 20 October 1995 (1995-10-20) "yu64g01.r1 Weizmann olfactory epithelium Homo sapiens cDNA clone IMAGE:238608 5' similar to SP:S17447 S17447 PROBABLE LIGAND-BINDING PROTEIN RY2G5 - ; mRNA sequence " XP002181719 abstract	4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input 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 doubt on priority claims or which is used to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document relating 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
1 November 2001		19/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentpark 2 MIL - 20180 HV (Italy) Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 opp nl Fax: (+31-70) 340-3015		Authorized officer Macchia, G

Form PCT/ISA/210 (Second sheet) July 1999

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/775	C 0 7 K 14/775	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02 C	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00 A	
// A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	

(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 グレル、 マティアス

ドイツ連邦共和国 7 0 7 7 1 ラインフェルデン アステルンヴェーク 3

(72)発明者 デュエッケル、 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 エッテステルシュトラッセ 5

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB01 FB03

4B024 AA01 AA11 BA61 BA65 CA04 DA01 DA02 DA05 DA11 HA08  
HA11

4B063 QA18 QQ53 QR48 QR77 QS33

4B064 AG01 AG26 CA02 CA05 CA10 CA11 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y AB01 AB02 CA24 CA44 CA46

4C084 AA16 NA14 ZA362 ZA452 ZC202 ZC412

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 BA41 CA40 DA75 EA20 EA50

FA74