

(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2004-514435

(P2004-514435A)

(43) 公表日 平成16年5月20日(2004.5.20)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A O 1 K 67/033	A O 1 K 67/033	5 O 1 4 B O 6 3
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 4
A 6 1 K 35/66	A 6 1 K 35/66	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 203 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-545160 (P2002-545160)	(71) 出願人	502250581
(86) (22) 出願日	平成13年11月23日 (2001.11.23)		デヴェロゲン アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月23日 (2003.5.23)		フュア エントヴィックルングスビオロ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/013663		ーギッシェ フォルシュング
(87) 国際公開番号	W02002/042455		ドイツ連邦共和国 ゲッティンゲン ルド
(87) 国際公開日	平成14年5月30日 (2002.5.30)		ルフーヴィッセル＝シュトラッセ 28
(31) 優先権主張番号	00125693.2	(74) 代理人	100061815
(32) 優先日	平成12年11月23日 (2000.11.23)		弁理士 矢野 敏雄
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100094798
			弁理士 山崎 利臣
		(74) 代理人	100099483
			弁理士 久野 琢也
		(74) 代理人	100114890
			弁理士 アインゼル・フェリックス＝ライ
			ンハルト
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体代謝の修飾

(57) 【要約】

本発明は、細胞小器官の膜安定性および／または機能に關与するポリペプチドをコードする核酸分子において、前記核酸分子が

(a) 本発明において開示したアミノ酸配列をコードする核酸分子の相補鎖と、定められた条件下でハイブリダイズし；(b) 本発明で定義された核酸分子の相補鎖と、定められた条件下でハイブリダイズし；(c) (a) の核酸分子に対して縮重し；(d) 細胞小器官の膜安定性および／または機能に關与するポリペプチドの一部分であり、かつ推定される膜貫通ドメイン領域を含有する、少なくとも1つの、有利には少なくとも2つの、より有利には少なくとも3つの、特に有利には少なくとも4つの、非常に有利には少なくとも5つの、および最も有利には少なくとも6つのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし、(e) 前記ポリペプチドを示すアミノ酸配列と、少なくとも85%、有利には少なくとも90%、より有利には少なくとも95%、特に有利には少なくとも98%、および99.6%まで相同なポリペプチドをコードし；(g) 本発明によって開示されたアミノ酸配列と、少なくとも35%、有利に少なくとも50%、より有利に少なくとも60%、特に有利に少なくとも70%、非常に有利に少なくとも80%、特に有利に少なくとも90%、さらに有利に少なくとも95%、および最も有利に少なくとも99%相同なポリペプチドをコードし；(h) 突然変異により(a)～(g)の核酸分子と異なり、この際、前記突然変異は、コードされるポリペプチドの変化、欠失、重複または未熟終結を起こすか；あるいは(i) 本発明で開示された配列を有することを特徴とする、細胞小器官の膜安定性および／または機能に關与するポリペプチドをコードする核酸分子。

10

20

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞小器官の膜安定性および／または機能に關与するポリペプチドをコードする核酸分子において、前記核酸分子が

(a) $0.2 \times \text{SSC}$ および 0.1% SDS を含有する溶液中、 65°C で、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14 および／または SEQ ID NO: 52 のアミノ酸配列をコードする核酸分子および／またはその相補鎖とハイブリダイズし；

(b) $0.2 \times \text{SSC}$ および 0.1% SDS を含有する溶液中、 65°C で、SEQ ID NO: 6、7 または 53、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13 および／または SEQ ID NO: 51 のアミノ酸配列をコードする核酸分子および／またはその相補鎖とハイブリダイズし；

(c) (a) または (b) の核酸分子と縮重し；

(d) SEQ ID NO: 15 ~ 50、61 および 62 に記載される少なくとも 1 つの、有利には少なくとも 2 つの、より有利には少なくとも 3 つの、特に有利には少なくとも 4 つの、非常に有利には少なくとも 5 つの、および最も有利には少なくとも 6 つのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし、

(e) SEQ ID NO: 8 と少なくとも 85% 、有利には少なくとも 90% 、より有利には少なくとも 95% 、特に有利には少なくとも 98% 、および 99.6% まで相同なポリペプチドをコードし、

(f) SEQ ID NO: 54 と少なくとも 90% 、有利には少なくとも 95% 、より有利には少なくとも 98% 、および 99.6% まで相同なポリペプチドをコードし、

(g) SEQ ID NO: 10、12、14 または 52 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と、少なくとも 35% 、有利に少なくとも 50% 、より有利に少なくとも 60% 、特に有利に少なくとも 70% 、非常に有利に少なくとも 80% 、特に有利に少なくとも 90% 、さらに有利に少なくとも 95% 、および最も有利に少なくとも 99% 相同なポリペプチドをコードし、

(h) 突然変異により (a) ~ (g) の核酸分子と異なり、この際、前記突然変異は、コードされるポリペプチドの変化、欠失、重複または未熟終結を起こし、

(i) SEQ ID NO: 9、11、13 または 51 に記載される配列を有することを特徴とする、細胞小器官の膜安定性および／または機能に關与するポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 2】

DNA であることを特徴とする、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

細胞小器官の膜安定性および／または機能に寄与する前記ポリペプチドが、ミトコンドリアおよび／またはペルオキシソーム中で発現されることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが、前記膜の維持に關与していることを特徴とする、請求項 3 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

細胞小器官の膜安定性および／または機能に寄与する前記ポリペプチドが、輸送体分子および／または輸送体分子の制御因子であることを特徴とする、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記ポリペプチドが変性ポリペプチドであることを特徴とする、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 7】

前記変性ポリペプチドがミトコンドリアタンパク質の修飾因子であることを特徴とする、

請求項 6 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記ミトコンドリアタンパク質が U C P ファミリーのメンバーであることを特徴とする、請求項 7 に記載の核酸分子。

【請求項 9】

U C P ファミリーの前記メンバーが、U C P 1、U C P 2、U C P 3、U C P 4、U C P 5、S t U C P または A t U C P であることを特徴とする、請求項 8 に記載の核酸分子。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の核酸分子を含むことを特徴とする、ベクター。

10

【請求項 11】

請求項 10 に記載のベクターで形質転換されていることを特徴とする、非ヒト宿主有機体。

【請求項 12】

好適な条件下で請求項 11 に記載の宿主細胞を培養し、産生されるポリペプチドを単離することを特徴とする、ポリペプチドの製造方法。

【請求項 13】

請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の核酸分子でコードされているかまたは請求項 12 に記載の方法で製造されることを特徴とする、ポリペプチド。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のポリペプチドを含むことを特徴とする融合タンパク質またはそのフラグメント。

20

【請求項 15】

前記した融合タンパク質のフラグメントが、S E Q I D N O : 15 ~ 50 のいずれか 1 つに記載される少なくとも 1 つ、有利には少なくとも 2 つ、より有利には少なくとも 3 つ、さらに有利には少なくとも 4 つ、特に有利には少なくとも 5 つ、最も有利には 6 つのアミノ酸配列を含有することを特徴とする、請求項 14 に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の核酸分子または請求項 13 に記載のポリペプチドまたは請求項 14 または 15 に記載の融合タンパク質を特異的に認識することを特徴とする、抗体、そのフラグメントまたは誘導体あるいはアプタマーまたは別のレセプター。

30

【請求項 17】

請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の核酸分子のアンチセンスオリゴヌクレオチド、ハイブリダイゼーションプローブまたは増幅プライマー。

【請求項 18】

請求項 13 に記載のポリペプチドまたは請求項 14 に記載の融合タンパク質を発現し、請求項 10 に記載のベクターで形質転換し、または請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の核酸分子を含むことを特徴とする、非ヒト動物。

【請求項 19】

請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の核酸、またはそのホモログ、パラログまたはオルトログがサイレント突然変異体および / または突然変異体であることを特徴とする、非ヒト動物。

40

【請求項 20】

マウス、ラット、ヒツジ、ハムスター、ブタ、イヌ、サル、ウサギ、子ウシ、ウマ、線形動物、ハエおよびカナから成る群より選択されることを特徴とする、請求項 18 または 19 に記載の非ヒト動物。

【請求項 21】

請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の核酸分子、請求項 10 に記載のベクター、請求項 11 に記載の宿主、請求項 13 に記載のポリペプチド、請求項 14 または 15 に記載

50

の融合タンパク質、請求項 16 に記載の抗体、そのフラグメントまたは誘導体またはアプタマーまたは別のレセプターまたは請求項 17 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、ハイブリダイゼーションプローブまたは増幅プライマーの、遺伝子および/または請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載のポリペプチドで変性および/または修飾されている遺伝子産物の働きをモニターしかつ/または調節するための、使用。

【請求項 22】

前記遺伝子および/または遺伝子産物が、細胞小器官中で発現される遺伝子および/または遺伝子産物であることを特徴とする、請求項 22 に記載の使用。

【請求項 23】

前記細胞小器官がミトコンドリアまたはペルオキシソームであることを特徴とする、請求項 22 に記載の使用。 10

【請求項 24】

前記遺伝子および/または遺伝子産物が UCP ファミリーのメンバーであることを特徴とする、請求項 21 から 23 までのいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 25】

請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の核酸分子、請求項 10 に記載のベクター、請求項 11 に記載の宿主、請求項 13 に記載のポリペプチド、請求項 14 または 15 に記載の融合タンパク質、請求項 16 に記載の抗体、そのフラグメントまたは誘導体またはアプタマーまたは別のレセプター、または請求項 17 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、ハイブリダイゼーションプローブまたは増幅プライマーを含有することを特徴とする組成物。 20

【請求項 26】

診断用組成物であることを特徴とする、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

製薬学的組成物であることを特徴とする、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 28】

細胞、細胞マス、器官および/または被験者の障害を検出および/または確認するための、請求項 25 または 26 に記載の組成物の使用。

【請求項 29】

細胞、細胞マス、器官および/または被験者の障害の治療、緩和および/または予防のための、請求項 25 または 27 に記載の組成物の使用。 30

【請求項 30】

前記障害が、代謝障害またはミトコンドリア障害であることを特徴とする、請求項 28 または 29 に記載の使用。

【請求項 31】

前記代謝障害が、肥満、脂肪過多症、摂食障害（過食症、拒食症）、カヘキシー（衰弱）、脾臓の機能不全および/または ROS 産生に関する障害から選択されることを特徴とする、請求項 30 に記載の使用。

【請求項 32】

請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の核酸分子、請求項 10 に記載のベクター、請求項 11 に記載の宿主、請求項 13 に記載のポリペプチド、請求項 14 または 15 に記載の融合タンパク質、請求項 16 に記載の抗体、そのフラグメントまたは誘導体またはアプタマーまたは別のレセプターまたは請求項 17 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、ハイブリダイゼーションプローブまたは増幅プライマーの、請求項 13 に記載のポリペプチドと相互作用できる物質を同定するための、使用。 40

【請求項 33】

前記ポリペプチドと相互作用できる前記物質が、アンタゴニストまたはアゴニストであることを特徴とする、請求項 32 に記載の使用。

【請求項 34】

動物の細胞代謝に関与するかまたはホメオスタシスを変化させることのできるポリペプチ 50

ドまたは物質を同定する方法が、以下のステップ：

(a) 収集されたポリペプチドまたは物質が、請求項 1 3 に記載のポリペプチドまたはそのフラグメントまたは請求項 1 4 または 1 5 に記載の融合タンパク質またはその (a) フラグメントと相互作用するかを、読み取り系を使用して試験し；

(b) ステップ (a) で相互作用が陽性であったポリペプチドまたは物質を同定するを含むことを特徴とする、ポリペプチドまたは物質を同定する方法。

【請求項 3 5】

動物の細胞代謝に関与するかまたはホメオスタシスを変化させることのできるポリペプチドまたは物質を同定する方法が、以下のステップ：

(a) 収集されたポリペプチドまたは物質が、請求項 3 4 に記載の方法で同定されたポリペプチドと相互作用するかどうかを試験し；

(b) ステップ (a) で相互作用が陽性であったポリペプチドを同定し；場合により

(c) 同定されたポリペプチドを用いて、ステップ (a) および (b) を 1 回以上反復し、この際、新規に同定されたポリペプチドは、さらに相互作用するポリペプチドを同定するために、以前に同定されたポリペプチドをベイトとして置換するを含むことを特徴とする、ポリペプチドまたは物質を同定する方法。

【請求項 3 6】

1 種以上の相互作用 (ポリ) ペプチドをコードする核酸分子を同定するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 3 4 または 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

ほ乳動物の体重を制御することに関与するポリペプチドの同定方法において、前記方法が以下のステップ：

(a) 収集された (ポリ) ペプチドを、(ポリ) ペプチドの結合可能な条件で、請求項 1 3 に記載のポリペプチドまたはその (a) フラグメントまたは請求項 1 4 または 1 5 に記載の融合タンパク質またはその (a) フラグメントと接触させ；

(b) 請求項 1 3 に記載のポリペプチドまたは請求項 1 4 または 1 5 に記載の融合タンパク質とステップ (a) で結合しなかった (ポリ) ペプチドを、収集されたポリペプチドから除き、および

(c) 請求項 1 3 に記載のポリペプチドまたは請求項 1 4 または 1 5 に記載の融合タンパク質と結合する (ポリ) ペプチドを同定する

を含むことを特徴とする。ほ乳動物の体重を製造することに関与するポリペプチドの同定方法。

【請求項 3 8】

請求項 1 3 に記載の前記ポリペプチドまたは請求項 1 4 または 1 5 に記載の前記融合タンパク質が、固体支持体へ固定されていることを特徴とする、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記固体支持体が、ゲル濾過クロマトグラフィーまたはアフィニティークロマトグラフィーの支持体であることを特徴とする、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

ステップ (c) での同定の前に、前記結合 (ポリ) ペプチドを解離させることを特徴とする、請求項 3 7 から 3 9 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記解離が、溶離により実施されることを特徴とする、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

1 種以上の結合 (ポリ) ペプチドをコードする核酸分子を同定するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 3 7 から 4 1 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の核酸分子の発現に影響を及ぼす化合物の同定法において、前記方法が、以下のステップ：

(a) 請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の核酸分子または請求項 3 6 または 4 2

10

20

30

40

50

に記載の方法により同定され、動作可能に読み取り系へ連結された核酸分子を含む発現ベクターを有する宿主を、化合物または化合物混合物と接触させ；

(b) 前記接触の結果が、前記読み取り系によって起こるシグナル強度を変化させるかどうかを分析し、場合により

(c) ステップ(b)においてシグナルの変化を誘導する化合物を化合物混合物から同定する

(ここでは、シグナル強度の前記変化は、前記核酸分子の発現の変化に相関する)

を含むことを特徴とする、請求項1から9までのいずれか1項に記載の核酸分子の発現に影響を及ぼす化合物の同定法。

【請求項44】

請求項13に記載のポリペプチドの活性に影響を及ぼす化合物を同定する方法において、前記方法が、以下のステップ：

(a) 効果的に読み取り系と連結する、請求項1から9までのいずれか1項に記載の核酸分子を含みかつ/または読み取り系と連結する本発明の(ポリ)ペプチドを有する発現ベクターを有する宿主を、化合物または化合物混合物と接触させ、

(b) 前記接触の結果、読み取り系によって起こるシグナル強度の変化があるかどうかを分析し；場合により

(c) ステップ(b)でシグナル変化を誘導する化合物を化合物混合物から同定する(ここでは、前記シグナル変化が前記(ポリ)ペプチドの活性変化に相関することを特徴とする)

を含むことを特徴とする、請求項13に記載のポリペプチドの活性に影響を及ぼす化合物を同定する方法。

【請求項45】

前記宿主が、真核宿主細胞であることを特徴とする、請求項43または44に記載の方法。

【請求項46】

真核宿主細胞がほ乳動物宿主細胞であることを特徴とする、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記宿主がバクテリアまたは酵母であることを特徴とする、請求項43または44に記載の方法。

【請求項48】

前記シグナル強度の変化がシグナル強度の上昇であることを特徴とする、請求項43から47までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項49】

前記シグナル強度の変化が、シグナル強度の低下であることを特徴とする、請求項43から47までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項50】

請求項13に記載の1種以上のポリペプチドまたは請求項14または15に記載の1種以上の融合タンパク質の動物での発現のインパクトを評価する方法において、前記方法が以下のステップ：

(a) 請求項1から9までのいずれか1項に記載の核酸分子または請求項36から42項までのいずれか1項に記載の方法で同定された核酸分子を前記動物で過剰発現させ；

(b) 前記動物の体重が増加するか減少するか、代謝変化が誘導されかつ/または摂食挙動が変化するかどうかを測定する

を含むことを特徴とする、発現のインパクトを評価する方法。

【請求項51】

請求項13に記載の1種以上のポリペプチドまたは請求項14または15に記載の1種以上の融合タンパク質の動物中での発現のインパクトを評価する方法において、前記方法が以下のステップ：

(a) 請求項1から9までのいずれか1項に記載の核酸分子または請求項36または42

10

20

30

40

50

に記載の方法で同定された核酸分子を前記動物中で過少発現させ、

(b) 前記動物の体重が増加するかまたは減少するか、代謝変化が誘導されかつ / または接触挙動が変化するかどうかを測定する

を含むことを特徴とする、発現のインパクトを評価する方法。

【請求項 5 2】

請求項 1 3 に記載のポリペプチドと結合標的 / 薬剤の相互作用を変化させる薬剤をスクリーニングする方法において、前記方法が以下のステップ：

(a)

(a a) 請求項 1 3 に記載のポリペプチド、またはそのフラグメントまたは請求項 1 4 または 1 5 に記載の融合タンパク質またはそのフラグメント

10

(a b) 前記 (ポリ) ペプチドまたは融合タンパク質またはそのフラグメントの結合標的 / 薬剤、

(a c) 候補薬剤

を含有する混合物を、前記 (ポリ) ペプチド、融合タンパク質またはそのフラグメントが基準親和性で前記結合標的 / 薬剤と特異的に結合する条件でインキュベートし、

(b) 前記 (ポリ) ペプチド、融合タンパク質またはそのフラグメントと前記結合標的との結合親和性を検出し、(候補) 薬剤の偏向親和性を測定し、

(c) (候補) 薬剤偏向親和性と基準親和性との差を決定する

を含むことを特徴とする、スクリーニング方法。

【請求項 5 3】

20

請求項 4 3 から 4 9 までのいずれか 1 項に記載の方法で同定された化合物または請求項 5 2 に記載の方法で同定された薬剤を精製する方法において、前記方法が以下のステップ

(a) 前記化合物を偽ペプチドでモデリングし、

(b) モデル化合物を化学的に合成する

を含むことを特徴とする、精製法。

【請求項 5 4】

請求項 4 3 から 4 9 までのいずれか 1 項に記載の化合物または請求項 5 2 に記載の方法により同定された薬剤または請求項 5 3 に記載の方法により精製された化合物を製薬学的に使用可能な担体および / または希釈液と配合して含有する組成物を製造する方法。

【請求項 5 5】

30

請求項 4 3 から 4 9 までのいずれか 1 項に記載の方法で同定された化合物または請求項 5 2 に記載の方法で同定された薬剤を含有する組成物を製造する方法において、前記方法が以下のステップ：

(a) 請求項 4 3 から 4 9 までのいずれか 1 項に記載の方法で同定された化合物または請求項 5 2 に記載の薬剤を出発化合物として変性して、

(i) カルボキシル基のエステル化、または

(i i) ヒドロキシル基のカルボン酸によるエステル化、または

(i i i) ヒドロキシル基をエステル化して、例えばホスフェート、ピロホスフェートまたはスルフェートまたはヘミサクシネートとする、または

(i v) 製薬学的に使用可能な塩の形成、または

40

(v) 製薬学的に使用可能な錯体の形成、または

(v i) 製薬学的に活性なポリマーの合成、または

(v i i) 親水性部の導入、または

(v i i i) 芳香族または側鎖上の置換基の導入 / 変換、置換パターンの変更、または

(i x) 等配電子または生物等比体積部の導入による変性、または

(x) 類似化合物の合成、または

(x i) 分枝側鎖の導入、または

(x i i) アルキル置換基の環状類似体への変換、または

(x i i i) ヒドロキシル基のケタール、アセタールへの誘導、または

(x i v) アミド、フェニルカルボメートへの N - アセチル化

50

(x v) マンニツヒ塩基、イミンの合成、または

(x v i) ケトンまたはアルデヒドのシッフの塩基、オキシム、アセタール、ケタール、エノレスター、オキサゾリジン、チアゾリジンへの変性、またはそれらの組合せによる、

(i) 作用部位、活性スペクトル、器官特異性の変性、および / または

(i i) 力価の改善、および / または

(i i i) 毒性の低下 (治療係数の増加)、および / または

(i v) 副作用の減少、および / または

(v) 治療作用の開始、有効期間の変性

(v i) 薬物動態パラメーター (再吸収、分布、代謝および分泌) の変性、および / または 10

(v i i) 物理化学パラメーター (溶解度、吸湿性、色、味、臭い、安定性、状態) の変性、および / または

(v i i i) 一般的特性、器官 / 組織特異性の改善、および / または

(i x) 適用形および適用経路の至適化

を実施し ; かつ

(b) 前記のように変性した生成物を製薬学的に使用可能なキャリアーと配合するを含むことを特徴とする、薬剤を含有する組成物を製造する方法。

【請求項 5 6】

前記組成物が製薬学的組成物であることを特徴とする、請求項 5 4 または 5 5 に記載の方法。 20

【請求項 5 7】

前記組成物が、肥満、脂肪過多症、摂食障害、消耗性症候群 (カヘキシー)、ミトコンドリアの障害、脾臓の機能不全および / または ROS 産生に関する障害を予防、緩和または治療するための製薬学的組成物であることを特徴とする、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

(a) 請求項 1 3 に記載の、または請求項 3 4、3 5 または 3 7 から 4 1 までのいずれか 1 項に記載の方法で同定された、または請求項 5 3 に記載の方法で精製された (ポリ) ペプチドのインヒビター、

(b) 請求項 3 6 から 4 2 までのいずれか 1 項に記載の方法で同定された遺伝子発現に対するインヒビター、および / または 30

(c) 請求項 4 3 または 4 4 に記載の方法で同定された化合物を含むことを特徴とする、組成物。

【請求項 5 9】

(a) 請求項 1 3 に記載の、または請求項 3 4、3 5 または 3 7 から 4 1 までのいずれか 1 項に記載の方法で同定された、または請求項 5 3 に記載の方法で精製された (ポリ) ペプチドの刺激物質、

(b) 請求項 3 6 または 4 2 に記載の方法で同定された遺伝子発現に対する刺激物質、および / または

(c) 請求項 4 3 または 4 4 に記載の方法で同定された化合物 40

を含むことを特徴とする、組成物。

【請求項 6 0】

製薬学的組成物であることを特徴とする、請求項 5 8 または 5 9 に記載の組成物。

【請求項 6 1】

(a) 請求項 3 4、3 5、3 7 から 4 1 または 4 3 から 4 9 までのいずれか 1 項に記載の方法で同定された、または請求項 5 3 に記載の方法で精製された (ポリ) ペプチドのインヒビター ;

(b) 請求項 3 6 または 4 2 に記載の方法で同定された遺伝子の発現に対するインヒビター ; および / または

(c) 請求項 4 9 に記載の方法で同定された化合物 50

の、肥満、脂肪過多症、摂食障害、消耗性症候群（カヘキシー）、ミトコンドリアの障害、膵臓の機能不全および／またはROS産生に関する障害を治療するための製薬学的組成物を製造するための使用。

【請求項62】

(a) 請求項34、35、37から41または43から49までのいずれか1項に記載の方法で同定された、または請求項53に記載の方法で精製された（ポリ）ペプチドの刺激物質；

(b) 請求項36または42に記載の方法で同定された遺伝子の発現に対する刺激物質；および／または

(c) 請求項48に記載の方法で同定された化合物

10

の、肥満、脂肪過多症、摂食障害、消耗性症候群（カヘキシー）、ミトコンドリアの障害、膵臓の機能不全および／またはROS産生に関する障害を治療するための製薬学的組成物を製造するための使用。

【請求項63】

肥満、脂肪過多症、摂食障害、消耗性症候群（カヘキシー）、ミトコンドリアの障害、膵臓の機能不全および／またはROS産生に関する障害を治療、緩和および／または予防するための製薬学的組成物を製造するための、請求項52に記載の方法により同定された薬剤の使用。

【請求項64】

SEQ ID NO: 3または4に記載の核酸分子またはそのフラグメントの、SEQ ID NO: 3または4またはそのフラグメントによりコードされた遺伝子産物を過剰または過少発現する非ヒト動物の製造のための使用。

20

【請求項65】

前記非ヒト動物が、ショウジョウバエまたはマウスであることを特徴とする、請求項64に記載の使用。

【請求項66】

請求項64に記載の非ヒト動物、例えば請求項65に記載のショウジョウバエまたはマウスの、細胞小器官の膜安定性および／または機能に寄与することができ、ミトコンドリアタンパク質を修飾することができ、および／または細胞代謝に影響を及ぼすことのできるポリペプチドを検出するための、使用。

30

【請求項67】

少なくとも

(a) 請求項1から9までのいずれか1項に記載の核酸分子

(b) 請求項10に記載のベクター

(c) 請求項11に記載の宿主

(d) 請求項13に記載のポリペプチド

(e) 請求項14または15に記載の融合タンパク質

(f) 請求項16に記載の抗体またはそのフラグメントまたは誘導体または抗血清、アプタマーまたは別のレセプター；および

(g) 請求項17に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、ハイブリダイゼーションプロブまたは増幅プライマー

40

の1つを含有することを特徴とする、キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、細胞小器官の膜安定性および／または機能に寄与するポリペプチドをコードする核酸分子に関し、前記核酸分子は、(a) 所定のストリンジェントな条件下で、ここに開示したアミノ酸配列をコードする核酸分子の相補鎖にハイブリタイズし；(b) 所定の条件下で、ここに開示した核酸分子の相補鎖にハイブリタイズし；(c) 核酸分子(a)と縮重し；(d) 推定膜貫通領域としてここに記載される、少なくとも1つ、有利には少なくとも2つ、より有利には少なくとも3つ、より有利には少なくとも4つ、より有利に

50

は少なくとも5つおよび最も有利には6つのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし；(e)細胞小器官の膜安定性および/または機能に寄与するポリヌクレオチドにより示されるここに記載のアミノ酸と、少なくとも85%、有利には少なくとも90%、より有利には少なくとも95%、より有利には少なくとも98%、および99.6%まで同一であるポリペプチドをコードし；(f)細胞小器官の膜安定性および/または機能に寄与するポリヌクレオチドにより示されるここに記載のアミノ酸配列と、少なくとも90%、有利には少なくとも95%、より有利には少なくとも98%、および99.6%まで同一であるポリペプチドをコードし；(g)ここに記載のアミノ酸配列と、少なくとも35%、有利には少なくとも50%、より有利には少なくとも60%、より有利には少なくとも70%、より有利には少なくとも80%、より有利には少なくとも90%、最も有利には少なくとも95%および最も有利には少なくとも99%が同一であるポリペプチドをコードし；(h)突然変異により(a)~(g)の核酸分子と異なり(前記突然変異は、コードされたポリペプチド中に変化、欠失、重複または未熟終結を起こす)；または(i)ここに開示した配列を有する。さらに本発明は、前記核酸分子を含むベクターを提供する他に、前記ベクターを用いて形質転換させた宿主も提供する。本発明はまた、前記核酸分子によりコードされるポリペプチドおよび抗体、そのフラグメントまたはその誘導体、またはアプタマー、または本発明の核酸分子またはポリペプチドを特異的に認識する他のレセプターに関する。本発明には、核酸分子、ベクター、宿主、ポリペプチド、融合タンパク質、抗体、そのフラグメントまたは誘導体、またはアプタマー、またはその他のレセプター、または本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物も記載されている。有利にはこれらの組成物は、診断用組成物または医薬品組成物である。さらに本発明は動物または植物における細胞代謝に関するか、またはホメオスタシスを変化させることのできるポリペプチドまたは物質を同定する方法、および哺乳動物の体重調節に関するポリペプチドを同定する方法を提供する。本発明はまた、本発明の核酸分子またはポリペプチドの発現に影響する化合物を同定する方法に関する。加えて、本発明の1つ以上の化合物の発現の影響を評価する方法を開示した。最終的に、本発明は本発明の(ポリ)ペプチドの阻害剤および/または刺激剤を含む組成物を提供し、本発明の化合物を含むキットを提供する。

10

20

30

40

50

【0002】

ミトコンドリアは動物細胞のエネルギー供給者である。炭水化物、脂肪等の代謝栄養素から得られるエネルギーの大部分は、ミトコンドリア内膜にプロトン勾配を生成するために用いられる。このプロトン勾配は、細胞の主要な燃料物質であるATPを産出する酵素ATPシンターゼを推進する(Mitchell P、Science 206、1979、1148-1159)。褐色脂肪組織のミトコンドリアには、ミトコンドリア内膜を通過してプロトンを通させるタンパク質(脱共役タンパク質1)が存在する(レビュー：Klingenberg M、Huang SG、Biochim Biophys Acta 1999、1415(2)：271-96)。従って、プロトン勾配に貯蔵されたエネルギーは熱として放出され、ATP合成には使用されない。

【0003】

動物のエネルギー摂取が消費を超える場合、余分なエネルギーは脂肪組織に脂肪として貯蔵できる。脱共役タンパク質の活性化によってミトコンドリア内膜を通して放出されるプロトンの発生は、熱量効率を減少させ、動物の健康に悪影響を及ぼす過剰な体脂肪の蓄積(肥満症)を回避する。しかし、ヒトの場合、褐色脂肪組織は成人にほとんど見られない。以上の点から、UCP1がヒト肥満症の形成または予防において主要な因子であるとは考えられていなかった。近年、ヒト組織(例えば白色脂肪組織、筋肉)に広範に発現する類似の配列(UCP2-UCP5)を有するタンパク質が発見され、UCPファミリーのメンバーが医薬品研究の標的として重要であることが示された(レビュー：Adams SH、Nutr 2000、130(4)：711-4)。意外にも、Ricquier、Biochem J、345(2000)、161-179においてレビューされているように、特に、植物UCPであるStUCP(由来：Solanum tuberosum

um ジャガイモ)およびAtUCP(由来:Arabidopsis thaliana シロイヌナズナ)のような別のホモログが同様に同定されている。これらのタンパク質のin vivoにおける機能はまだ未知であるが、UCP活性に影響を及ぼす可能性は、肥満症および関連疾患の治療または予防のための治療法として想定できる。

【0004】

ミトコンドリアはエネルギー変換において非常に特殊な機能を有し、前記機能はその形態学的構造、すなわち固有の内膜によるものである。この内膜は電子輸送プロセスに対するフレームワークを実現するばかりでなく、高度に特殊な酵素を内包する各細胞小器官において大きな細胞内コンパートメントを作成する。以上の点から、ミトコンドリアのエネルギー代謝と細胞小器官生化学的/生物物理学的な性質とは密接に関連している。

10

【0005】

本発明の根底にある技術的問題は、ミトコンドリアの生化学的/生化学的活性を調節するための手段および方法を提供することであり、この方法では、ATPレベル、NAD⁺/NADH比、および/またはスーパーオキシド産生を調節するために、エネルギー消費、体温、産熱、過剰なまたは過少な基質の供給に対する細胞代謝に影響する、真核細胞の代謝条件が調節される。

【0006】

この技術的問題は、請求項において特徴づけた態様により解決される。

【0007】

従って、本発明は、細胞小器官の膜安定性および/または機能に寄与する、ポリペプチドをコードする核酸分子に関し、前記核酸分子は、

20

(a) 65 にて0.2xSSCおよび0.1%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)を含んでいる溶液中で、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14および/またはSEQ ID NO:52のアミノ酸配列をコードする核酸分子および/またはその相補鎖とハイブリタイズし;

(b) 65 にて0.2xSSCおよび0.1%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)を含んでいる溶液中で、SEQ ID NO:6、7または53、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13および/またはSEQ ID NO:51で示される核酸分子および/またはその相補鎖とハイブリダイズし;

30

(c) (a)または(b)の核酸分子と縮重し;

(d) SEQ ID NO:15~50、61および62の任意の1つに示される、少なくとも1つ、有利には少なくとも2つ、より有利には少なくとも3つ、より有利には少なくとも4つ、より有利には少なくとも5つ、および最も有利には6つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし;

(e) SEQ ID NO:8と少なくとも85%、有利には少なくとも90%、より有利には少なくとも95%、より有利には少なくとも98%、および99、6%まで相同なポリペプチドをコードし;

(f) SEQ ID NO:54と少なくとも90%、有利には少なくとも95%、より有利には少なくとも98%および99、6%まで相同なポリペプチドをコードし;

40

(g) SEQ ID NO:10、12、14または52の任意の1つに示されるアミノ酸と、少なくとも35%、有利には少なくとも50%、より有利には少なくとも60%、より有利には少なくとも70%、より有利には少なくとも80%、より有利には少なくとも90%、最も有利には少なくとも95%および最も有利には少なくとも99%相同なポリペプチドをコードし;

(h) 突然変異のために(a)から(g)の核酸分子と異なり(前記突然変異は、コードされるポリペプチドに変化、欠失、重複または未熟終結を起こす);または

(i) SEQ ID NO:9、11、13または51に記載の配列を有する。

【0008】

補足実施例に記載するように、本発明は、細胞小器官、特にミトコンドリアの膜安定性お

50

よび／または機能に直接的または間接的に寄与する遺伝子および遺伝子産物を提供する。

【0009】

ここに使用する用語「膜安定性」は、小器官の膜の全体のみならず、局所的な安定性も意味し、例えば、内膜および外膜、特に内膜である。従って、用語「膜安定性」は、規定の膜組成を導くタンパク質 - タンパク質相互作用ならびにタンパク質 - 脂質相互作用によって提供される膜の構造上の特徴に関連する。

【0010】

先に使用した「細胞小器官の膜機能への寄与」という表現は、特に、輸送機能（例えばイオン、代謝産物、ビタミン、などの能動および受動輸送）、その他の膜タンパク質の制御因子機能（例えば輸送体、キャリアー）またはその他（膜）のタンパク質の修飾機能（例えば増強／抑制機能）および／または以下に定義したその他の機能を含む、上記定義のポリペプチド機能に関するものである。

10

【0011】

ここに使用する「細胞小器官」という表現は、ミトコンドリアに関連するのみならず、ペルオキシソームまたは植物細胞小器官、例えば葉緑体のような細胞小器官にも関するものである。

【0012】

本発明で使用する「ハイブリタイズする」および「ハイブリダイジング」という用語は、有利には特に前記のストリンジェントな条件、例えば65℃にて0.2×SSC、0.1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）の条件に関するものである。前記条件にはハイブリダイゼーション条件、特に洗浄条件が含まれる。洗浄条件はハイブリダイゼーション条件よりもストリンジェントなほうが望ましい。ハイブリダイゼーション条件を設定することによって、当業者は厳密に相補的な配列または相同性の高いまたは低い配列が検出されるかどうかを決定することができる。条件の設定は当業者が熟知しており、例えば Sambrook、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、2nd edition (1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、または Hames and Higgins、"Nucleic acid hybridization, a practical approach"、IRL Press、Oxford (1985) に記載されるプロトコルに従って決定される。ホモログや正確には相補的でない配列の検出に対しては、あまりストリンジェントでないハイブリダイゼーション条件を65℃にて6×SSC、1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）に設定することができる。

20

30

【0013】

本発明の核酸分子とハイブリダイズする分子はまた、肥満症を調節し、引き起こし、またはそれに寄与する（ポリ）ペプチドをコードする上述の核酸分子のフラグメント、誘導体および対立遺伝子変異体を含む。この点で、フラグメントは前記（ポリ）ペプチドをコードするために十分に長い核酸分子の部分として定義される。用語「誘導体」は、ハイブリダイズする分子の配列が上述の核酸分子の配列と1つ以上の位置で異なること、およびこれらの配列に対して高度な相同性を示すことを意味する。例えば、相同性とは、SEQ ID NO: 10、12、14 または52において同定された配列に対する配列同一性が少なくとも35%、具体的には少なくとも45%の同一性、有利には50%以上、より有利には60%以上、より有利には70%以上、より有利には80%以上およびまだより有利には90%以上の配列同一性であることを意味する。SEQ ID NO: 8として同定された配列を考慮する場合、前記相同性は少なくとも85%の配列同一性を意味する。SEQ ID NO: 54において描写した配列に関しては、少なくとも90%の配列同一性が「相同性」と考慮される。当業者は、相同性値を決定するためにコンピュータプログラムおよびパッケージを使用することができる。一般に、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の同一性／相同性は、2つのセグメント間で最も相同性の高いセグメントを見出すために、BLAST IN、BLAST P、NALIGN、PALIGNのような周知のコ

40

50

ンピュータプログラム、または特定のアルゴリズムを使用する `b l 2 s e q` を使用することによって従来通りに決定することができる。

【 0 0 1 4 】

補足実施例に示すように、本発明に照らして同一性のパーセントのアミノ酸レベルでの比較分析は、有利には次のパラメータを使用する `N C B I` からの「`b l 2 s e q`」プログラムを使用して得る：オープンギャップコスト：11およびギャップ伸長コスト：1。但し、プログラムは前記値に対して任意の正の整数を許容するものとする。

【 0 0 1 5 】

さらには、本発明に照らして、異なる核酸配列のヌクレオチドレベルでの同一性のパーセントの比較分析は、これに反して、次のパラメータを使用する「`エンボス`」パッケージの「`matcher`」プログラムを使用して得ることができる：ギャップ罰則値：16およびギャップ長の数値：4、あるいはプログラムは任意の正の整数であってよい。これらのパラメータは、特に分析された異なる配列間の異なるレベルの相同性を考慮すると、参照ヌクレオチドまたはアミノ酸配列上の同一性パーセントを算出するために最高に適していることが見出された。上述の核酸分子と比較する場合に発生する任意の偏差は、欠失、置換、挿入または組換えによって引き起こされる。

【 0 0 1 6 】

さらに、相同性は、機能上および/または構造上の同等性がそれぞれの核酸分子間に、またはそのコードするタンパク質間に存在することを意味する。上述の分子に対して相同であり、これらの分子の誘導体を表す核酸分子は一般に、同一生物学的機能を発揮する修飾を形成するこれらの分子の誘導体である。これらの変異は天然の変異であり得る。変異は自然に発生する変異であってよく、例えば他の生物体、または突然変異体に由来する配列によって突然変異体が自然に出現してよく、または特定の変異誘発の手段によって導入されてもよい。さらに、変異が合成的に産生された配列であり得る。対立遺伝子変異体は天然に発生する可能性がある他、合成的に産生された変異体または組換え `D N A` 技術によって産生される変異体である可能性もある。

【 0 0 1 7 】

本発明記載の核酸分子の種々の変異体によってコードされたタンパク質は、特定の共通した特徴を示す。これらの特徴には、生物学的活性、分子量、免疫学的な反応性、高次構造などが含まれてよく、また、ゲル電気泳動における移動度、クロマトグラフィーの特徴、沈降係数、溶解度、分光学的な性質、安定性、最適 `p H`、最適温度などのような物理的な性質等も含まれる。

【 0 0 1 8 】

有利には、上記の核酸分子は、`SEQ ID NO`：15～50、61および62の任意の1つに示される、少なくとも1つ、最も有利には少なくとも6つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。前記 `SEQ ID NO`：は予想された膜貫通領域/ドメインに関連し、また補足実施例および図に記載される。`SEQ ID NO`：15～26、61および62に示す配列は、キイロショウジョウバエから取得可能な本発明の核酸分子において演繹された膜貫通領域に関連し（対応アミノ酸配列も含む）、`SEQ ID NO`：27～38は、ヒトから取得可能な核酸分子において演繹された膜貫通ドメインに関連し、および `SEQ ID NO`：39～50は、ここに定義したタンパク質の膜貫通ドメインに関連し、マウスから演繹可能である。また本発明の範囲内には、以上の点から、`SEQ ID NO`：15～50、61および62の任意の1つに示される少なくとも1つの膜貫通ドメインを含む本発明の核酸分子によってコードされたポリペプチドも含まれている。本発明は、但し、異種からの膜貫通領域/ドメインが人工的に結合する構成物も含む。また、前記 (d) の核酸分子は、`SEQ ID NO`：27～50の任意の1つに描写した、少なくとも1つ、より有利には少なくとも6つの、マウスおよびヒトから演繹されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするのが最も望ましい。なお、望ましい組み合わせには、1つの種からの少なくとも1つ、そして有利には全ての膜貫通領域が含まれる。

10

20

30

40

50

【0019】

本発明の核酸分子は、細胞小器官の膜安定性および/または機能に寄与するポリペプチドをコードし、SEQ ID NO: 8に示すアミノ酸配列に対して少なくとも85%および99、6%まで同一であり、またはSEQ ID NO: 54に示すアミノ酸配列と少なくとも90%および99、6%までが同一であることが望ましい。SEQ ID NO: 8には特に、SEQ ID NO: 7でコードされたポリペプチドが示され、そして意外にも細胞小器官の膜機能および/または安定性に関与することが分かり、そして具体的には、UCPsを修飾できることが分かったショウジョウバエのタンパク質を表す; 補足実施例も参照のこと。SEQ ID NO: 54に示すアミノ酸配列(特に、SEQ ID NO: 53によってコード済)は、上記タンパク質のスプライス変異型を含む。補足実施例において実証されたように、記載のポリペプチド(核酸分子をコードする)は、キイロショウジョウバエ遺伝子dUCPyの過剰発現が原因で生じたショウジョウバエにおける特定の眼表現型を修飾(例えば抑制)することができる。ショウジョウバエの複眼におけるdUCP(ヒトUCPsに対する相同性を有する)の過剰発現は、明らかに可視的な眼欠陥を引き起こした(補足実施例および図を参照)。これは遺伝的「修飾因子スクリーニング」に対する「読み取り」として使用することができる。

10

【0020】

前記「修飾因子スクリーニング」において、その眼中発現を活性化するために、数千の異なる遺伝子を変異誘発させた。変異誘発させた遺伝子の1つがdUCPyと相互に影響し、その活性を修飾する場合、眼欠陥の増強または抑制が発生する。そのようなハエは容易に同定できるので、相互作用遺伝子を単離するために選択することができる。

20

【0021】

補足実施例に示すように、dUCPy活性によって誘発された眼欠陥を抑制する遺伝子を演繹せしめた。この遺伝子を、[脱共役タンパク質1の抑制因子](SOU P1)と称す。

【0022】

本発明はまた、本発明の核酸分子によってコードされたSOU P1タンパク質に関連するものであり、SEQ ID NO: 10、12、14および52に示されている。コードされたポリペプチドは、SEQ ID NO: 10、12、14または52の任意の1つに示されるアミノ酸配列と少なくとも35%および最も有利には少なくとも99%アミノ酸配列に同一であることが望ましい。SEQ ID NO: 10はSOU P1のヒトホモログを示し、SEQ ID NO: 12および14はマウスSOU P1の2つの変異体を示し、SEQ ID NO: 52はゼブラフィッシュ(ゼブラダニオ)のSOU P1を示す。

30

【0023】

ここに記載されたSOU P1ポリペプチド(および遺伝子)における突然変異は、表現型および/または生理的な変化を引き起こすことが構想され、これには、ミトコンドリア活性の修飾および変異が含まれる。これは次々に、特にエネルギー代謝の変化、産熱および/または変異エネルギーホメオスタシスの変化を引き起こすことができる。

【0024】

望ましい態様において、上記の本発明の核酸分子はDNAである。これに関連して、用語「核酸分子」は、コーディングおよび、場合により、特に、5'および3'非コーディング配列のような非コーディング配列を含むことが理解される。前記5'および/または3'非コーディング領域は、転写および随意的にポリ-Aシグナルの開始を保証し、転写の終結および/または転写の安定化を保証する(特定の)調節配列を含むことができる。追加の5'および3'非コーディング領域は、プロモーターおよび/または転写のほかに翻訳エンハンサーも含むことができる。さらには、用語「核酸分子」は、場合により、イントロンおよびスプライス変異体を含むことができる。

40

【0025】

ここに使用した用語「DNA」には、特に一本鎖または二本鎖DNA、例えば合成DNA

50

、cDNAおよびゲノムDNAなどが含まれる。さらには、本発明の核酸分子はmRNAのようなRNA分子でもあり得る。本発明に基づいて、用語「核酸分子」にはまた、核酸プローブがハイブリダイズできる核酸誘導体が含まれる。前記核酸プローブ自体が、前記核酸分子または前記誘導体に対してハイブリダイズ可能な核酸分子の誘導体であり得る。用語「核酸分子」にはさらに、アミド主鎖結合を有するDNA類似物を含んでいるペプチド核酸(PNAs)が含まれる(Nielsen、Science 254(1991)、1497-1500)。

【0026】

これに関連して、本発明の核酸分子は、特に当分野で周知であり市販されている、例えばABI394DNA-RAN-シンセサイザーのようなシンセサイザーを使用して化学的に合成され得ることもあることが強調されなくてはならない。

10

【0027】

本発明の核酸分子がポリペプチドをコードして、細胞小器官の膜安定性および/または機能に寄与し、細胞小器官において膜安定性および/または機能に寄与する前記ポリペプチドがミトコンドリアおよび/またはペルオキシソーム中に発現されることが望ましい。前記ポリペプチドが前記膜の維持に関与することは特に望ましい。

【0028】

さらには、本発明の核酸分子がポリペプチドをコードし、細胞小器官における膜安定性および/または機能に寄与する前記ポリペプチドが、輸送体分子および/または輸送体分子の制御因子であることが構想される。例えば、本発明の核酸分子によってコードされたポリペプチドが、イオン、代謝産物またはビタミンのような分子を細胞膜を横切って輸送することができる担体および/または輸送分子を直接的にまたは間接的に制御すること、および/または前記ポリペプチドがそのような輸送体/担体分子であることが構想される。

20

【0029】

本発明の核酸分子が上記に定義したように、ポリペプチドをコードし、前記ポリペプチドは変性ポリペプチドであることは特に望ましい。特に望ましい変性ポリペプチドには、ミトコンドリアのタンパク質の修飾因子、例えばUCPファミリーメンバー修飾が含まれる。

【0030】

前記UCP(脱共役タンパク質)ファミリーのメンバーは分野で周知であり、UCP1、UCP2、UCP3、UCP4、UCP5、StUCPまたはAtUCPを含む。特に前掲のRiquier(2000)を参照。上記のミトコンドリアのタンパク質の修飾、具体的にはUCPsのタンパク質の修飾は、前記タンパク質との直接相互作用によって、または、前記ミトコンドリアのタンパク質の機能または活性に必要な、または前記ミトコンドリアのタンパク質の活性によって生成される、イオン、代謝産物またはビタミン、およびその他同種類のものを供給/移入/搬出することによって(またはこれらのプロセス遮断によって)発生させることができる。以上の点から、前記「修飾」もまた、輸送現象および供給現象に関連するものである。さらには、前記「修飾」には、1つ以上のタンパク質/ポリペプチド、有利にはUCPファミリーのメンバーの機能のコントロールが含まれる。最も望ましいのは、細胞代謝、具体的にはエネルギー代謝に影響する事象を含む「修飾」である。

30

40

【0031】

本発明はまた、上記に指摘したように、ここに記載する核酸分子の「変異体」に関連する。

【0032】

用語「変異体」は、ここで、1つ以上のヌクレオチド位置において、細胞小器官の膜安定性および/または機能に寄与する上述の核酸分子および(ポリ)ペプチドの配列と異なり、同時に前記核酸分子に対して高度な相同性を持つヌクレオチドおよびそれがコードするアミノ酸配列を意味する。相同性とは上記の定義であると理解される。上記の核酸分子配列からの偏差は、例えば、ヌクレオチド置換、欠失、付加、挿入および/または組換えの

50

結果であり得る。相同性は、それぞれの核酸分子またはコードするタンパク質が機能的および/または構造的に等価であることをさらに暗示することができる。上記の核酸分子に対して相同性を有し、前記核酸分子の誘導体である核酸分子は、例えば、同一生物学的機能を有し、具体的には同一または実質上同一の生物学的機能を有するタンパク質をコードする前記核酸分子の変化である。それらは、その他の哺乳類または突然変異体に由来する配列の天然の変化であり得る。用語「変異体」はこれに関連して、特に、上記のように対立遺伝子変動またはスプライス変異体をさらに含む。天然のS O U P 1タンパク質またはs o u p 1遺伝子変異体は「対立遺伝子変異体」と称され、生物体の染色体上の所定の遺伝子座を占有するいくつかの遺伝子の交代形態1つである。(Gene s I I, Lew i n, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985) および最新版)。これらの対立遺伝子変異体は、ポリヌクレオチドおよび/または(ポリ)ペプチドレベルのいずれかで変化し得る。あるいは、非自然発生の変異体は、変異誘発技術または直接合成によって産生することができる。タンパク質工学および組換えDNA技術の周知の方法を用いて変異体を生成して、ここに記載されたS O U P 1タンパク質/s o u p 1遺伝子の特徴を改善または変質することができる。以上の点から、用語「対立遺伝子変異型」には、合成的に産生または遺伝子操作された変異体も含まれる。

10

【0033】

本発明の核酸分子は、天然に起源するもの、合成または半合成物、または誘導体のいずれでも差し支えない。

【0034】

上記の(ポリ)ペプチド、例えばS O U P 1の野生型形態および変異形態、および/またはそのフラグメントをコードする本発明の核酸分子は、翻訳可能な転写物、ハイブリダイゼーションプローブ、PCR法プライマーとしての使用、または例えば適切に被覆されたチップのような核酸の発現プロフィールの作成、または診断用および/または医薬用の使用を含んだ、さまざまな適用例が見出されている。有用なPCR法プライマーは当業者によって本発明の核酸分子から演繹することができる。特に有用なプライマーは、特に補足実施例において使用されている。

20

【0035】

具体的には、それらのプライマーは、S O U P 1の遺伝子および遺伝子転写物の存在の検出において、およびs o u p 1ホモログまたは構造上の類似体をコードする核酸の検出および/または増幅において、それぞれ使用することができる。ここに開示するプローブ、材料および方法、特にcDNAおよびゲノムライブラリの探索を前提とし、当業者は対応するホモログを回復することができる。下記のように、本発明の核酸分子は、特異的発現ベクターの一部であり得、発現およびスクリーニングのために組換え細胞へ導入されてよく、機能的な研究(例えばS O U P 1の発現に関連する疾病のための候補薬物の有効性)のために遺伝子組換え動物に導入されてもよい。

30

【0036】

さらには、診断において、ここに記載されたs o u p 1遺伝子およびs o u p 1対立遺伝子に存在する単一ヌクレオチド多型に関連する、特異的ハイブリダイゼーションプローブは、臨床実験および研究実験用サンプル中の野生型の同定、および変異体s o u p 1対立遺伝子の同定に使用することができる。変異体対立遺伝子は特に、対立遺伝子-特異的オリゴヌクレオチド(A S O)プローブ(例えば、高処理量の臨床診断用)を生成するために使用される。治療学的なアプローチのため、上記および下記の本発明の核酸分子を用いて、本発明の細胞発現または細胞内の濃度または活性(ポリ)ペプチドの利用能を調節することができる。これらの核酸分子は、アンチセンス鎖であってよく、すなわち本発明の開示する核酸の相補鎖を含む一本鎖配列であってよい。

40

【0037】

本発明の核酸分子は、前記の核酸分子の単独または組み合わせのいずれかを含んでいる、組換えにより産生されたキメラ核酸分子であり得る。有利には、前記核酸分子はベクターの一部である。

50

【0038】

本発明は以上の点から、本発明核酸分子を含んでいる、ベクターにも関連するものである。本発明のベクターは例えば、従来遺伝工学に使用されているプラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージまたは他のベクターであり得、望ましい宿主細胞中および望ましい条件下において前記ベクターの選択を許容する、マーカー遺伝子のような遺伝子をさら含むことができる。さらには、本発明のベクターは、本発明の核酸配列に加えて、望ましい宿主においてコード領域を適切に発現させることのできる、発現制御因子を含むことができる。そのような制御因子は当事者に周知であり、プロモーター、スプライスカセット、翻訳開始コドン、ベクターに挿入するための挿入部位を含むことができる。有利には、本発明の核酸分子は、動作可能なように前記発現コントロール配列に連結し、原核または真核細胞における発現を許容する。

10

【0039】

原核および真核細胞発現を保証する調節要素は、当業者に公知である。上記のように、調節要素には普通、転写の開始を保証する調節配列、および場合により、転写の終結および転写の安定化を保証するポリAシグナルが含まれる。付加的な調節要素は、転写エンハンサーのほかに翻訳エンハンサー、および/または自然付随したプロモーターまたは異種プロモーター領域も含むことができる。例えば哺乳動物の宿主細胞などにおいて発現を容認する、ありうる調節要素には、CMV-HSVチミジンキナーゼプロモーター、SV40、RSV-プロモーター(ラウス筋節ウイルス)、ヒト伸長因子、プロモーター、aPM-Iプロモーター(Schaffer, Biochem. Biophys. Res. Commun. 260(1999)、416-425)、または誘導型プロモーター、例えばメタロチオネインまたはテトラサイクリン、またはエンハンサー、例えばCMVエンハンサーまたはSV40エンハンサーが含まれる。真核細胞における発現に関しては、例えば、tac-lacプロモーターまたはtrpプロモーターを含んだ、多数のプロモーターが記載されている。転写の開始を担う要素に加えて、そのような調節要素は、転写終結シグナル、例えばSV40ポリA部位またはtkポリA部位、ポリヌクレオチドの下流も含むことができる。これに関連して、Okayama-Berg cDNA発現ベクターpcDV1(ファルマシア社)、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3(インビトロゲン社)、pSPORT1(ギブコ社)、Casper、Casper-HS43、pUAST、またはラムダgt11のような真核発現ベクターのような、望ましい発現ベクターが当分野で周知されている。本発明の核酸分子に加えて、ベクターはさらに、分泌シグナルをコードする核酸配列を含むことができる。そのような配列は当業者に公知である。さらには、(ポリ)ペプチドを細胞コンパートメントに配向する能力を持つリーダー配列を使用した発現システムは、本発明の核酸分子のコード配列に追加されることができ、当分野で周知されている。リーダー配列は、翻訳、開始および終結配列と共に適当な部位に構築され、有利には、リーダー配列は、翻訳済タンパク質の分泌、またはそのタンパク質を周辺質のスペースまたは細胞外の培地に配向する能力を有する。随意的に、異種配列は、所望の特徴、例えば、発現された組換え生成物の安定化または単純精製を付与する、C末端同定またはN末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる。ベクターが一旦適切な宿主に取り込まれると、宿主はヌクレオチド配列の高レベル発現に望ましい条件下で維持され、所望に応じて、本発明(ポリ)ペプチドまたはそのフラグメントの収集および精製を次に行う。

20

30

40

【0040】

さらには、本発明のベクターは、遺伝子伝達または遺伝子標的ベクターでもあり得る。治療学的な遺伝子を体外技術または生体内技術によって細胞生に導入することに基づく遺伝子療法は、最も重要な遺伝子伝達の適用例の1つである。試験管内または生体内の遺伝子療法に対する望ましいベクター、方法または遺伝子配達システムは、文献に記載されており、当業者には周知である；例えば、Giordano, Nature Medicine 2(1996)、534-539；Schaper, Circ. Res. 79(1996)、911-919；Anderson, Science 256(1992)、808

50

- 813, Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlh
auser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodua
, Blood 91 (1998), 30-36; Verzeletti, Hum. Gene
Ther. 9 (1998), 2243-2251; Verma, Nature 389 (1
997), 239-242; Anderson, Nature 392 (Supp. 199
8), 25-30; Wang, Gene Therapy 4 (1997), 393-400
; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO 94
/ 29469; WO 97/00957; US 5,580,859; US 5,589,46
6; US 4,394,448 or Schaper, Current Opinion in
Biotechnology 7 (1996), 635-640, 10
引用参照を参照。具
体的には、前記ベクターおよび/または遺伝子送達系はまた、脂肪細胞における(特に、
US 5,869,037またはZhou, PNAS USA 96 (1999), 2391-
2395を参照)または視床下部における(特に、Geddes, Front Neuro
endocrinol. (1999), 296-316またはGeddes, Nat. M
ed. 3 (1997), 1402-1404を参照)遺伝子療法アプローチについても記
載されている。本発明の核酸分子およびベクターは、細胞へ直接導入できるように、また
はリボソーム、ウィルスベクター(例えばアデノウイルスベクター、レトロウイルス性ベ
クター)、電気穿孔法、弾道的な送達法(例えば遺伝子銃)またはその他の送達系を介し
て細胞へ導入できるようにデザインされていてよい。そのうえ、バキュロウイルスシステ
ムを原核発現システムとして本発明の核酸分子に対して使用することができる。 20

【0041】

下記に記載されているように、本発明の核酸分子および/または本発明の上記ベクター/
宿主は、特に医薬品組成物として有用であり得る。前記医薬品組成物は、例えば遺伝子療
法アプローチのような診断および/または治療学的なアプローチにおいて使用することが
できる。これに関連して、本発明の核酸分子および/またはベクターを用いて、本発明の
細胞発現および/または(ポリ)ペプチドの細胞内濃度またはそのフラグメントを調節、
変性および/または修飾できることが構想される。前記調節、変性および/または修飾は
、ここに記載されたSOUP1遺伝子のSOUP1(ポリ)ペプチドおよび/または遺伝
子産物のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを導くことができる。さ
らには、前記治療学的なアプローチは、活性SOUP1(ポリ)ペプチド/タンパク質/
遺伝子産物の利用能の改変および/または調節を導くことができる。これに関連して、用
語「活性」は、生物体で(正常な)細胞機能を実践できる能力を意味する。 30

【0042】

遺伝子療法適用例に関して、本発明の(ポリ)ペプチドをコードする核酸またはそのフラ
グメントは、遺伝子伝達システム、例えばウィルス、ならびに感染した細胞または生物体
において感染および疾病の寛解または治療効果を授与するために使用されるウィルスヘク
ローン化することができる。

【0043】

上記のように、核酸分子および/またはベクターを用いてSOUP1タンパク質/(ポリ)
ペプチドの遺伝子発現または細胞内の濃度を調節/変性することができる。前記調節/
変性はアンチセンス・アプローチによって達成することができる。 40

【0044】

SOUP1発現のアンチセンス調節は、動作可能なように遺伝子調節配列に連結したアン
チセンス核酸を使用することができる。例えば、遺伝子転写により、mRNAをコードす
る内在性sou p 1に結合する能力を持つアンチセンス転写が成されるように配向された
プロモーター配列を有するsou p 1配列を含むベクターで、細胞は形質移入される。ア
ンチセンス核酸の転写は構成型または誘導型であり得、ベクターは安定した染色体外の維
持および統合を提供することができる。あるいは、ゲノムDNAまたは本発明の(ポリ)
ペプチドまたはそのフラグメントをコードするmRNAに結合する一本鎖アンチセンス核
酸を、前記(ポリ)ペプチドの発現にかなりの減少をもたらす濃度で、宿主の中または宿 50

主から一時的に単離された標的細胞に投与することができる。さらには、本発明の（ポリ）ペプチドの発現は、アンチセンスアプローチ以外の手段によって影響され、抑制され得ることが構想される。以上の点から、本発明の（ポリ）ペプチドの発現の減少は、アンチセンス核酸のあるいは二本鎖RNAを適用するRNA媒介遺伝子干渉によって達成することができる（Sharp, Genes Dev. 13 (1999), 139-141を参照）。二本鎖RNAまたはRNAiアプローチによる遺伝子抑制は、Hunter, Curr. Biol. 10 (2000), R137-R140にも記載されている。

【0045】

本発明の核酸分子は以上の点から、本発明のS O U P 1（ポリ）ペプチドの野生型または変異体バージョンのいずれかをコードする核酸分子の機能を抑制することができる適切なアンチセンスオリゴヌクレオチドの作成のために使用され得る。前記アンチセンスヌクレオチドは、有利には少なくとも15ヌクレオチド、より有利には少なくとも20ヌクレオチド、さらにより有利には30ヌクレオチドおよび最も有利には少なくとも40ヌクレオチドを含む。

10

【0046】

加えて、リボザイムアプローチもまた、本発明において構想されている。リボザイムは本発明の核酸分子を特異的に切断することができる。

【0047】

本発明に照らしてリボザイムは、特にハンマーヘッド型リボザイム、変異コア配列またはデオキシリボザイムを有するハンマーヘッド型リボザイム（例えば、Santoro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 4262を参照）を含み、天然および生体外選択および/または合成リボザイムを含むことができる。肥満症を調節、誘発するかまたは肥満症に寄与し、および/または体重調節に關与する哺乳動物の（ポリ）ペプチドをコードするタンパク質/（ポリ）ペプチド（下記を参照）をコードする核酸分子に相補的な本発明記載の核酸分子は、本発明の核酸分子を特異的に切断する適なりボザイム（例えば、EP-B10291533、EP-A10321201、EP-A20360257を参照）の作成に使用し得る。適切な標的部位および対応リボザイムの選択は、Steinecke, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith, eds. Academic Press, Inc. (1995), 449-460に記載された参考例の通りに行うことができる。

20

30

【0048】

本発明はまた、本発明のベクターまたは本発明のベクターを保有する非ヒト宿主で形質移入または形質転換された宿主細胞、すなわち、本発明記載の核酸分子またはそのような核酸分子を含むベクターで遺伝的に修飾された宿主細胞または宿主に関連するものである。用語「遺伝的に修飾された」とは、宿主細胞または宿主がその天然ゲノムに加えて、細胞または宿主またはその前任/親の1つに導入された核酸分子または本発明記載のベクターを含むことを意味する。核酸分子またはベクターは、遺伝的に修飾された宿主細胞または宿主中に、ゲノム外の新依存性の分子として、有利には複製可能な分子として、または宿主細胞または宿主のゲノムに安定して統合された状態のいずれかで存在することができる。

40

【0049】

本発明の宿主細胞は、任意の真核または原核細胞であり得る。望ましい真核細胞は、一般に大腸菌または枯草菌のようなクローン化に使用されるものである。さらには、原核細胞は、例えば真菌細胞または動物細胞を含む。望ましい真菌細胞の例としては、酵母菌細胞、有利にはサッカロミセス属の真菌細胞および最も有利にはサッカロミセスセレビジエ種の真菌細胞があげられる。望ましい動物細胞は例えば、昆虫細胞、脊椎動物細胞、有利には、例えばCHO、Hela、NIH3T3、MOLT-4、Jurkat、K562、HepG2、3T3-442A、3T3-L1（およびその誘導体）、HIB-1B（Villaena, Biochem J. 331 (1998), 121-127を参照）、HEK293、PAZ6（Strobel, Diabetologia 42 (1999), 5

50

27-533を参照)のような哺乳動物の細胞である。当分野で周知の、さらに望ましい細胞株は、American Type Culture Collection (ATCC)のような細胞株寄託機関から入手可能である。

【0050】

より望ましい実施例において、本発明のベクターで形質転換させた宿主細胞は、哺乳動物の細胞、特にそれから得た脂肪細胞、脳細胞、苔類細胞、上皮性細胞、血球または細胞(株)である。

【0051】

非ヒト宿主は、有利には非ヒト哺乳類、最も有利にはマウス；ラット、ヒツジ、子ウシ、イヌ、サルまたは類人猿であり、またサンドラット (*Psammomys obesus*) を含んでもよい。前記哺乳類は、治療法、有利には肥満症、脂肪過多症、摂食障害および/または病理学的な体重問題を引き起こす障害に対する治療法を開発する上で不可欠であり得る。さらには本発明の宿主は、本発明の(ポリ)ペプチド(またはそのフラグメント)の産出において部分的に有用であり得る。前記(ポリ)ペプチド(またはそのフラグメント)が前記宿主から単離されることが構想される。

10

【0052】

本発明の非ヒト宿主は、下記のように非ヒト遺伝子組換え動物(実施例10を参照)であり得る。特に、本発明は、本発明の核酸分子の変異形態を含む非ヒト遺伝子組換え動物、または本発明の核酸分子が欠失および/または不活化された非ヒト遺伝子組換え動物を構想する。前記欠失は部分的欠失であり得る。特に望ましい非ヒト遺伝子組換え動物は、ショウジョウバエ、線形動物(例えば線虫)、マウス、ラット、ヒツジその他同種類のものである。

20

【0053】

さらには、本発明は、前記(ポリ)ペプチドの合成を許容し、培養により産生される(ポリ)ペプチドを回収および/または単離する望ましい条件下で、本発明の宿主細胞を培養することを含む、本発明の核酸分子によってコードされた(ポリ)ペプチドを産出する方法に関連するものである。

【0054】

形質転換された宿主細胞を当分野で周知の技術に従って発酵槽において増殖および培養して、至適な細胞増殖を達成することができる。本発明の(ポリ)ペプチドを、次に、増殖培地、細胞可溶化液、細胞膜画分または包含体から単離することができる。発現されると、本発明のタンパク質を、硫酸アンモニウム沈殿、親和性カラム(アフィニティークラム)、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動法その他同種類のものを含む、当分野の標準製法に従って精製することができる；Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982)を参照。例えば、"Current Protocols in Molecular Biology" (2000, John Wiley and Sons)は精製プロトコルを提供する。さらなる精製スキームは当分野で周知であり、膜タンパク質の精製も提供する。例えば、酵母菌/酵母菌発現系中での発現から精製を行うことは、Murdza-Ingalls (1991)、JBC 266, 11871-11875に記載されており、細菌における精製/発現は、Kaplan (1996)、J. Bioenerg. Biomembr. 28, 41-47に、または原核細胞における精製/発現は、(Castella (1990)、PNAS 87, 5124-5128)において開示されている。少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%または少なくとも約90~97%の同質性を有する実質上純粋なタンパク質が望ましく、98~99%以上の同質性が医薬品用として最も望ましい。部分的に、または所望の同質性で精製された後、タンパク質を、治療(体外を含む)またはアッセイの開発および実施に使用することができる。

30

40

【0055】

加えて、本発明は、本発明の核酸分子によってコードされるか、または上述の方法によって産生または取得可能な(ポリ)ペプチド関連するものである。ここに使用された用語「

50

（ポリ）ペプチド」は、ペプチド、完全長タンパク質またはそのフラグメントのいずれかを意味する。ペプチドは、有利には本発明の（ポリ）ペプチドのフラグメントである。用語「（ポリ）ペプチド」は、アミノ酸残基が共有結合のペプチド結合によって連鎖されている、任意の長さのアミノ酸鎖を含むペプチドまたは（ポリ）ペプチドを含む。有利には、「ペプチド」の前記アミノ酸鎖は、少なくとも10アミノ酸、より有利には少なくとも20、より有利には少なくとも30、より有利には少なくとも40、さらにより有利には少なくとも50および、最も有利には少なくとも60アミノ酸を含む。本発明の（ポリ）ペプチドが少なくとも100、より望ましい少なくとも200、より望ましい少なくとも300、より望ましい少なくとも400、より望ましい少なくとも500、さらにはより望ましい少なくとも600アミノ酸を含んでいることがより望ましい。

10

【0056】

本発明において本発明の（ポリ）ペプチドに照らして使用されている用語「またはそのフラグメント」は、特定のペプチド、本明細書で開示されている（ポリ）ペプチドのアミノ酸伸長を含む。前記「そのフラグメント」は機能的フラグメントであることが望ましい。用語「機能的フラグメント」は、少なくとも部分的に、本発明の（ポリ）ペプチドの生理的および/または構造上の活性を満たす、上記で同定された本発明の（ポリ）ペプチドの部分を意味する。但し、前記フラグメントが、本発明の（ポリ）ペプチドに対して介在性および/または抑制性の分子として機能することも構想される。例えば、本発明の（ポリ）ペプチドのフラグメントは、構造的および/または生理的に本発明の（ポリ）ペプチドと相互に影響し、それによって前記（ポリ）ペプチドの機能を抑制することが構想される。

20

【0057】

本発明の（ポリ）ペプチドは、細菌、酵母菌、またはその他の原核細胞のような、哺乳動物細胞または昆虫細胞のような、宿主細胞において発現された組換え（ポリ）ペプチドであり得る。あるいは、それらはウィルス製剤から単離することができる。

【0058】

本発明における他の実施例では、合成（ポリ）ペプチドを使用することができる。以上の点から、そのような（ポリ）ペプチドは、本発明の核酸分子によってコードされた、天然アミノ酸残基のみを含む（ポリ）ペプチドであり得るが、修飾を含んでいる（ポリ）ペプチドでもあり得る。これらには、共有結合性誘導体、例えばカルボキシル基の脂肪族エステルまたはアミノ、ヒドロキシル基を含む残基のO-アセチル誘導体、アミノ基を含む残基のN-アシル誘導体が含まれる。そのような誘導体は、アミノ酸残基の側鎖およびタンパク質のN-末端およびC-末端に存在する反応可能基を連結することによって製造することができる。さらには、（ポリ）ペプチドは、放射標識または、共有結合希土類キレートのような検出可能基を用いて標識すること、または蛍光部分に抱合させることができる。本発明の（ポリ）ペプチドは、例えば、そのような（ポリ）ペプチド、化学的修飾の生成物をコードするヌクレオチド配列の発現の生成物であり得るし、またはウィルス製剤（調合）のような天然源から精製することができる。さらには、（ポリ）ペプチドのドメインの共有結合連鎖の生成物であり得る。

30

【0059】

ペプチド/（ポリ）ペプチドはまた、生化学的技術または合成技術産生によっても産出することができる。それらの方法は当分野では周知である（例えばMerrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149-2146; Stewart, "Solid Phase Peptide Synthesis", WH Freeman & Co, San Francisco (1969); Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin (1987); Janson, "Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications", VCH Publishers, New York, Weinheim, Cambridge (1989); Wrede, "Concepts in Prote

40

50

in Engineering and Design", Walter de Gruyter, Berlin, New York (1994) を参照)。

【0060】

そのうえ、本発明の範囲内には、前述のアミノ酸および/またはペプチド結合が機能的類似物、特に疑ペプチド(peptidomimetic)によって置換されている、ペプチド/(ポリ)ペプチドがある。疑ペプチド(peptidomimetic)は当分野で公知であり、この方法を記載する対応技術は以下に記載されている。以上の点から、本発明はまた、特定のSOUP I由来ペプチドを含む、機能的誘導体および/または前記ペプチドの類似体を包含する。ペプチド/(ポリ)ペプチドの調製に対する方法は、Sambrook et al., loc. cit., or in Oxender and Fox (1987) "Protein Engineering", Alan Liss Inc. New Yorkにおいて記載されている。化学的誘導体および/または類似体のタンパク質調製(調合は、例えば、Beilstein "Handbook of Organic Chemistry", Springer Edition New York, or in "Organic Synthesis", Wiley, New York.において記載されている。

10

【0061】

本発明はまた、本発明の(ポリ)ペプチドまたはそのフラグメントを含む、融合タンパク質に関連するものである。以上の点から、本発明の(ポリ)ペプチドに加えて、前記融合タンパク質は少なくとも1つのドメインを含み、前記ドメインは共有結合または非共有結合によって結合されている。結合は、当分野で周知の方法に従った遺伝的融合に基づくものであってよく(Sambrookら、前掲のAusubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)) または

20

例えば、WO 94/04686において記載されたように、例えば化学的架橋結合によって実施することができ、本発明の(ポリ)ペプチドを含んだ融合タンパク質に存在する追加ドメインは、有利には可動性のリンカーによって連鎖することができ、有利に前記(ポリ)ペプチドリinkerは、前記ドメインのC末端と、ペプチド、(ポリ)ペプチドまたは抗体のN末端間との距離にまたがる、あるいはその逆の、十分な長さの、複数、親水性の、ペプチド結合されたアミノ酸を含んでいる(ポリ)ペプチドリinkerである。上記の融合タンパク質は、切断可能なリンカーまたは例えば、タンパク質分解酵素または化学薬品によって特異的に認識および切断される切断部位を含むことができる。そのうえ、前記の少なくとも1つのドメインは、所定の特異性または機能を有したドメインであり得る。これに関連して、本発明の(ポリ)ペプチドは、当分野で周知の従来の方法によって修飾され得ることが理解される。これは、本発明の(ポリ)ペプチドおよびその他の機能的アミノ酸配列、例えば、細胞小器官の局在性シグナル、転写促進ドメイン、DNA結合ドメイン、ホルモン結合ドメイン、タンパク質タグ(例えばGST、GFP、h-mycペプチド、フラグ、HAペプチド、連鎖球菌)、膜貫通ドメインまたは異種タンパク質から得られる脂肪酸添付モチーフを含んだ、融合タンパク質の作成を許容する。

30

【0062】

本発明の融合タンパク質は、モザイク(ポリ)ペプチドでもあり得る。本発明の(ポリ)ペプチドの少なくとも2つのエピトープを含んでいる前記モザイク(ポリ)ペプチドであってよく、前記モザイク(ポリ)ペプチドは、通常、未変性のSOUP 1タンパク質のエピトープ間に介在するアミノ酸が欠失している。

40

【0063】

特に、そのようなモザイク(ポリ)ペプチドは、単一ペプチドまたは(ポリ)ペプチド内に直線的、またはリジンの場合において多抗原ペプチドシステムとして存在している可能性がある多数の関連エピトープを含み得るので、ここに記載する適用例および方法において有用である。関連エピトープはスペーサー領域によって分離することができる。

【0064】

50

前記ポリペプチドまたはそのフラグメントを含んでいる本発明の融合タンパク質が、SEQ ID NO: 15 ~ 50、61または62に示す任意のアミノ酸配列を、少なくとも1つ、有利には少なくとも2つ、より有利には少なくとも3つ、より有利には少なくとも4つ、より有利には少なくとも5つ、および最も有利には6つ含むことが特に望ましい。上記に開示したように、前記配列は、ここに記載したようにS O U P 1タンパク質の特異的に演繹された膜貫通領域に関連する。本発明の融合タンパク質が、SEQ ID NO: 27 ~ 50に示す任意のアミノ酸配列を、少なくとも1つのおよび最も有利には少なくとも6つ含むことは特に望ましい。前記融合タンパク質が、異なる種、例えばヒト、マウスまたはゼブラフィッシュから得られる膜貫通領域を含むことも構想される。なお、最も望ましいのは、1つの種からの膜貫通領域を含む融合タンパク質である。

10

【0065】

本発明の核酸分子、(ポリ)ペプチド(そのほかにここに記載したように抗体またはそのフラグメントまたは誘導体、アプタマーまたはその他のレセプター)、融合タンパク質、モザイク(ポリ)ペプチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、検出可能な程度に標識化することができる。生体分子を標識化用の入手可能な種々の技術は、当業者に公知であり、本発明の範囲内に含まれているものとする。そのような技術は、例えば、Tijssen, "Practice and theory of enzyme immunoassays", Burden, RH and von Knippenburg (Eds), Volume 15 (1985), "Basic methods in molecular biology"; Davis LG, Dimer MD; Battley Elsevier (1990), Mayer et al., (Eds) "Immunochemical methods in cell and molecular biology" Academic Press, London (1987), or in the series "Methods in Enzymology", Academic Press, Inc. のシリーズに記載されている。

20

【0066】

多くの異なる標識および標識化の方法が当分野では周知である。本発明において使用することができる標識タイプの例には、酵素、放射性同位元素(例: 32Pまたは125I)、コロイド性金属、蛍光性化合物/蛍光色素(例: フルオレッセインローダミン、テキサスレッドなど)、化学発光化合物、および化学または生物発光の化合物(例: ジオキセタン、ルミノールまたはアクリジニウム)が含まれる。

30

【0067】

一般に使用される標識には、特に酵素(例: 西洋わさび過酸化酵素、ベータガラクトシダーゼ、アルカリ性の脱リン酸酵素)、ビオチンまたはジゴキシゲニンが含まれる。酵素またはビオチン化基の共有結合カップリング、ヨウ素化、リン酸化、ビオチン化、ランダムな初回抗原刺激、ニックトランスレーション、テーリング(末端トランスフェラーゼ(転移酵素)を使用)のような標識化製法は当分野で周知である。

【0068】

検出方法には、オートラジオグラフィー蛍光顕微鏡、直接および間接酵素的な反応などが含まれるがそれに限定されるものではない。

40

【0069】

本発明は、さらにはそのうえ抗体またはそのフラグメントまたは誘導体または抗血清またはアプタマーまたは核酸上のエピトープ(抗原決定基)を特異的に認識する他のレセプター、または本発明の(ポリ)ペプチドに関連するものである。抗体を産出するための一般的な方法論は、公知であり、モノクローナル抗体に対して、例えば、Kohler and Milstein, Nature 256 (1975), 494 and reviewed in J. G. R. Hurrell, ed., "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", CRC Press Inc., Boca Raton, FL (1982)に記載されている。本発明に記載の用語「抗体」は、モノクローナル抗体またはポリクロー

50

ナル抗体に関連するものである。ポリクローナル抗体（抗血清）は、従来のプロトコルに従って取得することができる。抗体フラグメントまたは誘導体は、 $F(ab')_2$ 、Fab、FvまたはscFvフラグメントを含む；実施例を参照。Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press 1988. Cold Spring Harbor, NY。有利には本発明の抗体はモノクローナル抗体である。さらには、本発明に基づいて、本発明の誘導体は、疑ペプチド（peptidomimetic）によって産生することができる。本発明に照らした用語「アプタマー」は、RNA、ssDNA（ss＝一本鎖）、修飾RNA、修飾ssDNAまたは、高特異性および親和性を有し、複数の標的配列を結合するPNAsのような核酸を含む。アプタマーは当分野で周知であり、特に、Famulok、Curr. Op. Chem. Biol. 2 (1998)、320-327に記載されている。アプタマーの調製は当分野で公知であり、結合部位を同定するため、特に組み合わせRNAライブラリの使用を含む場合がある（Gold、Ann. Rev. Biochem. 64 (1995)、763-797）。前記の他レセプターは、例えば疑ペプチド（peptidomimetic）によって前記抗体などから得ることができる。認識の特異性は、その他の周知のタンパク質、分子が結合していないことを暗示する上記の復唱された化合物に接触する特異性を評価する望ましい宿主は、核酸分子のエピトープ（抗原決定基）または本発明の（ポリ）ペプチドのほかに、当分野で周知の、例えばタンパク質または核酸分子からの、例えばイムノソルベントアッセイ（ELISA）形態における対応化合物を含み、本発明の化合物のみに結合するが、前記対応化合物とは有意な範囲でほとんど交差反応しないそれらの抗体などを同定することをも暗示する。

10

20

【0070】

本発明はまた、本発明の核酸分子のアンチセンスオリゴヌクレオチドに関連するものである。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、科学的な目的におけるほかに、診断目的または治療学的な目的においてもまた使用することができる。

【0071】

さらに本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明の融合タンパク質または、本発明の核酸分子を含んだ本発明のベクターで形質移入した融合タンパク質を発現する非ヒト動物を提供する。

【0072】

例えば、非ヒト動物が本発明のポリペプチドを過剰発現または過小発現することが構想される。さらには、本発明は、本発明の核酸分子またはそのホモログ、パラログまたはオルソログがサイレント突然変異および/または変異されるような、非ヒト動物に関連するものであり。

30

【0073】

上記の非ヒト動物は、有利にはマウス、ラット、ヒツジ、ハムスター、ブタ、イヌ、サル、ウサギ、子ウシ、ウマ、線形動物、ハエおよびサカナから成るグループから選択される。

【0074】

本発明はまた、遺伝子組換えマウス、ラット、ハムスター、イヌ、サル、ウサギ、ブタ、線虫、ショウジョウバエ、サカナ（例：ゼブラフィッシュまたはシビルエイ）のような遺伝子組換え非ヒト動物に関連するものである。核酸分子または本発明のベクターを含んでいる前記動物は、本発明の（ポリ）ペプチドの単一またはいくつかの形態をコードし、肥満症を調節、誘発またはそれに寄与、または体重調節に関与する、単一またはいくつかの同一または異なる核酸分子のコピーを有することができる。これらの動物は、ここに記載したように、肥満症、脂肪過多、摂食障害、体重/体質量の喪失および/またはその他の障害の研究モデルとして、部分的に有用である。さらには、前記遺伝子組換え非ヒト動物は、上記のS O U P 1タンパク質の変異体形態に関連して、例えば薬物の薬理的な研究に良く適している。

40

【0075】

50

他の実施例において、本発明は、ここに定義されたようにポリペプチド、例えばS O U P 1によって影響および/または修飾される、遺伝子および/または、遺伝子産物の機能をコントロールする、核酸分子、ベクター、宿主、ポリペプチド、融合タンパク質、抗体、フラグメントまたはその誘導体またはアプタマーまたは他のレセプターまたは本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用に関連するものである。前記の影響/修飾は、タンパク質/タンパク質フラグメント間の直接相互作用によって、および/または前記遺伝子および/または遺伝子産物の機能、活性および/または発現に必要な、代謝化合物、またはイオンを供給することによって発生させることができる。前記遺伝子および/または遺伝子産物が、細胞小器官に発現する遺伝子および/または遺伝子産物であることは特に望ましい。前記細胞小器官は、特にミトコンドリアまたはペルオキシソームであり得る。

10

【0076】

前記遺伝子および/または遺伝子産物が、UCPファミリーのメンバーでありことは特に望ましい。UCPファミリーのメンバーは公知であり、上記に記載されている。

【0077】

本発明はさらに、核酸分子、ベクター、宿主、ポリペプチド、融合タンパク質、抗体、フラグメントまたはその誘導体またはアプタマーまたは他のレセプターまたは本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む成分を提供する。前記成分は、特に診断用組成物または、例えばヒトまたは動物薬用などの治療学的な成分医薬品であり得る。さらに、その成分には、望ましい担体、希釈剤および/または補助剤を含むことができる。

【0078】

20

加えて、本発明は、細胞障害、細胞塊、器官および/または被験者および/または治療、細胞障害の軽減および/または予防、細胞塊、器官および/または被験者を検出および/または検証するためにここに定義した成分の使用法を提供する。前記障害は、聴覚障害、網膜症、進行性の脳障害(enzeleopathies)、運動失調、痙性対麻痺、代謝性アシドーシスおよびその他のような障害を含むミトコンドリアの障害、代謝障害またはミトコンドリアの障害であり得る。

【0079】

前記代謝障害には、肥満症、脂肪過多、摂食障害(過食症、拒食症)、カヘキシー(衰弱)、膵臓の機能障害(例:糖尿病、具体的には2型の糖尿病)および/またはROS(活性酸素種)産生(具体的には老化および発癌における感染に対する反応)に関連する障害を含むことができる。

30

【0080】

例えば、UCPsは、例えば糖尿病のような膵臓の障害に関与することが示されている。脱共役タンパク質の糖尿病における役割は、げっ歯類のストレプトゾトシン糖尿病におけるUCP3の誘発によって実証されている(特に、Hidaka、Proc Soc Exp Biol Med 224:172-177(2000)、Hidaka、Diabetes 48:430-435(1999)を参照)。

【0081】

さらにはUCP2膵臓のベータ-細胞における発現は、ベータ-細胞機能およびインシュリン分泌に影響することが示されている(Wang, Diabetes 48:1020-1025(1999); Chan, Diabetes 48:1482-1486(1999))。

40

【0082】

活性酸素種(ROS)cを引き起こす膜機能障害、DNA損傷および不活性化タンパク質の病理学的な結果には、癌、関節炎および神経変性の疾病が含まれる。ROS制限代謝は、細胞損傷から保護するための主要な機構である。具体的には肥満症は、増加された酸化ストレスを誘発することができる(Hayes、Free Radic Res 31:273-300(1999); Yang、Arch Biochem Biophys 378:259-268(2000))。

【0083】

50

対照的に、マクロファージにおける増加されたROS産出は、免疫の反応を改善することができる。同様にUCP2も、感染に対してより高耐性マウスを特定の病原体を用いてノックアウトすることができる。

【0084】

以上の点から、修飾能力を有する本発明の化合物、特にUCPsは、上記に同定された目的に良く適している。

【0085】

さらなる実施例において、本発明は、ここで定義したとおり、ポリペプチドと相互作用可能な物質を同定するために、核酸分子、ベクター、宿主、ポリペプチド、融合タンパク質、抗体、フラグメントまたはその誘導体またはアプタマーまたは他のレセプターまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用法に関連するものである。前記ポリペプチドと相互作用可能な前記物質は、拮抗薬または作用薬であり得る。

10

【0086】

なお、さらなる実施例においては、本発明は、ポリペプチドまたは、動物の細胞代謝に關与する物質または恒常性を修飾する能力のある物質を同定する方法を提供し、そのステップは下記の通りである：

(a) 本発明のポリペプチド、そのフラグメントまたは本発明の融合タンパク質またはそのフラグメントとの相互作用に関する、ポリペプチドまたは物質の収集を読み取り系を使用して検査するステップ；および

(b) ステップ(a)において正の相互作用を示したポリペプチドまたは物質を同定するステップ。

20

【0087】

上記の用語「細胞代謝」は、細胞小器官の細胞膜を横切ったイオン輸送、ビタミン輸送または代謝産物輸送の調節に關与する代謝イベントを含むことができる。これらの輸送イベントまたはその調節は、エネルギー恒常性、貯蔵化合物の累積および/または根拠的生成/除去に影響することができる。

【0088】

ポリペプチドまたは上記の開示方法によって同定された物質は、特にポリペプチドまたは直接的または直接的に本発明のポリペプチド、すなわちS O U P 1タンパク質および/またはそのフラグメントと相互作用する物質(例えばリンカータンパク質経路または生理的パラメータ経路)であり得る。ここに広義に使用された用語「物質」は、生理的および非生理的な物質、例えば合成物質に関連するものである。

30

【0089】

明細書において使用されている用語「フラグメント」とは、少なくとも5、有利には少なくとも10、より有利には少なくとも15およびさらにより有利には少なくとも25アミノ酸を含む、および/またはさらに少なくとも1つ、有利には少なくとも2、より有利には少なくとも3、より有利には少なくとも4、より有利には少なくとも5および最も有利には少なくとも6つの膜貫通領域を含んだS O U P 1タンパク質のフラグメントに関連するものである。なお、ここに使用されたフラグメントは、S O U P 1タンパク質のN-またはC-末端を表すことも構想される。

40

【0090】

上記ステップ(a)の相互作用に関する前記検査は、当事者に周知の方法によって行うことができ、その方法をここに記載した。具体的には、これらの測定法は、生化学的、免疫学的および/または分子生物学的な測定法を含む。

【0091】

読み取り系を使用する前記相互作用測定法は、当分野で周知であり、特に2つのハイブリッドスクリーニング(特に、E P - 0 9 6 3 3 7 6、W O 9 8 / 2 5 9 4 7、W O 0 0 / 0 2 9 1 1に記載されている)、G S Tプルダウンカラム、記載された通りの細胞抽出物からの共沈殿測定法、特にK a s u s - J a c o b i , O n c o g e n e 1 9 (2 0 0 0) , 2 0 5 2 - 2 0 5 9 , " i n t e r a c t i o n - t r a p " s y s t e m s、(記

50

載された通りの、特に、US 6、004、746における)発現クローン化(例えば *l a m d a g t 1 1*)、ファージディスプレイ(記載されたとおりの、特にUS 5、541、109における)、生体外結合測定法、その他同種類のものを含む。さらなる相互作用測定法の方法および対応する読み取り系は、特に、US 5、525、490、WO 99/51741、WO 00/17221、WO 00/14271またはWO 00/05410に記載されている。

【0092】

同様に、相互作用する分子/(ポリ)ペプチドは、当分野で公知の細胞基調技術によって演繹することができる。これらの測定法には、特にレポーター遺伝子構成物の発現、または記載されたように、例えば遺伝子発現に影響する薬物/小化合物の同定に関する「ノックイン」測定法が含まれている。前記「ノックイン」測定法は、組織培養細胞における「ノックイン」のほかに、(遺伝子組換え)動物におけるノックイン測定法を含むことができる。成功した「ノックイン」の実施例は、当分野で周知である(特に、*T a n a k a*、*J . N e u r o b i o l . 4 1 (1 9 9 9)*、524-539または*M o n r o e*、*I m m u n i t y 1 1 (1 9 9 9)*、201-212を参照)。さらには、生化学的測定法を用いことができる。本発明の(ポリ)ペプチド(またはそのフラグメント)のその他の分子/(ポリ)ペプチド、ペプチドに対する結合、または本発明の(ポリ)ペプチド(またはそのフラグメント)のそれ自体に対する結合(二量体化、オリゴマー形成、多量体化)および、前記相互作用の特にシンチレーション近接測定法による測定が含まれるがそれに限定されるものではない。(SPA)または同種時間分解蛍光測定法(HTRFA)。

10

20

【0093】

さらに使用できる方法には、FRET(蛍光共鳴エネルギー伝達;特に、*N g*、*S c i e n c e 2 8 3 (1 9 9 9)*、2085-2089に記載されたとおり)、または蛍光極性化測定法が含まれる。これらの方法は当分野で周知であり、特に*F e r n a n d e z*、*C u r r . O p i n . C h e m . B i o l . 2 (1 9 9 8)*、547-603において記載されている。

【0094】

前記「相互作用の検査」はまた、複合体形成の測定も含むことができる。複合体形成の測定は、当分野で公知であり、特に異種系および均一系による測定を含む。均一系による測定は、結合パートナーが溶液中に残存する測定法を含み、凝集測定法のような測定法を含む。異種性の測定法は、特にイムノアッセイ、例えばELISAs、RIAs、IRMAs、FIAs、CLLAsまたはECLsのような測定法を含む。

30

【0095】

相互作用および/または本発明の(ポリ)ペプチドの結合パートナーを同定する、またはこの(特定の)細胞内結合パートナー/標的を有する、本発明の(ポリ)ペプチドの結合を妨害可能な薬剤/化合物の同定に関する、さらなる方法および測定法を、以下に開示する。前記追加のおよび/またはさらなる方法および測定法は、体重調節に関与し、および/または本発明のS O U P 1 (ポリ)ペプチドと相互作用可能な、上記の(ポリ)ペプチドを同定する方法において使用できる。

【0096】

本発明の方法の任意の測定または検出のステップは、コンピュータ技術によって補助することができる。例えば、本発明に基づいて、前記検出および/または測定ステップは、イメージ分析、分光法または流動細胞計測法を含んだ種々の手段によって自動化することができる。

40

【0097】

なお別の実施例において、本発明は、1つ以上の相互作用する(ポリ)ペプチドをコードする核酸分子同定するステップをさらに含む、上記の方法に関連するものである。

【0098】

そのような核酸分子の同定は当分野で公知であり、特に特定プライマーおよび/または変性プライマーの使用法を含む。さらには、組換え技術は*S a m b r o o k*、*l o c . c i*

50

t. orinGlick (1994), "Molecular Biotechnology", ASM Press, Washingtonにおいて記載されたとおりに使用することができる。

【0099】

なお、さらなる実施例においては、本発明は、ポリペプチドまたは、動物の細胞代謝に關与する物質または恒常性を修飾する能力のある物質を同定する方法に關連し、そのステップは下記の通りである：

(a) 本発明のポリペプチドとの相互作用のため、または上記の方法によって同定されたのポリペプチドまたは物質の収集を検査するステップ；および

(b) ステップ(a)において正の相互作用を示したポリペプチドを同定するステップ；
および随意的に 10

(c) 同定されたポリペプチドを用いてステップ(a)および(b)を1回以上繰返すステップ。このステップでは、新規に同定されたポリペプチドは、さらに相互作用するポリペプチドを同定するために、以前に同定されたポリペプチドをベイトとして置換する。

【0100】

上記の方法はさらに、1つ以上の相互作用する(ポリ)ペプチドコードする核酸分子を同定するステップを含むことができる。

【0101】

本発明はまた、ここに記載したように、核酸分子の使用法、またはここに記載されたように、ポリペプチド検出および/または遺伝子および/または遺伝子産物の単離、細胞代謝の機能的カスケード、具体的にはエネルギー代謝の機能的カスケードに關与する使用法を提供する。 20

【0102】

そのうえ、本発明は、哺乳動物における体重調節に關与するポリペプチドを同定する方法に關連するものであり、そのステップは下記の通りである：

(a) 本発明のポリペプチド、そのフラグメントまたは本発明の融合タンパク質またはそのフラグメントを有するポリペプチドの収集物に、前記(ポリ)ペプチドの結合を許容する条件下で接触させるステップ；および

(b) ステップ(a)で本発明の前記ポリペプチドまたは本発明の融合タンパク質に対して結合しなかった(ポリ)ペプチドの前記収集から(ポリ)ペプチドを除去するステップ
。および 30

(c) 本発明の前記ポリペプチドまたは本発明の融合タンパク質に結合する(ポリ)ペプチドを同定するステップ。

【0103】

上記の方法は、当業者によって実行されることができる。ステップ(a)の前記「接触」は、本発明の(ポリ)ペプチドおよび/またはそのフラグメントと共役する(磁石)ビーズを使用して、特に溶液で行うことができる。例えば、磁力分離、重力、親和性カラム系および対応洗浄、その他同種類のものを含む、非結合(ポリ)ペプチドは、当分野で周知の方法によって容易に除去することができる。

【0104】

結合(ポリ)ペプチドを同定する方法は、当分野で周知であり、特にSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)分析、およびウエスタンブロット法を含む。さらには、2Dゲル電気泳動、ゲル内温浸、マイクロシーケンシング、N末端シーケンシング、MALDI-MS、質量分析におけるペプチドの分析、ペプチド質量フィンガープリント法、PSD-MALDI-MSおよび/または(マイクロ)HPLCのような技術がある。同定される分離ポリペプチドは、特にエドマン分解法、MALDI-MS法、ラダーシーケンシング法(Thiede、FEB 357(1995)、65)によって、さらに分析することができる。

【0105】

上記の(およびその他の当分野で周知の)方法を使用することによって、同定される(ポ 50

リ) ペプチドのアミノ酸配列は演繹および配列される。これらの配列されたアミノ酸のフラグメントから、変性オリゴヌクレオチドは、演繹および合成することができ、これらを用いて、例えばゲノムまたはcDNAライブラリをスクリーニングし、対応遺伝子/cDNAを同定およびクローン化することができる。

【0106】

さらには、ファージディスプレイアプローチを本発明の方法に使用することができる。ファージディスプレイは、所定の分子と相互に影響するタンパク質の同定を許容する。それぞれ異なるペプチドエピトープ(抗原決定基)を示すファージのライブラリは、所定の分子に対する結合に関してテストされる。結合ファージは精製することができ、ペプチドエピトープ(抗原決定基)をコードする挿入フラグメントを配列することができる。ファージディスプレイキットは当分野で周知であり、市販の例としてはDisplay Systems Biotech Cat. No. 300-110があげられる。

10

【0107】

本発明は、さらに別の実施例において、前記本発明の(ポリ)ペプチドが固形担体に固定されている、ここに記載の方法に関連するものである。

【0108】

固形担体は当分野で周知であり、特に市販のカラム材料、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁力ビーズ、膠質金属粒子、ガラスおよび/またはシリコン素子およびシリコン面、ニトロセルロース条片、膜、シート、duracities、反応トレーのウェルおよび壁、プラスチックチューブなどを含む。本発明の前記(ポリ)ペプチドを固定化/不動態化するのに望ましい方法は公知であり、イオン性相互作用、疎水性相互作用、共有結合相互作用およびその他同種類が含まれるがそれに限定されるものではない。

20

【0109】

特定の望ましい実施例において、前記固形担体はゲルろ過または親和性クロマトグラフィー材料である。

【0110】

上記の本発明の方法のより望ましい実施例において、前記結合(ポリ)ペプチドは、ステップ(c)における前記同定に先行して解離される。

【0111】

前記解離は、溶出によって発効することができる。そのような溶出方法は当分野で周知であり、特に異なるイオン強度または異なるpHの溶液を用いた溶出、または薬剤/分子/ペプチドのインターカレートまたは競合を利用した溶出を含む。

30

【0112】

さらには、より望ましい実施例において、本発明は、前記方法に1つ以上の結合(ポリ)ペプチドをコードする核酸分子を同定するステップが含まれている本発明の上記の方法に関連するものである。

【0113】

上記に指摘したように、前記核酸分子を、特に変性プライマー/オリゴヌクレオチドまたは発現クローン化を用いて演繹して、対応遺伝子および/またはcDNAを検出することができる。

40

【0114】

本発明の核酸分子の発現に影響する化合物を同定する方法は下記のステップから成る。

【0115】

(a) 請求項1から9までのいずれか1項に記載の核酸分子または請求項36または42に記載の方法により同定され、動作可能に読み取り系へ連結された核酸分子を含む発現ベクターを有する宿主を、化合物または化合物混合物と接触させるステップ、

(b) 前記接触の結果が、前記読み取り系によって起こるシグナル強度を変化させるかどうかを分析するステップ、場合により

(c) ステップ(b)においてシグナルの変化を誘導する化合物を化合物混合物から同定するステップ(ここでは、シグナル強度の前記変化は、前記核酸分子の発現の変化に相関

50

する)。

【0116】

さらに本発明は、上記の定義のとおり(ポリ)ペプチドの活性に影響する化合物を同定する方法を提供し、その方法は下記のステップから成る。

【0117】

(a) 効果的に読み取り系と連結する、請求項1から9までのいずれか1項に記載の核酸分子を含みかつ/または読み取り系と連結する本発明の(ポリ)ペプチドを有する発現ベクターを有する宿主を、化合物または化合物混合物と接触させるステップ、

(b) 前記接触の結果、読み取り系によって起こるシグナル強度の変化があるかどうかを分析するステップ; 場合により

(c) ステップ(b)でシグナル変化を誘導する化合物を化合物混合物から同定するステップ(ここでは、前記シグナル変化が前記(ポリ)ペプチドの活性変化に相関することを特徴とする)。

10

【0118】

本発明の方法に照らして上記に使用された用語「活性」には、本発明の(ポリ)ペプチドの「機能」も含まれる。前記機能は上記のように、酵素活性またはその他の機能、特にシグナル伝達経路における介入などを含むことができる。そのような活性およびそのような活性の修飾因子は、ここに記載したように好都合な生体外または生体内測定法によって、またはその変動によって決定および/または同定することができる。根底にある技術は、

20

【0119】

本発明の核酸分子に動作可能なように連鎖した、または本発明の(ポリ)ペプチドに連鎖した読み取り系はここに開示され、放射性の標識に基づく測定法、発光、蛍光などが含まれるがそれに限定されるものではなく、特に、前記読み取り系は、蛍光共鳴エネルギー伝達(FRET)を含むことができる。上記の方法は、特に(自動化)高処理量スクリーニングにおいて有用である。本発明に照らして、上記の「動作可能なように本発明の核酸分子に連鎖した読み取り系」はまた、例えば核酸分子、特にその他のプラスミド、ベクターなどのような、異なる分子上に位置する読み取り系をも含む。

【0120】

上記方法のステップ(a)の前記宿主は、原核宿主細胞であり得る。前記宿主細胞は、酵母菌細胞または植物細胞であり得る。前記真核生物の宿主細胞が哺乳動物の宿主細胞であることは特に望ましい。但し、前記宿主細胞は、例えば細菌のような真核細胞でもあり得る。特に望ましいのは、真核(宿主)細胞が上記の場合である。

30

【0121】

本発明の方法における用語「化合物」には、単一物質または同一または同一でない複数物質が含まれる。前記化合物は、例えば試料、例えば植物、動物または微生物などからの抽出細胞に含まれることができる。さらには、前記化合物は当分野で周知であるが、本発明の(ポリ)ペプチドの活性に影響可能なこと、または本発明の核酸分子の発現に影響可能であることは、それぞれ周知されていない。複数個の化合物は、例えば生体外試料に添加すると培地を培養または細胞に注入することができる。

40

【0122】

試料(化合物の収集)が、本発明の方法において同定された化合物を含んでいる場合、化合物を該当の化合物を含んでいると同定された本来の試料から単離すること、または本来の試料をさらに細区画すること、例えば、資料に複数の異なる化合物が含まれている場合、試料ごとに含まれている異なる物質の数を減少させるため、本来の試料の細区画をさらに細区画する作業を繰返すことはいずれも可能である。前記試料または化合物が所望の特性を示すかどうかはここに記載した当分野で周知の方法によって決定することができる。試料の複雑さにより、上記のステップを何回か繰返すことができるので、試料が本発明の方法によって限定された数、または1つのみの物質を含むと同定されるまで、ステップを繰返すことが望ましい。前記試料が類似の化学的および/または物理的な性質の物質を

50

含みことが望ましく、前記物質が全て同一であることが最も望ましい。本発明の方法は、当業者によって、例えば従来の技術に記載されているその他の細胞基調測定法に従って容易に実施およびデザインすることができる（例えば、EP-A-0403506を参照）。さらには、当業者は、どの化合物および/または細胞が本発明の方法を実施するために使用することができるかを容易に認識できる。例えば、上記の宿主細胞または酵素は、必要に応じて、例えば前駆物質化合物を、次々に本発明の核酸分子の発現に影響および/または本発明の（ポリ）ペプチドの活性に影響する、活性化合物に転換する。

【0123】

そのような本発明方法の順応は、当業者の能力範囲で行なうものとし、必要以上の実験を行わずに実施され得る。

10

【0124】

本発明に記載の方法に従って使用できる化合物には、特にペプチド、タンパク質、およびcDNA発現ライブラリ、抗体、小有機の化合物、結合基、PNAsその他同種類のものを含んだ核酸が含まれる。前記化合物はまた、機能的誘導体または周知の活性化剤または阻害剤の類似体であり得る。化学的誘導体および類似体の調製（調合）のための方法は、当業者に公知であり、例えばBeilstein（前掲）に記載されている。さらには、前記誘導体および類似体の効果は、当分野で周知の方法および/またはここに記載した方法に従ってテストすることができる。さらには、疑ペプチド（peptidomimetic）および/または本発明の核酸分子の発現の適切な活性化剤または阻害剤のコンピュータ支援設計、または本発明の（ポリ）ペプチドの活性のコンピュータ支援設計を、例えば、ここに記載した方法に従って用いることができる。例えば、タンパク質およびペプチドのコンピュータ支援設計のための適切なコンピュータ装置は、従来の技術、例えばBerry, Biochem. Soc. Trans. 22 (1994), 1033-1036; Wodak, Ann. N. Y. Acad. Sci. 501 (1987), 1-13; Pabo, Biochemistry 25 (1986), 5987-5991に記載されている。上述のコンピュータ分析から得た成果は、本発明の方法、例えば、「周知の化合物、物質または分子の最適化」と共に使用することができる。適切な化合物はまた、連続的な化学的修飾および結果として生じる化合物の検査、例えば、ここに記載の方法を通して、疑ペプチド（peptidomimetic）組み合わせライブラリの合成によって同定することができる。生成および疑ペプチド（peptidomimetic）組み合わせライブラリの使用法に関する方法は、従来の技術、例えばOstresh, Methods in Enzymology 267 (1996), 220-234 and Dorrner, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 709-715において記載されている。さらには、三次元および/またはSOUP1タンパク質またはsoup1核酸分子の阻害剤または活性化剤の結晶学的な構造は、本発明の方法においてテストされる、本発明の（ポリ）ペプチドの疑ペプチド（peptidomimetic）阻害剤または活性化剤のために使用することができる（Rose, Biochemistry 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 1545-1558）。

20

30

【0125】

特に望ましい実施例において、上記の本発明の方法では、シグナル強度の前記変化はシグナル強度の上昇またはシグナル強度の減少を意味する。本発明の核酸分子の発現および/または本発明の（ポリ）ペプチドの活性に影響する、化合物を同定するための本発明の上記方法は、前記化合物のスクリーニングにも使用することができる。

40

【0126】

なお、さらなる実施例において、本発明は、動物における本発明の1つ以上のポリペプチドまたは1つ以上の融合タンパク質の発現の影響を評価する方法を提供し、その方法は下記のステップから成る。

【0127】

(a) 核酸分子コーディングを前記動物における本発明のポリペプチドまたは融合タンパ

50

ク質に対して過剰発現するステップ；および

(b) 前記動物の重量が増加したか減少したか、代謝変化が誘発されたかどうか、および/または摂食行為が修飾されたかどうかを、それぞれ判定するステップ。

【0128】

同様に、本発明はまた、動物における本発明の1つ以上の(ポリ)ペプチドまたは1つ以上の融合タンパク質の発現の影響を評価する方法に関連し、その方法は下記のステップから成る。

【0129】

(a) 核酸分子コーディングを前記動物における本発明のポリペプチドまたは融合タンパク質に対して低発現するステップ；および

10

(b) 前記動物の重量が増加または減少したか、代謝変化が誘発されたかどうか、および/または摂食行為が修飾されたかどうかを、それぞれ判定するステップ。

【0130】

上記の遺伝子組換え動物は、上記の1つ以上の本発明の(ポリ)ペプチドの発現の影響を評価する方法にとって特に有用であり得る。上記の本発明の核酸分子の「低発現」には、特に、両対立遺伝子の全欠損、または任意単一の対立遺伝子の除去が含まれる。さらに、前記用語には、試験動物における低機能的タンパク質/(ポリ)ペプチドの発現を引き起こす突然変異の生成が含まれる。

【0131】

上述のポリペプチドの結合標的および薬剤との相互作用を調整する薬剤をスクリーニングする方法は下記のステップから成る。

20

【0132】

(a)

(aa) 請求項13に記載のポリペプチド、またはそのフラグメントまたは請求項14または15に記載の融合タンパク質またはそのフラグメント

(ab) 前記(ポリ)ペプチドまたは融合タンパク質またはそのフラグメントの結合標的/薬剤、

(ac) 候補薬剤

を含有する混合物を、前記(ポリ)ペプチド、融合タンパク質またはそのフラグメントが基準親和性で前記結合標的/薬剤と特異的に結合する条件でインキュベートし、

30

(b) 前記(ポリ)ペプチド、融合タンパク質またはそのフラグメントと前記結合標的との結合親和性を検出し、(候補)薬剤の偏向親和性を測定し、

(c) (候補)薬剤偏向親和性と基準親和性との差を決定する。

【0133】

上記に指摘したように、本発明の(ポリ)ペプチドの特定の結合標的および薬剤は、シグナル伝達経路および/または特定のレセプターの本発明の(ポリ)ペプチドとの接触に関与する分子を含むことができる。但し、本発明の(ポリ)ペプチドの前記結合標的および薬剤は、前記(ポリ)ペプチド自体であり、特に二量体化または多量体化を引き起こすことも構想される。さらなる(天然および人工)結合標的および薬剤は、当分野で周知な方法および本明細書で開示する方法によって同定され得る。

40

【0134】

本発明の(ポリ)ペプチドの相互作用の「リファランス親和性」およびその結合標的および薬剤は、当分野で周知の方法によって確立および/または演繹され得る。前記方法には、生体外および生体内方法が含まれるがそれに限定されるものではなく、ここに記載したように結合アッセイを含み得る。具体的には、前記結合アッセイは、本発明の(ポリ)ペプチドの結合標的および薬剤との分子相互作用が評価されるような任意の測定法を含む。前記結合標的および薬剤は、天然(例えば細胞内の)結合標的および薬剤、例えば、S O U P 1 基質、S O U P 1 (ポリ)ペプチド自体、S O U P 1 (ポリ)ペプチド制御因子および/またはシグナル伝達カスケードの分子を含むことができる。本発明の範囲内では但し、本発明の(ポリ)ペプチドの非天然の結合パートナーは、例えば、抗体または誘導體

50

および/またはそのフラグメント、アプタマーのほかに、非天然のレセプター分子をも含むことができる。前記結合標的および薬剤はまた、アンタゴニストのほかに本発明の(ポリ)ペプチドのアゴニストもまた含む。

【0135】

本発明の(ポリ)ペプチドの特定の親和性、活性および/または機能は、好都合な生体外、細胞基調または生体内測定法、例えば動物における生体外結合アッセイ、細胞培養測定法(例えば遺伝子療法、遺伝子組換え)、などによって決定することができる。結合アッセイは、本発明の(ポリ)ペプチドの分子の結合標的との相互作用が評価される任意の測定法を含む。結合標的は、前記本発明の(ポリ)ペプチド自体のオリゴマー形成(二量体化、多量体化)、基質または前記本発明の(ポリ)ペプチドの調節タンパク質または、本発明の(ポリ)ペプチドの活性または(細胞)局在性を直接的に調整する他の制御因子のような、天然細胞内結合標的であり得る。さらなる結合標的および薬剤は、抗体のような特定の免疫のタンパク質のような非天然結合標的、または以下に記載されたようにスクリーニング測定法において同定されたようなS O U P 1(ポリ)ペプチド特定の薬剤を含む。

10

【0136】

特定のスクリーニング測定法は、特にU S 5、8 5 4、0 0 3またはU S 5、6 3 9、8 5 8において開示されている。本発明の(ポリ)ペプチドの特定の結合薬剤は、ヘプタペリカルレセプターのファミリーのレセプターのようなS O U P 1特異性のレセプターを含むことができる。その他の天然S O U P 1結合標的は、開示された材料および方法およびその他の当分野で周知の方法を用いて、細胞、細胞膜および細胞抽出物および画分をスクリーニングすることによって、容易に同定される。例えば、本発明の(ポリ)ペプチドの天然細胞内結合の標的は、1 - ハイブリッド、2 - ハイブリッド、および3 - ハイブリッドスクリーンのような測定法を用いて同定され得る。加えて、生化学的精製製法、細胞抽出物からの共沈殿測定法、相互作用捕集装置、発現クローン化(例えば、ラムダg t 1 1を使用する細菌中、またはプラスミド発現ベクターを使用する原核細胞系中)、ファージディスプレイ、その他同種類の方法が、天然のs o u p 1結合薬剤を同定するために利用し得る。非天然の細胞内結合薬剤は、以下に記載されたように、化学的ライブラリのスクリーンにおいて取得し得る。

20

【0137】

本発明は、S O U P 1の調節可能な細胞機能のレベルで、薬理的な薬剤、化合物または主要化合物薬剤活性を同定する効果的な方法を提供する。一般に、これらのスクリーニング方法は、天然のS O U P 1結合標的を用いて本発明の(ポリ)ペプチド相互作用調節する化合物の測定法に關与する。標識化生体外タンパク質 - タンパク質結合アッセイ、免疫測定法、細胞基調測定法などを含んだ薬剤結合のためのさまざまな測定法が提供されている。これらの方法は自動化、主要化合物のための化学的ライブラリのコスト効果の高い高処理量スクリーニングができるように修正可能であり、直ちに使用できるアプリケーションが国内および国際向けの医薬品およびバイオテクノロジー薬物開発プログラム用に広範に用意されている。同定された試薬は、医薬品工業において動物およびヒト試行用にその用途を見出すであろう。例えば、医薬品開発のために、試薬を誘導体化し、生体外および生体内測定法で再スクリーンを行なうと、活性を最適化し、毒性を最小にすることができる。

30

40

【0138】

生体外結合アッセイは、例えばタグ検出または固着などのような他のペプチドまたは(ポリ)ペプチドを用いた融合生成物の一部であり得る本発明の(ポリ)ペプチド含む成分の混合体を使用する。これらの方法において使用される本発明の(ポリ)ペプチドまたはそのフラグメントは、普通単離された部分的に純粋または純粋形態において加えられ、典型的に組換え型に産生される。アッセイ混合物はまた、候補薬理的な薬剤を異なる濃度で含む。候補薬剤は、多くの化学クラスを含み、典型的には有機の化合物だが; 有利には小有機の化合物である。小有機化合物は、5 0 D a以上だが約2、5 0 0 D a以下、有利に

50

は約 1、000 Da 以下、より有利には、約 500 Da 以下の分子量を有する。候補薬剤は、タンパク質および/または DNA、および典型的には少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシルまたはカルボキシル基、有利には少なくとも 2 つの機能的化学的基、より有利には少なくとも 3 つの機能的化学的基との構造上の相互作用に必要な機能的化学的基を含む。候補薬剤はしばしば、周期性の炭素または複素環式構造および/または芳香族または 1 つ以上の前記機能的基と置換されたポリ芳香族構造を含む。候補薬剤はまた、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、プリミジン (pyrimidines)、誘導体、構造上の類似体またはその組み合わせ、その他同種類のものを含んだ生体分子間に見出される。薬剤が存在するところ、または形質移入された核酸によりコードされるところでは、前記核酸は典型的に DNA または RNA である。

10

【0139】

候補薬剤は、合成または天然化合物のライブラリを含んだ、さまざまな源から取得する。例えば、さまざまな有機化合物および生体分子のランダムおよび直接合成のための多くの手段が入手可能である。あるいは、細菌、真菌、植物、および動物抽出物の形態での天然化合物のライブラリは入手可能であり、容易に産生される。そのうえ、従来の化学的、物理的、および生化学的な手段を通して、天然および合成的に産生されたライブラリおよび化合物は、容易に修飾される。加えて、アシル化、アルキル化、エステル化、アミジン化 (amidification) などのような周知の薬理学的薬剤は、構造上の類似体を産出するために、有向またはランダムな化学的修飾の対象であり得る。

【0140】

20

種々の他の試薬も、混合物に含まれ得る。これらには、生化学的エネルギー源として必要な試薬、例えば ATP または ATP 類似体、例えば核酸結合アッセイにおける核酸、塩類、緩衝剤、中性のタンパク質、例えばアルブミン、至適なタンパク質 - タンパク質および/またはタンパク質 - 核酸結合を促進するために、および/または非特異性またはバックグラウンド相互作用を減少させるために使用することができる洗浄剤などが含まれる。また、プロテアーゼ阻害剤、核酸分解酵素阻害剤、抗菌の薬剤などのような測定法の効率を改善する試薬を使用することができる。

【0141】

結果として生じる混合物は、候補薬理学的薬剤の存在のため、S O U P 1 ポリペプチドが特異的に細胞結合標的、部分または参照結合親和性を有する類似物を結合する条件下でインキュベートされる。混合体成分は、必要な結合およびインキュベーションを提供するような任意の順序で加えることができ、任意の温度で実施することができ、至適な結合を促進する。インキュベーション期間も同様に至適結合のために選択するが、同時に急速な、高処理量スクリーニングを促進するために最小化も行なう。一般に複数の測定法配合は、種々の濃度に対して異なる反応を得るために異なる薬剤濃度と並行して実施される。典型的に、これらの濃度の 1 つは、ネガティブコントロール (すなわちゼロ濃度または測定法の検出限界以下の濃度) として役に立つ。

30

【0142】

インキュベーション後、薬剤バイアス結合および/または本発明の (ポリ) ペプチドおよび 1 つ以上の結合標的間の親和性は、任意の好都合な方法によって検出される。無細胞結合型測定法に関して、分離ステップが、結合成分から未結合成分を分離するためにしばしば用いられる。分離ステップは種々の方法で達成できる。好都合にも、少なくとも 1 つの成分が固形基質上に固定化される。その固形基質は任意の固形で良く、未結合成分は好都合に分離される。固形基質は、例えばマイクロタイターのプレート、マイクロビーズ、尿試験紙、樹脂粒子などのさまざまな材料からさまざまな形状で作成することができる。基質は、信号雑音比を最大にするように選択され、主にバックグラウンド結合を最小にして、洗浄およびコストを容易/緩和する。

40

【0143】

分離は、例えば、ビーズまたは尿試験紙を貯蔵槽から除去することによって、等マイクロタイタープレートウェルのような貯蔵槽を空にまたは希釈することによって、ビーズ

50

(例えば鉄コア付きのビーズは、磁石を用いて容易に単離および洗浄することができる)、粒子、クロマトグラフィーのカラムまたは洗浄溶液または溶剤を有するフィルタをリンス(洗浄処理)することによって発効できる。典型的に、分離ステップには、拡張リンスまたは洗浄または複数のリンスおよび洗浄が含まれる。例えば、固形基質がマイクロタイターのプレートである場合、典型的に、塩類、緩衝剤、洗剤、非特異性のタンパク質などのような特定の物質との結合するに關与しない、インキュベーション混合体の成分が含まれている、ウェルを洗浄溶液を用いて数回にわたって洗浄する。

【0144】

あるいは、無細胞の結合型測定法は、例えばシンチレーション近接測定法(SPA)や同種の時間分解蛍光測定法(HTRFA)のような分離ステップを必要としない、均一形態において実施することができる。さらに使用できる方法は、蛍光極性化(FP)および蛍光共鳴エネルギー伝達(FRET)含む方法である。

10

【0145】

検出は任意の好都合な方法で発効し得る。1つ、2つ、および3つのハイブリッドスクリーンのような細胞基調測定法に対しては、SOP1標的結合から生じた転写は普通、直接的または直接的に検出可能な生成物をコードする(例えばガラクトシダーゼ活性、ルシフェラーゼ活性など)。無細胞の結合アッセイに対しては、普通、成分の1つが標識を含むか、または標識に共役される。さまざまな標識が使用されるが、本質的には結合タンパク質の検出を提供する標識に限られる。標識は、放射能、発光、光の分極化、光学的または電子濃度などの直接検出を提供することができ、またはエピトープタグ、酵素などのような間接検出も提供できる。標識は、タンパク質、例えば亜リン酸の放射性同位元素を含んでいるリン酸塩基に付属することができ、またはタンパク質構造、例えば硫黄の放射性同位元素を含んでいるメチオニン残基に取り込まれることもできる。

20

【0146】

種々の方法を用いて、標識の性質およびその他の測定法成分によるが、特定の標識を検出することができる。例えば、標識を含んだ固形基質または結合複合体の一部に結合した標識は、その固形基質から分離された後に検出することができる。標識は、光学または電子濃度、照射性の放出、非照射性エネルギー伝達、分極光放出などを通して直接的に検出することができ、または抗体抱合体などを用いて直接的に検出することができる。例えば、放射性標識における場合、例えば粒子カウンタを用いると、放出を直接的に検出することができ、または例えばシンチレーション反応混液およびカウンタを用いると間接的に検出することができる。

30

【0147】

薬剤の欠如における標的に対する本発明の(ポリ)ペプチドの結合親和性における差異は、薬剤の存在下で結合親和性と比較すると、薬剤が、SOP1ポリペプチドのSOP1結合標的に対する結合を調整するを示す。ここに使用される差異は、統計的に有意であり、有利には少なくとも50%、より有利には少なくとも90%の差異を表す。

【0148】

類似して、細胞基調測定法において、薬剤が存在するする場合と欠如している場合のSOP1依存的活性の差異は、薬剤がSOP1細胞機能またはSOP1発現を調整することを示す。そのような細胞基調アプローチには、一過性または安定発現アッセイが関与する。この方法において、細胞は、つまり一部の本発明の(ポリ)ペプチドおよびsop1反応性のプロモーターの転写コントロール下にあるレポーターを含むポリペプチドをコードする1つ以上の構成物によって形質移入される。細胞はまた、SOP1活性化剤、例えばレセプター刺激可能なSOP1活性などをコードする構成物によって有利に形質移入されることができる。あるいは、脂肪プロモーター自体が、望ましいレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼに連鎖することができ、および細胞-30基調測定法で用いられると、上方制御または下方制御を経由して脂肪発現の調節可能な化合物用にスクリーニングすることができる。

40

【0149】

50

ここに記載された方法は、特にロボット液体予製のワークステーションを使用する自動化高処理量薬物スクリーニングに適している。類似のロボット自動化は、高処理量細胞メッキおよび種々の測定法読み取りの検出のために利用できる。

【0150】

結合パートナーを用いて、本発明の核酸分子の発現または本発明の（ポリ）ペプチドの関連を調節するために示された候補薬剤は、動物およびヒト試行用に役立つ試薬を医薬品工業に提供する。標的治療学的指標は、標的 *s o u p 1* 細胞機能（例えば、結合パートナーを用いる遺伝子発現または関連）が調節の対象となる場合のみに限定されている。特に、候補薬剤から取得した薬物スクリーニング測定法および被験者組成物、例えば *s o u p 1* に由来する核酸または治療学的なポリペプチドは、肥満症の治療、癌のような喪失に関連した障害、感染性の疾病および *H I V* 感染、または過食症を含んだ体重調節およびエネルギー恒常性に関連した疾病における治療学的な治療的用例を提供する。下記に記載されているように、治療学的な用途に対しては、組成物および薬剤は、任意の好都合な方法、有利には非経口的に、好都合なことには生理的に受容可能な担体、例えばリン酸塩緩衝生理食塩水で、生理食塩水、脱イオンされた水、またはその他同種類のものによって投与することができる安定剤、殺菌剤などのような、その他の添加物も含むことができる。典型的には組成物は、血液のような保持された生理的液体または滑液の液体に加えられる。一般に、投与量は経験的に決定され、例えば治療学的な目的、投与経路、患者および条件によって決まる。典型的に、臨床家は、投与量が必要とされる生物学的効果を提供する量に達するまで本発明の分子を投与する。この療法の進捗状況は、従来の測定法によって容易にモニターされる。

10

20

【0151】

化合物を精製する方法または本発明の方法によって同定された薬剤は下記から成る。

【0152】

（a）前記化合物によって疑ペプチド（*p e p t i d o m i m e t i c*）のモデリング；および

（b）モデル化合物の化学的合成

疑ペプチド（*p e p t i d o m i m e t i c*）は当分野で公知であり、特に *B e e l e y , T r e n d s B i o t e c h 1 2 (1 9 9 4) , 2 1 3 - 2 1 6 , W i l e y , M e d . R e s . R e v . 1 3 (1 9 9 3) , 3 2 7 - 3 8 4 , H r u b y , B i o p o l y m e r s 4 3 (1 9 9 7) , 2 1 9 - 2 6 6*、において開示され、または参照に引用または上記参照に引用されている。

30

【0153】

生成の方法および疑ペプチド（*p e p t i d o m i m e t i c*）組み合わせライブラリの使用法は、従来の技術において記載されている、例えば *O s t r e s h , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 6 7 (1 9 9 6) , 2 2 0 - 2 3 4 a n d D o r n e r , B i o o r g . M e d . C h e m . 4 (1 9 9 6) , 7 0 9 - 7 1 5*において。化学的誘導体および類似体の化学的合成および／または調製（調合）のための方法は、当業者に公知であり、例えば *B e i l s t e i n (前掲)* および "*O r g a n i c S y n t h e s i s*", *W i l e y , N e w Y o r k , U . S . A (前出)* に記載されている。

40

【0154】

上記の疑ペプチド（*p e p t i d o m i m e t i c*）方法および／または化学的合成、修飾または精製に関する方法はまた、本発明の化合物上、例えば（ポリ）ペプチド上または本発明の融合タンパク質上に直接的に使用することができことが本発明において構想されている。

【0155】

本発明は、本発明の化合物を含み処方する成分を産出する方法、ここに記載した方法によって同定された化合物または薬剤、または、医薬用に受容可能な担体および／または希釈剤を用いて上記の方法によって精製された化合物に関連するものである。

【0156】

50

望ましい医薬品担体の実施例、賦形剤および／または希釈剤は当分野で周知であり、リン酸塩緩衝生理食塩水溶液、水、乳濁液、油／水のような乳濁液、種々のタイプの湿潤剤、消毒した溶液などが含まれる。そのような担体を含む組成物は、従来の公知の方法によって調剤することができる。これらの医薬品組成物は、被験者に望ましい投与量で投与されることができる。望ましい組成物の投与は、幾つかの異なる方法、例えば、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、筋肉内投与、局所的投与、皮内投与、鼻腔内投与または気管支内投与によって発効することができる。投与量の投与計画は、主治医および臨床の要因によって決定されることができる。医術分野において公知のように、任意の患者に対する投与量は、患者のサイズ、体図面積、年令、投与される特定の化合物、性別、投与の時間および経路、一般的な健康、およびその他の同時に投与される薬物を含んだ多くの要因に依存する。タンパク性の医薬用活性物質は、1投与当たり1 ng ~ 10 mgの量処方してよい。但し、特に前記の要因を考慮すると、この模範的範囲の以下または以上も想定される。投与計画が継続的な注入の場合、投与範囲は体重1キログラム当たり毎分1 μg ~ 10 mg単位とする。進歩状況は定期的なアセスメントによってモニターされ得る。本発明の組成物は、局所的または全身的に投与することができる。本発明の組成物はまた、直接的に標的部位、例えば遺伝子銃送達によって、内部または外部の標的部位に投与、またはカテーテルによって動脈内の部位に送達することもできる。非経口的な投与の製剤（調合）には、消毒水溶性または非水溶性溶液、検査液、および乳濁液が含まれる。非水溶性溶剤の例には、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような野菜油、および注射用のオレイン酸エチルのような有機のエステルがあげられる。水溶性担体には、乳濁液または検査液、生理食塩水および緩衝培地を含んだ水、アルコール性／水溶性の溶液、が含まれる。非経口的な媒介物には、塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖リンゲル液、ブドウ糖および塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液、または不揮発性油が含まれる。静脈内の媒介物には、液体および栄養素補充薬、電解質補充薬（ブドウ糖リンゲル液上の基調のような）、その他同種類のものが含まれる防腐剤およびその他の添加物、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート化剤、および不活性ガス、その他同種類のものも存在する。さらには、本発明の医薬品組成物は、医薬品組成物の使用目的によって、さらなる薬剤を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0157】

そのうえ、本発明は、本発明の化合物または化合物または本発明の方法によって同定された薬剤を含む成分を産出する方法を提供し、その方法は下記のステップから成る。

【0158】

(a) 本発明の化合物または本発明の方法によって同定された化合物または薬剤を出発化合物として変性し、

(i) カルボキシル基のエステル化、または

(ii) ヒドロキシル基のカルボン酸によるエステル化、または

(iii) ヒドロキシル基をエステル化して、例えばホスフェート、ピロホスフェートまたはスルフェートまたはヘミサクシネートとする、または

(iv) 製薬学的に使用可能な塩の形成、または

(v) 製薬学的に使用可能な錯体の形成、または

(vi) 製薬学的に活性なポリマーの合成、または

(vii) 親水性部の導入、または

(viii) 芳香族または側鎖上の置換基の導入／変換、置換パターンの変更、または

(ix) 等配電子または生物等比体積部の導入による変性、または

(x) 類似化合物の合成、または

(xi) 分枝側鎖の導入、または

(xii) アルキル置換基の環状類似体への変換、または

(xiii) ヒドロキシル基のケタール、アセタールへの誘導、または

(xiv) アミド、フェニルカルボメートへのN - アセチル化

(xv) マンニヒ塩基、イミンの合成、または

(x v i) ケトンまたはアルデヒドのシッフの塩基、オキシム、アセタール、ケタール、エノレスター、オキサゾリジン、チアゾリジンへの変性、またはそれらの組合せによる、

(i) 作用部位、活性スペクトル、器官特異性の変性、および / または

(i i) 力価の改善、および / または

(i i i) 毒性の低下 (治療係数の増加)、および / または

(i v) 副作用の減少、および / または

(v) 治療作用の開始、有効期間の変性

(v i) 薬物動態パラメーター (再吸収、分布、代謝および分泌) の変性、および / または

(v i i) 物理化学パラメーター (溶解度、吸湿性、色、味、臭い、安定性、状態) の変性、および / または

(v i i i) 一般的特性、器官 / 組織特異性の改善、および / または

(i x) 適用形および適用経路の最適化

を実施するステップ; および

(b) 前記のように変性した生成物を製薬学的に使用可能なキャリアーと配合するステップ。

【0159】

上記のように、医薬品受容可能担体は当分野で周知である。また、本発明の化合物、すなわち本発明の融合タンパク質の (ポリ) ペプチドまたは、本発明の核酸分子が、成分を産出する上記の方法において使用されることが構想される。有利には、前記成分は、ここに記載したように医薬品組成物である。

【0160】

以上の点から、より望ましい実施例において、本発明は、本発明の化合物または本発明の方法によって同定された化合物または薬剤を含んでいる成分を産出する方法に関連するものである。ここで、前記成分は、特に、以下に記載されたように、肥満症、脂肪過多症、摂食障害、過食症、衰弱および / または体重 / 体質量の増加または減少を引き起こす障害を防止または治療する医薬品組成物である。

【0161】

本発明は、本発明の化合物または本発明の方法によって同定された化合物または薬剤を含んでいる成分を産出する方法に関連するものである。ここで、前記成分は、特に、以下に記載されたように、肥満症、脂肪過多症、摂食障害 (例: 神経性過食症、神経性食欲不振症)、消耗性症候群 (例: カヘキシー)、ミトコンドリアの障害、膵臓の機能障害 (例: 糖尿病)、インシュリン抵抗性の予防、ROS 産出に関連する障害 (例: 感染、癌、老化に対する反応) を防止、軽減または治療する医薬品組成物であることは特に望ましい。

【0162】

なお他の実施例において、本発明は、下記の成分からなる化合物を提供する。

【0163】

(a) 本発明の方法によって同定または精製された本発明の (ポリ) ペプチドの阻害 (抑制) 薬;

(b) ここに記載した方法または本発明の核酸分子によって同定された遺伝子の発現の阻害 (抑制) 薬; および / または

(c) 本発明の方法によって同定された化合物。

【0164】

本発明の (ポリ) ペプチド前記阻害 (抑制) 薬は、野生型の本発明の (ポリ) ペプチド、S O U P 1 タンパク質の阻害 (抑制) 薬として機能する化合物であり得る。体重減少の誘発を引き起こすことができる前記阻害 (抑制) 薬は、調節細胞 (膵臓のベータ - 細胞) に影響し、それによってベータ - 細胞機能を改善し、またはインシュリン抵抗性を防止し、ROS (活性酸素種) 産出を変更し、減少した ROS 濃度 (老化において減少された分子損傷、発癌および増加された虚血耐性を誘発) を引き起こすことができる。但し逆の効果

10

20

30

40

50

も、組織特定の反応および代謝状況のために発生し得る。前記阻害（抑制）薬はまた、本発明の（ポリ）ペプチド変異形態と特異的に相互作用する阻害（抑制）薬でもあるため、体重の減少を引き起こしたり、または現在の体重を維持を維持することができる。

【0165】

本発明の方法によって同定された用語（ポリ）ペプチドの「阻害（抑制）薬」はまた、本発明の方法によって同定されるにつれて相互作用する（ポリ）ペプチドの活性および／または機能に影響する阻害（抑制）薬に関連するものであることが理解されている。前記相互作用は直接または間接のいずれでもあり得る。前記「阻害（抑制）薬」はまた、ここに定義されたようにその結合標的および薬剤を用いて、本発明の（ポリ）ペプチドの相互作用を妨害および／またはを修飾することができる。上記は、用語「本発明の核酸分子の発現の阻害（抑制）薬または本発明の方法によって同定された遺伝子の阻害（抑制）薬」に準用する。前記阻害（抑制）薬は、転写および／または翻訳プロセスを妨害する場合がある。

10

【0166】

同様に、本発明は下記の成分からなる組成物に関連する。

【0167】

- （a）上記の方法によって同定または精製された本発明の（ポリ）ペプチドまたは（ポリ）ペプチドの刺激剤；
- （b）本発明の核酸分子の発現の刺激剤または本発明の方法によって同定された遺伝子の刺激剤；
- （c）本発明の方法によって同定された化合物；および／または
- （d）本発明のベクター。

20

【0168】

本発明の用語「（ポリ）ペプチドの刺激作用」は、本発明の（ポリ）ペプチドの刺激剤（活性化剤）として機能する化合物に関連するものである。前記刺激剤／活性化剤は、重量増加の誘発を引き起こすことができ、および喪失治療に有用である。前記刺激剤／活性化剤はまた、免疫の反応における有効性の増加を引き起こすROS産出を変化することができる。なお、組織特定の反応および代謝状況のために、逆の効果もまた構想される。ここに記載された「刺激剤」は、特に本発明の（ポリ）ペプチドのその結合標的との相互作用の増加を引き起こすことができる。この用語はまた、本発明の（ポリ）ペプチドの変異形態の刺激剤／活性化剤に関連するものである。変異形態の前記刺激剤は、体重の増加または現体重の維持をもたらすことができる。

30

【0169】

「阻害剤」のほかに「本発明の（ポリ）ペプチドの刺激剤」もまた、当分野で周知であり、本明細書で開示された方法によって、演繹および／または評価することができる。

【0170】

用語「本発明の方法によって同定または精製された（ポリ）ペプチドの刺激剤」はまた、本発明の方法によって同定されたように（相互作用する）（ポリ）ペプチドの活性／機能に影響する刺激剤にも関連するものである。それらは、前記（ポリ）ペプチドとにおける直接様式または間接様式のいずれかで相互に影響することができる。既述のように、用語「阻害（抑制）薬」は、上記に定義したように、用語「本発明の核酸分子の発現の刺激剤または本発明の方法によって同定された遺伝子」に対して準用する。

40

【0171】

上記の「阻害剤」および「刺激剤」は、（ポリ）ペプチドに関連するばかりでなく、（ポリ）ペプチドおよび／または本発明の核酸分子または本発明の方法によって同定された（ポリ）ペプチドおよび／または遺伝子に結合し、妨害し、および／または相互に影響する小分子も含むことができる。そのような小分子の実施例には、小ペプチド、有機のおよび／または有機の物質またはペプチド同様の分子、例えばDアミノ酸偽ペプチドを含まれるがそれに限定されるものではない。抗体、誘導體および／またはそのフラグメント、アプタマーまたは特定の（オリゴ）ヌクレオチドを含む前記「阻害剤」および「刺激剤」を

50

さらに含むことができる。「阻害剤」および「刺激剤」は、本明細書で開示されているように、医薬品および／または診断組成物の一部である。

【0172】

上記に指摘したように、前記「阻害剤」または「刺激剤」はまた、上記の定義のとおり小有機の化合物も含むこともできる。

【0173】

加えて、本発明は、本発明の核酸分子、本発明の（ポリ）ペプチド、本発明の融合タンパク質、抗体またはフラグメントまたはその誘導体または本発明のアプタマーまたは本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む成分に関連するものである。さらには、前記成分は、本発明の方法によって同定されたように、（ポリ）ペプチド、核酸分子、遺伝子および／または化合物または薬剤を含むことができる。

10

【0174】

本発明の望ましい実施例において、前記成分は、医薬品、例えば治療学的成分である。随意的に、医薬用に受容可能な担体をを含む医薬品組成物は上記に記載されている。本発明の医薬品組成物は、治療および／または食欲調節および／またはエネルギー代謝の複雑な障害の予防に特に有用である。

【0175】

前記医薬品組成物が、肥満症、脂肪過多、摂食障害、過食症、体重／体質量の障害の治療および／または防止において使用されることは特に望ましい。但し、前記医薬品組成物が障害様、特に、衰弱（カヘキシー）、癌または感染性の疾患が原因の体重減少または免疫不全の患者、例えばHIV患者における体重減少において使用されることも構想される。

20

【0176】

さらには、本発明の医薬品組成物は、体重／質量障害の治療において使用されたその他の薬剤と共に使用されることが構想される。前記薬剤には、食物摂取を減少／促進する薬剤、栄養素吸収を遮断／活性化する薬剤、熱産生を増加／減少する薬剤、脂肪および／またはタンパク質代謝または保管を調節する薬剤、体重を調節する中枢制御機構を調節する薬剤が含まれるがそれに限定されるものではない。

【0177】

前記薬剤は、特に、シブトラミン、オーリスタット、エフェドリンまたはカフェイン、ジエチルプロピオン、フェンテルミン、フルオキセチン、セルトラリン、またはフェニルプロパノールアミンのような薬剤を含む。

30

【0178】

さらに、本発明は、本発明の核酸分子、本発明の（ポリ）ペプチド、本発明の融合タンパク質、抗体または誘導体またはそのフラグメントまたは本発明のアプタマー、ここに定義された少なくともプライマーまたはプライマーのセットまたは本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む成分に関連するものである。特に望ましいプライマーは、補足実施例において使用されるプライマーおよび／またはSEQ ID NO: 55～60に描写されているプライマーである。

【0179】

例えば、本発明の核酸分子から演繹されたプライマーは、診断または科学的な目的に使用されることが構想される。前記プライマーを用いて、特に個体における突然変異体SOP1の遺伝子を見出すことおよび／または検証することができる。有利には、前記個体はヒトである。さらには、本明細書で開示する核酸配列から演繹されたプライマーは、具体的にはSEQ ID NO: 9、11、13および51に示すような配列からのプライマーは、さらなる種において相同性配列を検出および／または単離するために使用することができる。

40

【0180】

特定の望ましい実施例において、前記成分は診断用組成物である。前記診断用組成物は、上記の成分を含むことができ、前記成分は、上記の定義のとおりに固形担体結合に付着および／または連鎖する。前記診断用組成物が（マイクロ）チップ上に本発明の化合物を含む

50

ことがさらに構想される。以上の点から、前記診断用組成物は、特に本発明の核酸分子を、いわゆる「遺伝子チップ」上または本発明の（ポリ）ペプチドを、いわゆる「タンパク質チップ」上に含む。診断遺伝子チップは、例えば、動物の（具体的にはヒトの診断組成物および具体的には上記の診断遺伝子チップ）S O U P 1 遺伝子における突然変異体を特異的に検出する、本発明の核酸分子の収集を含み、肥満症、脂肪過多症（adipositas）、体重/体質量の障害、または摂食障害の根底にあるような患者の（遺伝的な）欠陥をスクリーニングに特に有用であり得る。

【0181】

診断用組成物において使用される本発明の前記化合物は、検出可能な程度に標識化されることが望ましい。生体分子を標識化用の入手可能な種々の技術は、当業者に公知であり、本発明の範囲内に含まれているものとする。そのような技術は、例えば、Tijssen, "Practice and theory of enzyme immunoassays", Burden, R Hand von Knippenburg (Eds), Volume 15 (1985), "Basic methods in molecular biology"; Davis LG, Dimer MD; Battley Elsevier (1990), Mayer R, (Eds) "Immunochemical methods in cell and molecular biology" Academic Press, London (1987), または "Methods in Enzymology", Academic Press, Inc. のシリーズに記載されている。

10

20

【0182】

多くの異なる標識および標識化の方法が当分野では周知である。本発明において使用することができる標識タイプの例には、酵素、放射性同位元素、コロイド性金属、蛍光性化合物、化学発光化合物、および生物発光の化合物が含まれる。

【0183】

さらには、本発明は下記の使用方法に関連する。

【0184】

- (a) 本発明の方法によって同定または精製された（ポリ）ペプチドの阻害（抑制）薬；
- (b) 本発明の方法によって同定された遺伝子の発現の阻害（抑制）薬；および/または
- (c) 本発明の方法によって同定された化合物；

30

肥満症、脂肪過多、摂食障害、消耗性症候群（例えばカヘキシー）、ミトコンドリアの障害、膵臓の機能障害、ROS産出に関連する障害のための医薬品組成物治療の調製（調合）用。

【0185】

同様に、本発明は下記の使用方法も提供する。

【0186】

- (a) 本発明の方法によって同定または精製された（ポリ）ペプチドの刺激剤；
- (b) 本発明の方法によって同定された遺伝子の発現の刺激剤；および/または
- (c) 本発明の方法によって同定された化合物；

肥満症、脂肪過多、摂食障害、消耗性症候群（カヘキシー）、ミトコンドリアの障害、膵臓の機能障害、ROS産出に関連する障害のための医薬品組成物治療の調製（調合）用。

40

【0187】

さらには、本発明は、肥満症、脂肪過多、摂食障害、消耗性症候群（カヘキシー、また癌、HIV-感染においても）、ここに記載したミトコンドリアの障害、膵臓の機能障害（例：糖尿病）、障害に関連するROS産出（例：癌、老化、感染）に対する治療、軽減および/または予防の対する医薬品組成物の調製（調合）用に本発明の方法によって同定された薬剤の使用法に関連するものである。

【0188】

加えて、本発明は、SEQ ID NO: 3 または 4 またはそのフラグメントによってコードされた遺伝子産物を過剰表現または低発現する、非ヒト動物の調製（調合）に対する

50

SEQ ID NO: 3または4 (dUCP) またはそのフラグメントに描写した核酸分子の使用法に関連するものである。前記非ヒト動物は有利にはショウジョウバエである。上記の使用法は補足実施例に図解する。

【0189】

特定の望ましい実施例において、本発明は、細胞小器官における膜安定性および/または機能に寄与可能な、ミトコンドリアのタンパク質を修飾可能な、および/または細胞代謝に影響可能な上記に定義したポリペプチドの検出用のショウジョウバエの使用法に関連するものである。

【0190】

さらには、本発明は、核酸分子、ベクター、宿主、ポリペプチド、融合タンパク質、抗体またはフラグメントまたはその誘導体または抗血清、アプタマーまたは他のレセプターおよび本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドのうち、少なくとも1つを含むキットを提供する。

10

【0191】

有利に、本発明のキットは、随意的に反応緩衝剤、貯蔵溶液および/または残存試薬または科学的または診断測定法を行なう上に必要とされる材料または他同種類をさらに含む。さらには、本発明のキットの部品は、バイアルまたはビンまたはその組み合わせ容器または多容器単位で個別にパッケージすることができる。

【0192】

本発明のキットは、特に本発明の(ポリ)ペプチド産出の方法を実行するため有利に使用することができ、ここに参照する種々の適用例、例えば、診断キット、研究用具または予防接種用具に使用することができる。そのうえ、本発明のキットは、科学的な医療および/または診断目的に望ましい検出の手段を包含することができる。キットの製造は、有利には当業者に周知の標準製法に従う。

20

【0193】

この実施例は本発明を図解するものである。

【0194】

実施例1: ヒト脱共役タンパク質(UCPs) に対して相同性を有するキイロショウジョウバエ遺伝子のクローン化

[ブラスト] 相同性検索を公共データベース(NCBI/NIH) において実施し、ヒトUCP2 およびUCP3 遺伝子に対して配列相同性を有するショウジョウバエ遺伝子を探した。検索は、UCP 相同性を有するショウジョウバエ遺伝子ファミリーの配列フラグメントを産出した。それらは明らかに、隣接する関連ミトコンドリアのタンパク質(オキシグルタミン酸担体) と異なる。

30

【0195】

この遺伝子の1つの配列フラグメントを使用して(dUCPy と称する)、PCR法プライマーペアを生成した(上位5' - CTAAACAACAATTCACAACATAG (SEQ ID NO: 1)、下位5' - AAAAGACATAGAAAAATACGATAGT (SEQ ID NO: 2))。そして標準PCR法条件を使用して、PCR法反応をショウジョウバエcDNA上に実施した。増幅生成物を放射的に標識化し、成体のショウジョウバエハエ(ストラタジーン社) から作成したcDNAライブラリをスクリーニングするために使用した。完全長cDNAクローン化を単離し、配列し(図1)、さらに先の実験に使用した。

40

【0196】

実施例2: dUCPy cDNAのショウジョウバエ発現ベクターへのクローン化 ショウジョウバエ細胞におけるdUCPyの発現効果をテストするために、制限部位NotIおよびKpnIを使用して、dUCPy cDNAを発現ベクターpUASTにクローン化した。(参照: Brand A & Perrimon N, Development 1993, 118: 401 - 415) 得られた発現構成物を、ショウジョウバエ胚の生殖細胞系列およびショウジョウバエの菌株に注入して、安定した構成物の統合が生成された。発現ベクタ

50

－pUASTは、ショウジョウバエの*ceils*には正常に非存在の酵母菌転写因子*Ga14*によって活性化されるので、これらの遺伝子組換え動物にはdUCPyがまだ発現されていない。pUAST-dUCPyハエが、*Ga14*を組織特定の様式で発現する第2のショウジョウバエ菌株と交雑する場合、この交配によるの子孫ハエは、組織を発現する*Ga14*においてdUCPyを発現する。

【0197】

その本体の全細胞において*Ga14*を発現する菌株とのpUAST-dUCPyハエの交雑種は（アクチンプロモーターの制御下で）生存可能な子孫を示さなかった。これは、全体細胞におけるdUCPyの過剰発現は致死的事であることを意味する。この発見は、dUCPyの過剰発現は細胞エネルギーの産出の崩壊を引き起こすという仮定と一致している。

【0198】

眼のような（「無眼」遺伝子の眼特異性のプロモーターの制御下にある*Ga14*）、非重要器官におけるdUCPyの発現は、可視に損傷された眼を持つハエという結果を招く（図2）。この容易に可視の眼表現型が、UCP活性を修飾できる遺伝子産物に対する遺伝的なスクリーニングの根拠である。

【0199】

実施例3：dUCPy修飾因子のスクリーニング

眼における*Ga14*発現を有する菌株のゲノム部分およびpUAST-dUCPy構成物を保有する菌株を、ゲノム組換えを用いて1つの染色体上に混合した。得られたハエ菌株は、dUCPy発現によって永久に損傷された眼を有する。この菌株のハエを変異誘発されたハエ菌株の大きな収集のハエと交雑種せしめた。この変異体収集において、特別発現システム（EP-element, 参照：Rorth P, Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93(22):12418-22）を異なるゲノム遺伝子座においてランダムに統合した。酵母菌転写因子*Ga14*はEPエレメントに結合することができず、EPエレメントの統合部位を閉じる内在性遺伝子の転写を活性化する。遺伝子の活性化は以上の点から、dUCPyを過剰発現する同一細胞（眼）において発生する。変異体収集には、EPエレメントの異なる統合部位を有する数千の菌株を含まれるので、その発現がdUCPy活性と相互作用する、多数の遺伝子をテストすることが可能である。遺伝子がUCP活性エンハンサーとして振る舞う場合には、眼欠陥は悪化する；抑制因子は欠陥を回復させる。

【0200】

このスクリーニングを使用して、抑制活性を有する新規遺伝子を発見した。この遺伝子をここに「脱共役タンパク質（SOU P1）の抑制因子」と称する。ショウジョウバエ眼におけるdUCPyと共のSOU P1の発現は、dUCPy誘発欠陥の救出を引き起こす（図2）。

【0201】

実施例4：ショウジョウバエ（dSOU P1）からのSOU P1のクローン化

EPエレメントを救出する眼欠陥に近接するゲノムDNAを、クローン化および配列せしめた。この配列を、公共ショウジョウバエ遺伝子データベースにおいて「ブラスト」検索に用いた。同一の配列を有するcDNAクローンGH22139（ショウジョウバエのゲノムプロジェクト）からの短い配列フラグメント（EST）を、データベース検索において発見した。この公的に利用できるcDNAクローンを要求し、完全に配列化せしめた（図3a）。

【0202】

実施例5：ショウジョウバエ眼におけるGH22139の過剰発現

GH22139が遺伝的に同定されたdUCPy抑制因子SOU P1に対してコードすることを確実にするために、GH22139 cDNAを発現ベクターpUASTにクローン化した（制限部位Bgl11およびXho1を使用）。生殖系列注入により、遺伝子組換え動物を生成せしめた。pUAST-GH22139遺伝子組換えハエを眼にdUCPy

を発現するハエと交雑せしめた。この交雑種の子孫 (d U C P y および G H 2 2 1 3 9 を発現するハエ) において、眼欠陥を救出せしめた。これは G H 2 2 1 3 9 c D N A が S O U P 1 をコードすることを証明した。

【 0 2 0 3 】

実施例 6 : d S O U P 1 の配列分析

生物情報学用具を用いた S O U P 1 c D N A の演繹アミノ酸配列の分析 (参照 : J . G l a s g o w ら、P r o c . S i x t h I n t . C o n f . o n I n t e l l i g e n t S y s t e m s f o r M o l e c u l a r B i o l o g y . 1 7 5 - 1 8 2 , A A A I P r e s s , 1 9 9 8) は、S O U P 1 タンパク質が、6 膜貫通ドメインを有するミトコンドリアの担体タンパク質の特有の型を持つ (図 4 a) ことを示した。

10

【 0 2 0 4 】

実施例 7 : d S O U P 1 のありうるスプライス変異体および公共データベースにおける予想遺伝子との比較

配列アライメント、膜貫通ドメイン予測およびスプライス予測は、ショウジョウバエ S O U P 1 遺伝子が異なるスプライス変異体に存在する (図 3 b、c、および図 5 a) ことを示唆している。c D N A クローン G H 2 2 1 3 9 は、異なる第 6 T M ドメインを有する 2 つのスプライス変異体 (d S O U P 1 および d S O U P 1 - s p 1) を形成することができる。公共データベースにおける完全に配列されたショウジョウバエゲノムの探索は、7 つの T M ドメインを有するスプライス変異型を示唆する遺伝子予測 (d S O U P 1 - C G 8 0 2 6、参照 A d a m s、M . D . ら、2 0 0 0 S c i e n c e 2 8 7 : 2 1 8 5) を

20

明らかにした。

変異型間の相同性は :

アミノ酸相同性 % (同一性 / 類似性)

d S O U P 1 - d S O U P 1 - C G 8 0 2 6 (8 2 / 8 2)

d S O U P 1 s p 1 - d S O U P 1 - C G 8 0 2 6 (8 9 / 8 9)

d S O U P 1 - d S O U P 1 s p 1 (9 3 / 9 4)

異なるスプライス変異型の予想 T M ドメインのアミノ酸は図 5 b ~ f に描写されている。

【 0 2 0 5 】

実施例 8 : ヒト (h S O U P 1)、マウス (m S O U P 1)、およびゼブラフィッシュ (z S O U P 1) からの S O U P 1 ホモログのクローン化

30

公共データベースにおいて、ショウジョウバエ S O U P 1 の完全な c D N A 配列を使用して、[ブラスト] 検索を実施した。異なる種 (ゼブラフィッシュ、ヒヨコ、マウス、マカク、ヒト) からのいくつかの短い、未完成の配列フラグメントが発見された。データベースの配列のいずれもが完全なヒト配列でなかったため、フラグメントを使用して P C R プライマーを合成した。P C R 法によって増幅された生成物を放射的に標識化し、ヒト脂肪細胞 c D N A ライブラリおよびヒト海馬 c D N A をライブラリをスクリーニングするためのプローブとして使用した。両方のライブラリから、c D N A クローンを単離することができた。ヒト S O U P 1 の配列を図 6 に示す。これには、特有の 6 膜貫通ドメイン型も示されている (図 4 c)。次の P C R 法プライマーを用いて、ヒト S O U P 1 遺伝子の O R F を増幅することができる : 上位 5 ' - A T G G A C T A C G G G G A C T T T A T C A A (S E Q I D N O : : 5 5)、下位 5 ' - A C C G A C G C C T T C T T T C C A A C T (S E Q I D N O : 5 6)。

40

【 0 2 0 6 】

マウス S O U P 1 の遺伝子の同定は、等価なアプローチで行なった。m S O U P 1 の配列を図 7 に示す。これには、特有の 6 膜貫通ドメイン型も示されている (図 4 d)。次の P C R 法プライマーを用いて、マウス S O U P 1 遺伝子の O R F を増幅することができる : 上位 5 ' - G G C G G C C A C T A C A T C A C G (S E Q I D N O : : 5 7)、下位 5 ' - T G C C T C A A G A A C A T A G A C T G (S E Q I D N O : 5 8)。

【 0 2 0 7 】

マウス S O U P 1 c D N A クローンの単離中、代替配列を持つクローン 6 i を単離した。

50

オープン・リーディングフレームの配列を図8に示す。演繹アミノ酸配列は、その他のマウスSOUP1クローンと3つの位置で異なる。

【0208】

ゼブラフィッシュSoup1遺伝子の同定を等価なアプローチで行なった。zSOUP1の配列を図9に示す。これには、特有の6膜貫通ドメイン型も示されている(図4e)。次のPCR法プライマーを用いて、ゼブラフィッシュSOUP1遺伝子のORFを増幅することができる：上位5' - ATGACCGCTACCA TTTCCAGGCAGAGGCAC (SEQ ID NO: 59)、下位5' - TTAGTGATAC TCGCCCAAAGCAAGCGTG A (SEQ ID NO: 60)。

【0209】

実施例9：フラグ-タグ付きmSOUP導入遺伝子の生成

カルボキシ末端にフラグ-タグ付きmSOUP導入遺伝子(ここではmSOUPフラグと称する)を、mSOUP遺伝子特異性プライマー(mSOUPフォワードプライマー：5' GGC GGCCACTACATCACG3' (SEQ ID NO: 63)、フラグ-タグ付きmSOUP逆プライマー：5' CTACTTGTCA TCA TCGTCTCTTGTAGTCGCTCACTTTCTTTTCTCTCT3' (SEQ ID NO: 64))を使用して、RT-PCRをマウス脾臓RNAから得たcDNA上で実施することによって生成した。

【0210】

実施例10：ベータアクチン-mSOUPフラグ遺伝子組換えマウスの生成

mSOUPフラグ(実施例9を参照)を、当業者であれば周知の技術(例えば、Gunnigra(1987)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4831-4835を参照)を使用して、遍在性のヒトベータアクチンプロモーターの制御下のマウスにおいて発現させた。遺伝子組換え構成物DNAを、標準技術(例えば、Brinsterら(1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4438-4442を参照)を使用して、C57/BL6マウス胚(Harl Winkelman, Borchert, Germany)に注入した。この技術を使用して、8つの非依存性マウス創始ライン(founder line)を生成した。

【0211】

実施例11：TaqMan分析を経由したmSOUP発現分析

mSOUPフラグ導入遺伝子の発現をTaqMan分析によってモニターした。この分析に対して、異なるマウス組織(例えば、大腸、心臓、肝臓、肺、胃、腸、白色脂肪組織(WAT)、胸腺、脾臓、筋肉、腎臓)に由来する、1-100ng、有利には50ng cDNA、およびmSOUP特定プライマー/プローブペア(mSOUPフォワードプライマー(SEQ ID NO: 65))を使用した：5' - CTCTGTCTGCGAGCGCTATCC - 3'、mSOUP逆プライマー(SEQ ID NO: 66)：5' - GAAGGCGGGCTCTCAACAAC - 3'、mSOUPプローブ(SEQ ID NO: 67)：5' - AATA TTTGCGCGTAGCAACA TACCCGT - 3')。

【0212】

TaqMan分析を、当業者であれば周知の標準技術を使用して実施した。

【0213】

分析した8つの非依存性マウス創始ライン(founder line)において、野生型マウスを基準として使用する異所性のmSOUP発現は、褐色脂肪組織(BAT)からの全組織部から検出された。最も高い導入遺伝子発現レベルを示す2つの創始ライン(founder line)を、さらなる分析に用いた。

【0214】

実施例12：ノーザンブロット分析を経由したmUCP2発現分析

遍在性の効果を研究するため、遺伝子組換えマウスモデル生体内における異所性のmSOUPフラグ発現、アクチン-mSOUPフラグ遺伝子組換えマウスにおける(およびにコ

10

20

30

40

50

ントロール同腹仔における) mUCP2発現を、完全なUCP2オープン・リーディングフレームをプローブとして含む20gの全RNAおよび1.0kbのmUCP2cDNAを使用して、ノーザンブロット分析によってモニターした。平等な取り込みを確実にするために、1.4kbのヒト-アクチンcDNAをプローブとしてノーザンブロットをプレハイブリダイズした(rehybridized)。ノーザンブロット分析を標準技術を用いて実行した(例えばSambrookらの(1989)(1989)Molecular Cloning, a laboratory manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press)を参照。

【0215】

マウスUCP2の発現がテストした全ての組織において検出された(図10を参照)。遺伝子組換えマウスにおけるmUCP2発現レベルのコントロール同腹仔に対する比較は、分析したいいくつかの異なる組織において、増加したmUCP2発現を明らかにした。

【0216】

インスタントイメージャーおよび対応分析ソフトウェアを使用した定量化分析は、野生型コントロール同腹仔(図10Bを参照)に対して、1.5-4.1倍の増加されたmUCP2発現を、アクチン-mSOU Pフラグ遺伝子組換えマウスの肺、小腸、胸腺、WAT、脾臓および腎臓に示した。

【0217】

実施例13: NIH3T3細胞における、マウスSoup局在性蛍光顕微鏡分析 NIH3T3細胞は、マウスSoupに対して抗血清を用いて固定および免疫染色された、マウスSoupの発現ベクターを用いて一過性に形質移入された。免疫蛍光を、630x拡大率およびCy3標識化済み二次抗体に対して適切なフィルタを用いて検討した。NIH3T3細胞(図11を参照)のミトコンドリアにおいてSoupが明瞭で局在的であることが示された。

【0218】

NIH3T3細胞に、ポリドリジン被覆のカバーガラス(BDBiosciences、Erembodegem、Belgium)の付きの24個のウェルプレートに、ウェル当たり25,000細胞を播種した。播種の翌日、細胞は、製造者の指示に従って、CMVプロモーターリポフェクトアミン(Lipofectamin)プラス(Invitrogen、Karlsruheドイツ国)の制御下でSoup発現構成物によって一過性に形質移入させた。形質移入の48時間後、細胞を4%パラホルムアルデヒドに固定し、Dornerら(1998)JBiolChem. 273: 20267-75に従って免疫染色せしめた。つまり、細胞を、PBSにおいて0.75%トリトンX-100を用いて10分間透過処理した。10分間PBSにおいて0.1NaBH4を用いて、細胞の治療によって遮断された内在性自動蛍光。短いPBS洗浄後、細胞を、遮断緩衝剤(PBS、0.5%BSA、5%ヤギ血清、0.045%サカナゼラチン)において、1時間インキュベートせしめた。主要抗血清(1:25、一晚)および二次抗体(抗ウサギCy3、1:200、1時間)を遮断緩衝剤において適用し、その後遮断緩衝剤において洗浄した。カバーガラスをガラスのスライド上に取り付け、Cy3用に設定した適切なフィルタを用いて蛍光マイクロスコープにおいて、免疫染色せしめた細胞を検査した。

【0219】

実施例14: 抗mSOU P抗体

抗マウスSOU P抗体を、マウスSOU Pタンパク質(SEQ ID NO: 14からのC-a.a.300-316)のC末端に対応する合成ペプチドSEQ ID NO: 68: CYENVSHIEDLREKKVSを用いて免疫化によってウサギにおいて産生せしめた。抗体を、製造者のプロトコルに従って合成ペプチドSEQ ID NO: 68: (CYENVSHFLYDLREKKVS)を有するスルホリンクカラム(注文番号ピアス社44895)を使用して親和性精製した。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【図 1】

本発明によるショウジョウバエ U C P y スクレオチドおよびアミノ酸配列を示す図。ここに図示されたのは、全長鎖 c D N A (S E Q I D N O : 3)、オープン・リーディングフレーム (S E Q I D N O : 4)、および演繹されたアミノ酸配列 (S E Q I D N O : 5) である。

【図 2】

本発明によるショウジョウバエ U C P y の眼における過剰発現を示す図。この写真の左部に示されているハエにおいては、d U C P y 発現は正常であり、眼は正常に発達している。この写真の右部に示されているハエにおいては、d U C P y 発現は正常であり、眼は正常に発達している。過剰発現されており、観察される表現型はハエ眼の低下を示す。S O U P 1 がこの表現型において同時発現する場合、眼欠陥は救出（治癒）することができる。そのような救出ハエ（図示されていない）の眼は、ほとんど左ハエの正常眼と同一である。

10

【図 3 a】

本発明によるキイロショウジョウバエアクセッション番号 G H 2 2 1 3 9 の c D N A 配列およびアミノ酸配列を示す図。全長 c D N A n t 1 - 2 9 5 3 (S E Q I D N O : 6)、オープン・リーディングフレーム (S E Q I D N O : 7)、および演繹されたアミノ酸配列 (S E Q I D N O : 8) を示す。

【図 3 b】

本発明によるスプライス変異型のキイロショウジョウバエアクセッション番号 G H 2 2 1 3 9 の c D N A 配列およびアミノ酸配列を示す図。d S O U P - s p 1 オープン・リーディングフレーム (S E Q I D N O : 6 の n t 6 8 8 - 1 4 9 7 および 2 4 8 2 - 2 6 4 1)、および S O U P スプライス変異型 d S O U P - s p 1 の演繹されたアミノ酸配列を示す。

20

【図 3 c】

公共データベースにおける S O U P 1 遺伝子座からの遺伝子予測を示す図。公共データベースから予想された、スプライス変異型 d S O U P - C G 8 0 2 6 (n t 6 8 8 - 1 5 6 9、2 2 8 0 - 2 3 2 0 および S E Q I D N O : 6 の 2 4 8 2 - 2 6 4 1) のオープン・リーディングフレーム、およびスプライス変異型 d S O U P - C G 8 0 2 6 の演繹されたアミノ酸配列を示す。

30

【図 4 a】

本発明によるショウジョウバエ S O U P 1 の膜貫通ドメインプロットを示す図。

【図 4 b】

本発明によるヒト S O U P 1 - C G 8 0 2 6 の膜貫通ドメインプロットを示す図。

【図 4 c】

本発明によるヒト S O U P 1 の膜貫通ドメインプロットを示す図。

【図 4 d】

本発明によるマウス S O U P 1 の膜貫通ドメインプロットを示す図。

【図 4 e】

本発明によるゼブラフィッシュ S O U P 1 の膜貫通ドメインプロットを示す図。

40

【図 5 a】

本発明による膜貫通ドメイン S O U P 1 の変異体において、異なるショウジョウバエ S O U P 1 変異体の比較を示す図。ヌクレオチド番号付けは、S E Q I D N O : 6 における配列に関連するものである。スプライス変異型 (v a r i a n s) d S O U P 1 および d S O U P 1 - s p 1 の膜貫通ドメインは異なる。スプライス変異型 d S O U P 1 - C G 8 0 2 6 は、7 つの膜貫通ドメインを有するタンパク質を生成する。

【図 5 b】

本発明による d S O U P 1 における膜貫通ドメインを示す図。

【図 5 c】

本発明による変異型 d S O U P 1 - s p 1 における膜貫通ドメインを示す図。

50

【図 5 d】

本発明による変異型 d S O U P 1 - C G 8 0 2 6 における膜貫通ドメインを示す図。

【図 5 e】

本発明によるヒト S O U P 1 (h S O U P 1) における膜貫通ドメインを示す図。

【図 5 f】

本発明によるマウス (m S O U P 1) における膜貫通ドメインを示す図。

【図 6】

本発明によるヒト S O U P 1 を示す図。オープン・リーディングフレーム (S E Q I D N O : 9)、および演繹されたアミノ酸配列ヒト S O U P (S E Q I D N O : 1 0) を示す。

10

【図 7】

本発明によるマウス S O U P 1 を示す図。オープン・リーディングフレーム (S E Q I D N O : 1 1)、および演繹されたアミノ酸配列マウス S O U P (S E Q I D 1 5 N O : 1 2) を示す。

【図 8】

本発明による代替マウス g e n 6 i を示す図。オープン・リーディングフレーム (S E Q I D N O : 1 3)、および演繹されたアミノ酸配列マウス 6 i (S E Q I D N O : 1 4) を示す。

【図 9】

本発明によるダニオレオ (D a n i o r e r o) S O U P 1 を示す図。オープン・リーディングフレーム (S E Q I D N O : 5 1)、および演繹されたアミノ酸配列マウス S O U P (S E Q I D N O : 5 2) を示す。

20

【図 1 0 a】

本発明によるベータアクチン - m S O U P - f l g 遺伝子組換えマウスモデル生体内における U C P 2 の発現をノーザンプロットで示す図。

【図 1 0 b】

本発明によるベータアクチン - m S O U P - f l g 遺伝子組換えマウスモデル生体内における U C P 2 の発現をノーザンプロット分析の結果をデータ定量化した図。

【図 1 1】

本発明による N I H 3 T 3 細胞のミトコンドリアにおける S O U P 1 の局在性を示す図。 N I H 3 T 3 細胞は、マウス S o u p に対して抗血清を用いて固定および免疫染色された、マウス S o u p の発現ベクターを用いて一過性に形質移入された (実施例 1 3 を参照) 。

30

【圖 2】

ショウジョウバエ UCPy

全長鎖 cDNA (SEQ ID No. 3)

[illegible]

オープンリーディングフレーム (SEQ ID No. 4)

[illegible]

演繹アミノ酸配列 (SEQ ID No. 5)

MDKAERDYWHLRSLEIEEFPFPPTNVADPLTARNLFQLVNTFIGNALNESEVPLDKVAKTQSDGQAKTKGAMPT
FRATITNMTIRVDFGKSLAGFSAMQVTFINFSRLRVIVFRRPFLYQNERMEVLIQTHALGCSFDGACIAQALNPL
DIVKRMOTBGRARGLQVDFVNSVMQVDFIVYIRAGGLPVMWGGVQPSCHRACLMTTGDDVGSYDISKRTFKRLDLEGL
PLRFVYSMACGLATASVLSPTANVIKSRMNQPVNESGKNLYKNSLDCIRKIVREGVLTLYKGLMPTWFLQPPSVLFW
LSVEGLRQWKQSGSF

ショウジョウバエ

ショウジョウバエUCPyの眼における過剰発現



眼におけるショウジョウバエUCP-ホモログdUCPyの過剰発現。

dUCPy-過剰発現のない左ハエにおいて眼は正常に発達し、

dUCPy-過剰発現を有する右ハエにおいては眼は明らかに縮小した。

SOUP1の同時発現は眼の欠損を回避する。このように眼の欠損が回避されたハエの眼はほとんど左ハエの正常な眼と同一であった。

【 図 3 a 】

キイロショウジョウバエ cDNA (GH22139)

全長鎖 cDNA (SEQ ID No. 6)

[illegible]

オープンリーディングフレーム (SEQ ID No. 7)

[illegible]

演繹アミノ酸配列 (SEQ ID No. 8)

MNPIKAQSTGSPKKFNFVFAHVKYEHLVAGVSGGVSTLILHPLDLIKIRFAVNDGRTATVPQYRGLSSAFTTIFRQEGFRGLY
 KQVTFNVWGSOGSSWGLYFMFYNTIKTFIQQGNTPMPLGPTMGLAAESGILTLTLNPIWVKTRLCQCDAASSAEYRGMI
 HALGQIYKEEGIRGLYRGFVPMGLVSHGAIQMTYELKNAYENRKLPIIDTKLATEYLAFAAVSKLIAAATYPQYQVRA

【 ㊦ 3 b 】

キイロショウジョウバエ cDNA スプライス変異型

dsOUP1-sp1 オープンリーディングフレーム

[illegible]

dsOUP-spl 演繹アミノ酸配列

MNP I K A Q S T G S P K K F N V F A H V K Y E H L V A G V S G V S T L I L P L D L K I R F A V N D G R T A T V P Q Y R G L S S A F T T I F R Q E G F R G L Y
 K G V T P N V W G S G S S W G L Y F M F Y N T I K T F I Q G G N T T M P L G P T M N L A A A S G I L T L L T P N I V W T T R C L Q D A A S S A E Y K G M I
 H A L Q G I Y K E E G R I G L Y R G V P G M G V S H G A I Q L M Y E E L K N A Y N E Y R K L P I D T K L A T T E Y L L A F A V S K L A A A T T Y P Y Q V V R A
 L G I G D H Y E Y N T W G L I K G W F E R Y G R F E Y G R I G L M S L T R V V P A C M T F L V Y E N S H F L L A R R I E T E D A S D V .

【 ㄅ 3 c 】

公共データベースにおける SOUP1 遺伝子座からの遺伝子予測

dsOUP1-CG8026 オープンリーディングフレーム

[illegible]

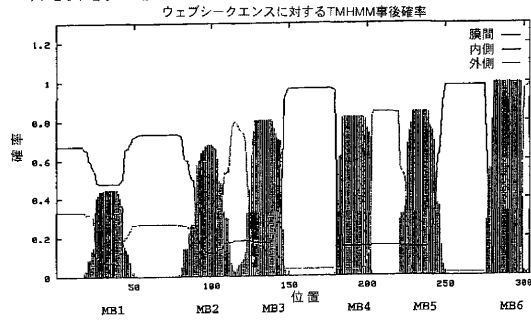
ASOUP1-CG8026 演繹アミノ酸配列

MNPIKAQSTGSPKKFNVP, AHVYKHLVMSGVGVSTLHLPLDKIRFAVNDGRGATVPQYKLS, SAAFTTVP, QPBGGRGFP,
 HGTNPVNWGSGSGWGLYFNFYTFITQIGTTFMMAAAREGSLTLTLTFNVWTKRLCQDASSAEVYGM,
 HALGQTYIKEDGRLYRVEFGELGVSHQIQMTPYELKNAYNEKPL, IDTKLATEITLFAAVSKL, IAAATYYPYQVRA,
 RLQDHHYRNYGNCWAC, IKQWYERMRGFGYKGLVFLYVHTPNICMPASHTL, SKGSWQLEFGYNGYKGLKASL, TRVVVPAW,
 TFLVYENVSIVLWDRCKIT, EKEDASDV.

【図 4 a】

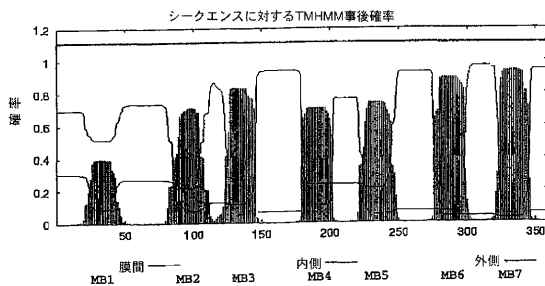
SOUP1タンパク質の膜貫通ドメインプロット: J.Glasgow ら、
Proc.Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology. 175-182,
AAAI Press, 1998 に従って算定した。

4a) ショウジョウバエ SOUP1



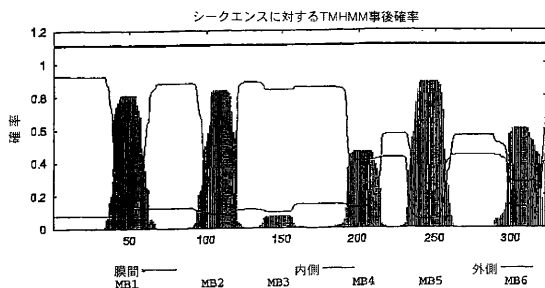
【図 4 b】

4b) ショウジョウバエ SOUP1-CG8026



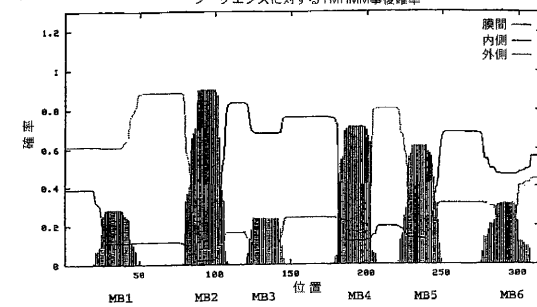
【図 4 e】

4e) ゼブラフィッシュ SOUP1



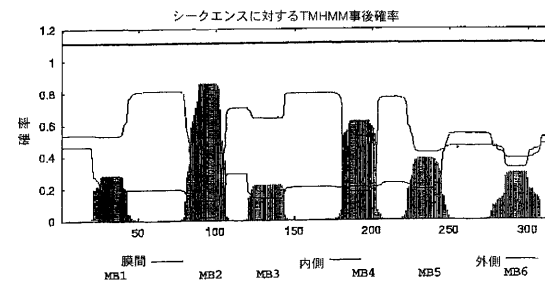
【図 4 c】

4c) ヒト SOUP1



【図 4 d】

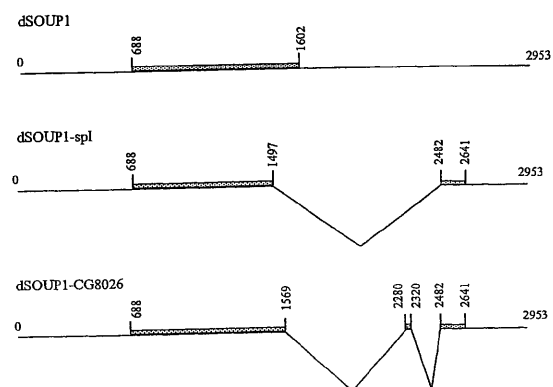
4d) マウス SOUP1



【図 5 a】

種々のショウジョウバエ SOUP1 変異体の比較

dsOUP スプライス変異体



dsOUP1のスプライシング。ヌクレオチドの番号付けはSEQ ID No:6 の配列に
関する。スプライス変異体 dsOUP1 および dsOUP1-spl において、第6膜貫通
ドメインが異なっている。スプライス変異体 dsOUP1-CG8026 は7つの膜貫通
ドメインを有するタンパク質を生成する。

【図 5 b】

dSOUP1 中の膜貫通ドメイン

dSOUP 中 MB-1		
最少	26-41	LVAGVSGGVVSTLILH
最大	21-48	VKYEHLVAGVSGGVVSTLILHPLDLIKI
dSOUP 中 MB-2		
最少	85-107	GVTPNVWGS GSSWGLYFMFYNTI
最大	81-111	GLYKGVTPNVWGS GSSWGLYFMFYNTIKTFI
dSOUP 中 MB-3		
最少	124-146	MNMLAAESGILTLLLTNPIWVV
最大	121-147	GPTMNMLAAESGILTLLLTNPIWVVK
dSOUP 中 MB-4		
最少	180-202	GLYRGFVPGMLGVSHGAIQFMTY
最大	179-203	RGLYRGFVPGMLGVSHGAIQFMTYE
dSOUP 中 MB-5		
最少	225-245	EYLAFAAVSKLIAAAATYPYQ
最大	221-248	LATTEYLAFAAVSKLIAAAATYPYQVVR
dSOUP 中 MB-6		
最少	277-298	FYKGLVPYL VHVTPNICMVMLI
最大	276-299	GFYKGLVPYL VHVTPNICMVMLIW

【図 5 c】

dSOUP1-spl 中の膜貫通ドメイン

dSOUP-spl 中 MB-1		
最少	26-41	LVAGVSGGVVSTLILH
最大	21-48	VKYEHLVAGVSGGVVSTLILHPLDLIKI
dSOUP-spl 中 MB-2		
最少	85-107	GVTPNVWGS GSSWGLYFMFYNTI
最大	81-111	GLYKGVTPNVWGS GSSWGLYFMFYNTIKTFI
dSOUP-spl 中 MB-3		
最少	124-146	MNMLAAESGILTLLLTNPIWVV
最大	121-147	GPTMNMLAAESGILTLLLTNPIWVVK
dSOUP-spl 中 MB-4		
最少	180-202	GLYRGFVPGMLGVSHGAIQFMTY
最大	179-203	RGLYRGFVPGMLGVSHGAIQFMTYE
dSOUP-spl 中 MB-5		
最少	225-245	EYLAFAAVSKLIAAAATYPYQ
最大	221-248	LATTEYLAFAAVSKLIAAAATYPYQVVR
dSOUP-spl 中 MB-6		
最少	277-298	FYKGLKASLTRVVPACMVTFVL
最大	276-299	GFYKGLKASLTRVVPACMVTFLVY

【図 5 d】

dSOUP1-CG8026 中の膜貫通ドメイン

CG8026 中 MB-1		
最少	26-41	LVAGVSGGVVSTLILH
最大	21-48	VKYEHLVAGVSGGVVSTLILHPLDLIKI
CG8026 中 MB-2		
最少	85-107	GVTPNVWGS GSSWGLYFMFYNTI
最大	81-111	GLYKGVTPNVWGS GSSWGLYFMFYNTIKTFI
CG8026 中 MB-3		
最少	124-146	MNMLAAESGILTLLLTNPIWVV
最大	121-147	GPTMNMLAAESGILTLLLTNPIWVVK
CG8026 中 MB-4		
最少	180-202	GLYRGFVPGMLGVSHGAIQFMTY
最大	179-203	RGLYRGFVPGMLGVSHGAIQFMTYE
CG8026 中 MB-5		
最少	225-245	EYLAFAAVSKLIAAAATYPYQ
最大	221-248	LATTEYLAFAAVSKLIAAAATYPYQVVR
CG8026 中 MB-6		
最少	277-299	FYKGLVPYL VHVTPNICMPASFH
最大	276-300	GFYKGLVPYL VHVTPNICMPASFHL
CG8026 中 MB-7		
最少	323-345	LTRVVPACMVTFLVYENVSHFLL
最大	321-346	ASLTRVVPACMVTFLVYENVSHFLLA

【図 5 e】

hSOUP1 中の膜貫通ドメイン

MB-1		
最少	26-41	LIAGVSGGVLSNLALH
最大	23-48	YENLIAGVSGGVLSNLALHPLDLVKI
MB-2		
最少	81-104	LYQGVTPTNIWGAGLSWGLYFFFYNN
最大	80-106	GLYQGVTPNIWGAGLSWGLYFFFYNAI
MB-3		
最少	123-143	YLVSAAEAGAMTLCITNPLWV
最大	122-144	EYLVSAAEAGAMTLCITNPLWVT
MB-4		
最少	181-203	GLYKGFVPGFLFGTSHGALQFMAY
最大	180-206	RGLYKGFVPGFLFGTSHGALQFMAYELL
MB-5		
最少	225-246	VEYISVAALSKIFAVAATYPYQ
最大	221-249	QLSTVEYISVAALSKIFAVAATYPYQVVR
MB-6		
最少	281-299	GIAPNLIRVTPACCTIFVV
最大	277-303	GFYKGIAPNLIRVTPACCTIFVVYENY

【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
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/42455 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/12, Dorothea [DE/DE]; Schillerstrasse 40, 37083 Göttingen
C07K 14/705 (DE).(21) International Application Number: PCT/EP01/13663 (74) Agents: WEICKMANN & WEICKMANN et al.; Post-
fach 860 820, 81635 München (DE).(22) International Filing Date: 23 November 2001 (23.11.2001) (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
(25) Filing Language: English CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
(26) Publication Language: English LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
(30) Priority Data: 00125693.2 23 November 2000 (23.11.2000) EP SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(71) Applicant (for all designated States except US): DEVEL- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
OGEN AG FÜR ENTWICKLUNGSBIOLOGISCHE KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
FORSCHUNG [DE/DE]; Rudolf-Wissell-Strasse 28, Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
37079 Göttingen (DE). European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): STEUERNAGEL,
Arnd [DE/DE]; Am Kirschberge 4, 37085 Göttingen
(DE). BRÖNNER, Günter [DE/DE]; Springstr. 54,
37077 Göttingen (DE). DOHRMANN, Cord [DE/DE];
Am Menzelberg 8, 37077 Göttingen (DE). CROSSEK,
Thomas [DE/DE]; Kiesssestrasse 49a, 37083 Göttingen
(DE). WEHR, Roland [DE/DE]; Ludwig-Beck-Strasse
17, 37075 Göttingen (DE). RUDOLPH, Bettina [DE/DE];
Bödekerstrasse 29, 30161 Hannover (DE). RUDOLPH,

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor 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.

(54) Title: MODIFIER OF ORGANELLE METABOLISM

WO 02/42455 A2

(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid molecule encoding a polypeptide contributing to membrane stability and/or function of organelles, wherein said nucleic acid molecule (a) hybridizes under herein defined conditions to the complementary strand of a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence disclosed herein; (b) hybridizes under herein defined conditions to the complementary strand of a nucleic acid molecule as depicted herein; (c) it is degenerate with respect to the nucleic acid molecule of (a); (d) encodes a polypeptide which comprises at least one, preferably at least two, more preferably at least three, more preferably at least four, more preferably at least five and most preferably six amino acid sequences being part of the polypeptide contributing to membrane stability and/or function of organelles and comprising putative transmembrane region; (e) encodes a polypeptide which is at least 85%, preferably at least 90%, more preferably at least 95%, more preferably at least 98% and up to 99.6% identical to an amino acid sequence representing the above described polypeptide; (g) encodes a polypeptide which is at least 35%, preferably at least 50%, more preferably at least 60%, more preferably at least 70% more preferably at least 80%, more preferably at least 99%, most preferably at least 95% and most preferably at least 99% identical to the amino acid sequence as disclosed herein; (h) differs from the nucleic acid molecule of (a) to (g) by mutation and wherein said mutation causes an alteration, deletion, duplication or premature stop in the encoded polypeptide; or (i) has a sequence as disclosed herein.

WO 02/42455

PCT/EP01/13663

Modifier of organelle metabolism**Description**

5

The present invention relates to a nucleic acid molecule encoding a polypeptide contributing to membrane stability and/or function of organelles, wherein said nucleic acid molecule (a) hybridizes under herein defined stringent conditions to the complementary strand of a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of disclosed herein; (b) hybridizes under herein defined conditions to the complementary strand of a nucleic acid molecule as disclosed herein; (c) it is degenerate with respect to the nucleic acid molecule of (a); (d) encodes a polypeptide which comprises at least one, preferably at least two, more preferably at least three, more preferably at least four, more preferably at least five and most preferably six amino acid sequences described herein as putative transmembrane regions; (e) encodes a polypeptide which is at least 85%, preferably at least 90%, more preferably at least 95%, more preferably at least 98% and up to 99,6% identical to a herein disclosed amino acid sequence representing a polynucleotide contributing to membrane stability and/or function of organelles; (f) encodes a polypeptide which is at least 90%, preferably at least 95%, more preferably at least 98% and up to 99,6% identical to a herein disclosed amino acid sequence representing a polynucleotide contributing to membrane stability and/or function of organelles; (g) encodes a polypeptide which is at least 35%, preferably at least 50%, more preferably at least 60%, more preferably at least 70%, more preferably at least 80%, more preferably at least 90%, most preferably at least 95% and most preferably at least 99% identical to the amino acid sequence disclosed herein; (h) differs from the nucleic acid molecule of (a) to (g) by mutation and wherein said mutation causes an alteration, deletion, duplication or premature stop in the encoded polypeptide or (i) has a sequence as depicted herein. Furthermore, the

10

15

20

25

30

invention provides for vectors comprising said nucleic acid molecule as well as to hosts transformed with said vector. The invention also relates to polypeptides encoded by said nucleic acid molecules and to antibodies, fragments or derivatives thereof or an aptamer or another receptor specifically recognizing the nucleic acid molecule or the polypeptide of the invention. The invention also describes compositions comprising nucleic acid molecules, vectors, hosts, polypeptides, fusion proteins, antibodies, fragment or derivative thereof or aptamers or other receptors or anti-sense oligonucleotides of the invention. Preferably these compositions are diagnostic compositions or pharmaceutical compositions. Furthermore, the invention provides for methods of identifying a polypeptide or (a) substance(s) involved in cellular metabolism in an animal or a plant or capable of modifying homeostasis and for identifying a polypeptide involved in the regulation of body weight in a mammal. The invention also relates to methods of identifying a compound influencing the expression of the nucleic acid molecule or the polypeptide of the invention. In addition, methods are disclosed for assessing the impact of the expression of one or more compounds of the invention. Finally, the invention provides for compositions comprising inhibitors and/or stimulators of the (poly)peptide of the invention and it provides for kits comprising the compounds of the invention.

Mitochondria are the energy suppliers of animal cells. Most of the energy available from metabolising foodstuffs like carbohydrates, fats etc. is used to create a proton gradient across the inner mitochondrial membrane. This proton gradient drives the enzyme ATP synthetase that produces ATP, the cells major fuel substance (Mitchell P, Science 206, 1979, 1148-1159). In the mitochondria of brown adipose tissue exists a protein (Uncoupling Protein 1) that tunnels protons through the inner mitochondrial membrane (review in Klingenberg M, Huang SG, Biochim Biophys Acta 1999, 1415(2):271-96). The energy stored in the proton gradient is thereby released as heat and not used for ATP synthesis.

When the energy intake of an animal exceeds expenditure surplus energy can be stored as fat in adipose tissue. The generation of a proton leak across the inner mitochondrial membrane by the activation of uncoupling proteins would reduce caloric efficiency and thus avoid the accumulation of excess body fat (obesity) that is detrimental to the animals health. In human, however, brown adipose tissue is almost absent in adults. Therefore UCP1 was not considered to be a major factor in the formation or prevention of human obesity. Recently the discovery of further proteins of similar sequence (UCP2-UCP5) that are widely expressed in human tissues (e.g. white adipose tissue, muscle) made this members of the UCP family to important targets for pharmaceutical research (reviewed in Adams SH, Nutr 2000, 130(4):711-4). Interestingly, and as reviewed in Ricquier, Biochem J. 345 (2000), 161-179, further homologues have been identified, like, inter alia, the plant UCPs StUCP (from *Solanum tuberosum*) and AtUCP (*Arabidopsis thaliana*). Although the in vivo function of these proteins is still unknown, the possibility to influence UCP activity would be a conceivable therapy for the treatment or prevention of obesity and related diseases.

Mitochondria have a very specialized function in energy conversion and said function is reflected in their morphological structure, namely the distinct internal membrane. This internal membrane does not only provide the framework for electron-transport processes but also creates a large internal compartment in each organelle in which highly specialized enzymes are confined. Therefore, there is a strong relationship between mitochondrial energy metabolism and the biochemical/biophysical properties of these organelles.

The technical problem underlying the invention was to provide for means and methods for modulating the biological/biochemical activities of mitochondria and, thereby, modulating metabolic conditions in eukaryotic cells which influence energy expenditure, body temperature,

WO 02/42455

4

PCT/EP01/13663

thermogenesis, cellular metabolism to an excessive or deficient supply of substrate(s) in order to regulate the ATP level, the NAD⁺/NADH ratio, and/or superoxide production.

- 5 The solution to this technical problem is achieved by providing the embodiments characterized in the claims.

Accordingly, the present invention relates to a nucleic acid molecule encoding a polypeptide contributing to membrane stability and/or function of organelles, wherein said nucleic acid molecule

- 10 (a) hybridizes at 65°C in a solution containing 0.2 x SSC and 0.1% SDS to a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8, of SEQ ID NO: 54, of SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 and/or SEQ ID NO: 52 and/or the complementary strand thereof;
- 15 (b) hybridizes at 65°C in a solution containing 0.2 x SSC and 0.1% SDS to a nucleic acid molecule as depicted in SEQ ID NO: 6, 7 or 53, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 and/or SEQ ID NO: 51 and/or the complementary strand thereof;
- 20 (c) it is degenerate with respect to the nucleic acid molecule of (a) or (b);
- (d) encodes a polypeptide which comprises at least one, preferably at least two, more preferably at least three, more preferably at least four, more preferably at least five and most preferably six amino acid sequences as depicted in any one of
- 25 SEQ ID NOs: 15 to 50, 61 and 62;
- (e) encodes a polypeptide which is at least 85%, preferably at least 90%, more preferably at least 95%, more preferably at least 98%, and up to 99,6% identical to SEQ ID NO: 8;
- 30

WO 02/42455

5

PCT/EP01/13663

- (f) encodes a polypeptide which is at least 90%, preferably at least 95%, more preferably at least 98% and up to 99,6% identical to SEQ ID NO: 54;
- 5 (g) encodes a polypeptide which is at least 35%, preferably at least 50%, more preferably at least 60%, more preferably at least 70%, more preferably at least 80%, more preferably at least 90%, most preferably at least 95% and most preferably at least 99% identical to the amino acid sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 10, 12, 14 or 52;
- 10 (h) differs from the nucleic acid molecule of (a) to (g) by mutation and wherein said mutation causes an alteration, deletion, duplication or premature stop in the encoded polypeptide; or
- (i) has the sequence as depicted in SEQ ID NOs: 9, 11, 13 or 51.

15

As documented in the appended examples, the present invention provides for genes and gene products which are either directly or indirectly involved in membrane stability and/or function of organelles, in particular of mitochondria.

20

The term "membrane stability" as used herein comprises not only the overall stability but also comprises local stabilities on membranes of organelles, for example of the inner and outer membrane, but in particular of the inner membrane. The term "membrane stability" relates, therefore, to structural features of the membranes, provided by protein-protein interactions as well as by protein-lipid interactions leading to a defined membrane composition.

25

The term "contributing to membrane function of organelles" as employed herein above relates to functions of the above defined polypeptide comprising, inter alia, transport functions (like active and passive transport of ions, metabolites, vitamins, etc.), regulator functions of other

30

WO 02/42455

6

PCT/EP01/13663

membrane proteins (like transporters, carriers) or modifier functions of other (membrane) proteins (like enhancement/suppressor functions) and/or other functions as defined herein below.

- 5 The term "organelles" as employed herein not only relates to mitochondria but also to further organelles, like peroxisomes or plant cell organelles, e.g. chloroplasts.

- 10 The terms "hybridizes" and "hybridizing" as employed in context of the present invention preferably relate to stringent conditions as, *inter alia*, defined herein above, e.g. 0.2 x SSC, 0.1% SDS at 65°C. Said conditions comprise hybridization conditions and particularly washing conditions. It is preferred that washing conditions are more stringent than hybridization conditions. By setting the conditions for hybridization, the person skilled in
- 15 the art can determine if strictly complementary sequences or sequences with a higher or lower degree of homology are to be detected. The setting of conditions is well within the skill of the artisan and to be determined according to protocols described, for example, in Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY or Hames and Higgins, "Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL Press, Oxford (1985). Non-
- 20 stringent hybridization conditions for the detection of homologous and not exactly complementary sequences may be set at 6 x SSC, 1% SDS at 65°C.

25

- The molecules hybridizing to the nucleic acid molecules of the invention also comprise fragments, derivatives and allelic variants of the above-described nucleic acid molecules which encode (poly)peptides regulating, causing or contributing to obesity described in the present invention. In this
- 30 regard, fragments are defined as parts of the nucleic acid molecules, which are long enough in order to encode said (poly)peptides. The term derivatives means that the sequences of these hybridizing molecules differ

from the sequences of the above-mentioned nucleic acid molecules at one or more positions and that they exhibit a high degree of homology to these sequences. For example, homology means a sequence identity to sequences as identified in SEQ ID NOs: 10, 12, 14 or 52 of at least 35%,
5 in particular an identity of at least 45 %, preferably of more than 50%, more preferably more than 60%, more preferably more than 70%, more preferably more than 80% and still more preferably a sequence identity of more than 90%. Considering a sequence identified as SEQ ID NO: 8 said homology means a sequence identity of at least 85%. For the sequence
10 depicted in SEQ ID NO: 54, a sequence identity of at least 90% is considered "homologous". The person skilled in the art may employ computer programs and packages in order to determine homology values. Generally, nucleotide or amino acid sequence identities/homologies can be determined conventionally by using known computer programs such as
15 BLASTIN, BLASTP, NALIGN, PALIGN or bl2seq using particular algorithms to find the best segment of homology between two segments.

As shown in the appended examples, in the context of the present invention the comparative analysis of the percentage of identities at the
20 amino acid level are preferably obtained using the "bl2seq" program from NCBI using the following parameters: Open Gap Cost: 11 and Gap Extension Cost: 1. However, the program allows any positive integer for said value(s).

25 Furthermore, in the context of the present invention comparative analysis of the percentage of identities at the nucleotide level of the different nucleic acid sequences, on the other hand, are preferably obtained using the "matcher" program of the EMBOSS package using the following
parameters: Gap penalty value: 16 and Gap length value: 4 alternatively,
30 the program accepts any positive integer. It was found that these parameters are the best suited to calculate the percentage of identity over the reference nucleotide or amino acid sequences, especially considering

the different levels of homology among the different sequences analyzed. Any deviations occurring when comparing with the above-described nucleic acid molecules may be caused by deletion, substitution, insertion or recombination.

5 Moreover, homology means that functional and/or structural equivalence exists between the respective nucleic acid molecules or the proteins they encode. The nucleic acid molecules, which are homologous to the above-described molecules and represent derivatives of these molecules, are
10 generally variations of these molecules that constitute modifications which exert the same biological function. These variations may be naturally occurring variations, for example sequences derived from other organisms, or mutations, whereby these mutations may have occurred naturally or they may have been introduced by means of a specific mutagenesis.
15 Moreover, the variations may be synthetically produced sequences. The allelic variants may be naturally occurring as well as synthetically produced variants or variants produced by recombinant DNA techniques.

The proteins encoded by the various variants of the nucleic acid molecules
20 according to the invention exhibit certain common characteristics. Biological activity, molecular weight, immunological reactivity, conformation etc. may belong to these characteristics as well as physical properties such as the mobility in gel electrophoresis, chromatographic characteristics, sedimentation coefficients, solubility, spectroscopic
25 properties, stability, pH-optimum, temperature-optimum etc.

Preferably, the above described nucleic acid molecules encode a polypeptide comprising at least one, most preferably at least six amino acid sequences as depicted in any one of SEQ ID NOs: 15 to 50, 61 and 62.
30 Said SEQ ID NOs relate to predicted transmembrane regions/domains and are also described in the appended examples and figures. Sequences as shown in SEQ ID NOs: 15 to 26, 61 and 62 relate to transmembrane

WO 02/42455

9

PCT/EP01/13663

regions as deduced in a nucleic acid molecule of the invention (and its corresponding amino acid sequence) which is obtainable from *Drosophila melanogaster*, SEQ ID NOs: 27 to 38 relate to transmembrane domains as deduced in a nucleic acid molecule obtainable from *Homo sapiens* and SEQ ID NOs: 39 to 50 relate to transmembrane domains of the protein as defined herein and deducible from *Mus musculus*. Within the scope of the present invention are therefore also polypeptides encoded by the nucleic acid molecule of the invention which comprise at least one transmembrane domain as shown in any one of SEQ ID NOs: 15 to 50, 61 and 62. The present invention, however, also comprises constructs wherein transmembrane regions/domains from different species are artificially linked. It is most preferred that the nucleic acid molecule as defined in alternative (d) herein above encodes for a polypeptide comprising at least one, more preferably at least six amino acid sequences as depicted in any one of SEQ ID NOs: 27 to 50, deduced from mouse and human. Yet, preferred combinations comprise at least one and preferably all transmembrane regions from one species.

It is preferred that the nucleic acid molecule of the invention encodes a polypeptide contributing to membrane stability and/or function of organelles which is at least 85% and up to 99,6% identical to the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 8 or which is at least 90% and up to 99,6% identical to the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 54. SEQ ID NO: 8 depicts a polypeptide encoded, inter alia, by SEQ ID NO: 7 and represents a protein of *Drosophila* which has surprisingly been found to be involved in membrane function and/or stability of organelles and has, in particular, be found to be able to modify UCPs; see also appended examples. The amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 54 (encoded, inter alia, by SEQ ID NO: 53) comprises a splice variant of the above described protein. As demonstrated in the appended examples, the here described polypeptide (and encoding nucleic acid molecule) was able to modify, e.g. suppress a specific eye phenotype in *Drosophila* which

WO 02/42455

10

PCT/EP01/13663

was due to the overexpression of the *Drosophila melanogaster* gene dUCPy. The overexpression of dUCP (with homology to human UCPs) in the compound eye of *Drosophila* led to a clearly visible eye defect (see appended examples and figures) which can be used as a "read-out" for a
5 genetical "modifier screen".

In said "modifier screen" thousands of different genes are mutagenized to activate their expression in the eye. Should one of the mutagenized genes interact with dUCPy and modify its activity an enhancement or suppression
10 of the eye defect will occur. Since such flies are easily to discern they can be selected to isolate the interacting gene.

As shown in the appended examples, a gene was deduced that can suppress the eye defect induced by the activity of dUCPy. This gene is
15 called Suppressor Of Uncoupling Protein 1 (SOUP1).

The present invention also relates to SOUP1 proteins encoded by the nucleic acid molecule of the invention and depicted in SEQ ID NOs: 10, 12, 14 and 52. It is preferred that the encoded polypeptide is at least 35% and
20 most preferably at least 99% identical to the amino acid sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 10, 12, 14 or 52. SEQ ID NO: 10 depicts the human homologue of SOUP1, SEQ ID NO:12 and 14 depict two variants of the mouse SOUP1, SEQ ID NO: 52 depicts SOUP1 of the zebrafish (*Danio rerio*).

25 It is envisaged that mutations in the herein described SOUP1-polypeptides (and genes) lead to phenotypic and/or physiological changes which may comprise a modified and altered mitochondrial activity. This, in turn, may lead to, inter alia, an altered energy metabolism, altered thermogenesis
30 and/or altered energy homeostasis.

In a preferred embodiment the above described nucleic acid molecule of the invention is DNA. In this context, it is understood that the term "nucleic acid molecule" comprises coding and, wherever applicable, non-coding sequences, like, inter alia, 5' and 3' non-coding sequences. Said 5' and/or 3' non-coding regions may comprise (specific) regulatory sequences ensuring initiation of transcription and optionally poly-A signals ensuring termination of transcription and/or stabilization of the transcript. Additional 5' and 3' non-coding regions may comprise promoters and/or transcriptional as well as translational enhancers. Furthermore, the term "nucleic acid molecule" may comprise intron(s) and splice variants, where applicable.

The term DNA as used herein comprises, inter alia, single-stranded or double-stranded DNA, e.g., synthetic DNA, cDNA and genomic DNA. Furthermore, the nucleic acid molecule of the invention may also be a RNA molecule such as mRNA. In accordance with the present invention, the term "nucleic acid molecule" comprises also any feasible derivative of a nucleic acid to which a nucleic acid probe may hybridize. Said nucleic acid probe itself may be a derivative of a nucleic acid molecule capable of hybridizing to said nucleic acid molecule or said derivative thereof. The term "nucleic acid molecule" further comprises peptide nucleic acids (PNAs) containing DNA analogs with amide backbone linkages (Nielsen, Science 254 (1991), 1497-1500).

In this context it has to be stressed that nucleic acid molecules of the invention may also be chemically synthesized, using, inter alia, synthesizers which are known in the art and commercially available, like, e.g. the ABI 394 DNA-RAN-synthesizers.

It is preferred that the nucleic acid molecule of the invention encodes a polypeptide contributing to membrane stability and/or function of organelles, wherein said polypeptide contributing to membrane stability

and/or function in organelles is expressed in mitochondria and/or peroxisomes. It is particularly preferred that said polypeptide participates in the maintenance of said membrane.

5 Furthermore, it is envisaged that the nucleic acid molecule of the invention encodes a polypeptide, wherein said polypeptide contributing to membrane stability and/or function in organelles is a transporter molecule and/or a regulator of a transporter molecule. It is, e.g., envisaged that the polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of the invention
10 regulates, directly or indirectly, *carrier* and/or transport molecules capable of transporting molecules like ions, metabolites or vitamins across membranes and/or that said polypeptide is such a transporter/carrier molecule.

15 It is particularly preferred that the nucleic acid molecule the invention encodes a polypeptide as defined herein above, wherein said polypeptide is a modifying polypeptide. Particularly preferred modifying polypeptides comprise modifiers of mitochondrial proteins, for example the modification of a member of the UCP family.

20 Said member(s) of the UCP (uncoupling protein) family are known in the art and comprise, UCP1, UCP2, UCP3, UCP4, UCP5, StUCP or AtUCP, see, inter alia, Ricquier (2000), loc. cit. The above mentioned modification of mitochondrial proteins, and in particular of UCPs, may occur by direct
25 interaction with said protein or, also, by supplying/importing/exporting ions, metabolites or vitamins and the like (or by blocking these processes) which are necessary for the function or activity of said mitochondrial protein or which are generated by the activity of said mitochondrial protein. Therefore, said "modification" also relates to transport- and supply-
30 phenomena. Furthermore, said "modification" comprises the control of the function of one or more proteins/polypeptides, preferably of members of the UCP family. Most preferred are "modifications" comprising events

which influence the metabolism of the cell, in particular the energy metabolism.

The present invention relates also, as pointed out herein above, to
5 "variants" of the nucleic acid molecules described herein.

The term "variant" means in this context that the nucleotide and their encoded amino acid sequence, respectively, of these polynucleotides differs from the sequences of the above-described nucleic acid molecules and (poly)peptides contributing to membrane stability and/or function of
10 organelles in one or more nucleotide positions and are highly homologous to said nucleic acid molecules. Homology is understood as defined herein above. The deviations from the sequences of the nucleic acid molecules described above can, for example, be the result of nucleotide
15 substitution(s), deletion(s), addition(s), insertion(s) and/or recombination(s). Homology can further imply that the respective nucleic acid molecules or encoded proteins are functionally and/or structurally equivalent. The nucleic acid molecules that are homologous to the nucleic acid molecules described above and that are derivatives of said nucleic acid molecules are,
20 for example, variations of said nucleic acid molecules which represent modifications having the same biological function, in particular encoding proteins with the same or substantially the same biological function. They may be naturally occurring variations, such as sequences from other mammals or mutations. The term "variants" in this context furthermore
25 comprises, inter alia, allelic variations or splice variants as described herein above. Naturally occurring SOUP1 protein or soup1 gene variants are called "allelic variants", and refer to one of several alternate forms of a gene occupying a given locus on a chromosome of an organism. (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985) and updated
30 versions). These allelic variants can vary at either the polynucleotide and/or (poly)peptide level. Alternatively, non-naturally occurring variants may be produced by mutagenesis techniques or by direct synthesis. Using known

methods of protein engineering and recombinant DNA technology, variants may be generated to improve or alter the characteristics of the herein described SOUP1 proteins/soup1 genes. Therefore, the term "allelic variant" also comprises synthetically produced or genetically engineered variants.

The nucleic acid molecule of the invention may be of natural origin, synthetic or semisynthetic or it may be a derivative.

The nucleic acid molecules of the invention encoding the above described (poly)peptides, e.g. wildtype and mutated forms of the SOUP1 and/or fragments thereof find a wide variety of applications including use as translatable transcripts, hybridization probes, PCR primers or the use in expression profiling of nucleic acids, for example on appropriately coated chips or in diagnostic and/or pharmaceutical settings. Useful PCR primers can be deduced by the person skilled in the art from the nucleic acid molecules of the invention. Particularly useful primers are, inter alia, the employed in the appended examples.

In particular they may be used in detecting the presence of soup1 genes and gene transcripts and in detecting and/or amplifying nucleic acids encoding further soup1 homologues or structural analogues. Given the probes, materials and methods disclosed herein, inter alia, for probing cDNA and genomic libraries, the person skilled in the art is in a position to recover corresponding homologues. As described herein below, the nucleic acid molecules of the invention may be part of specific expression vectors and may be incorporated into recombinant cells for expression and screening and in transgenic animals for functional studies (e.g. the efficacy of candidate drugs for disease associated with expression of SOUP1) as described herein below.

Furthermore, in diagnosis, specific hybridization probes related to the soup1 gene(s) as described herein and single nucleotide polymorphisms present in soup1 alleles find use in identifying wild-type and mutant soup1 alleles in clinical and laboratory samples. Mutant alleles are, *inter alia*, used to generate allele-specific oligonucleotide (ASO) probes for, e.g., high-throughput clinical diagnosis. For therapeutic approaches nucleic acid molecules of the invention as described herein above and herein below may be employed to modulate cellular expression or intracellular concentration or availability of active (poly)peptides of the invention. These nucleic acid molecules may comprise antisense molecules, i.e. single-stranded sequences comprising the complements of the disclosed nucleic acids of the invention.

The nucleic acid molecule(s) of the invention may be a recombinantly produced chimeric nucleic acid molecule comprising any of the aforementioned nucleic acid molecules either alone or in combination. Preferably, said nucleic acid molecule is part of a vector.

The present invention therefore also relates to a vector comprising the nucleic acid molecule of the present invention. The vector of the present invention may be, e.g., a plasmid, cosmid, virus, bacteriophage or another vector used e.g. conventionally in genetic engineering, and may comprise further genes such as marker genes which allow for the selection of said vector in a suitable host cell and under suitable conditions. Furthermore, the vector of the present invention may, in addition to the nucleic acid sequences of the invention, comprise expression control elements, allowing proper expression of the coding regions in suitable hosts. Such control elements are known to the artisan and may include a promoter, a splice cassette, translation initiation codon, translation and insertion site for introducing an insert into the vector. Preferably, the nucleic acid molecule of the invention is operatively linked to said expression control sequences allowing expression in eukaryotic or prokaryotic cells.

Control elements ensuring expression in eukaryotic and prokaryotic cells are well known to those skilled in the art. As mentioned herein above, they usually comprise regulatory sequences ensuring initiation of transcription and optionally poly-A signals ensuring termination of transcription and stabilization of the transcript. Additional regulatory elements may include
5 transcriptional as well as translational enhancers, and/or naturally-associated or heterologous promoter regions. Possible regulatory elements permitting expression in for example mammalian host cells comprise the CMV-HSV thymidine kinase promoter, SV40, RSV-promoter (Rous sarcoma virus), human elongation factor 1 α -promoter, aPM-I promoter (Schaffer, Biochem. Biophys. Res. Commun. 260 (1999), 416-425), or inducible promoter(s), like, metallothionein or tetracycline, or enhancers, like CMV enhancer or SV40-enhancer. For the expression in prokaryotic cells, a multitude of promoters including, for example, the tac-lac-promoter or the
10 trp promoter, has been described. Besides elements which are responsible for the initiation of transcription such regulatory elements may also comprise transcription termination signals, such as SV40-poly-A site or the tk-poly-A site, downstream of the polynucleotide. In this context, suitable expression vectors are known in the art such as Okayama-Berg cDNA expression vector pcDV1 (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pSPORT1 (GIBCO BRL), Casper, Casper-HS43, pUAST, or prokaryotic expression vectors, such as lambda gt11. Beside the nucleic acid molecules of the present invention, the vector may further comprise
20 nucleic acid sequences encoding for secretion signals. Such sequences are well known to the person skilled in the art. Furthermore, depending on the expression system used leader sequences capable of directing the (poly)peptide to a cellular compartment may be added to the coding sequence of the nucleic acid molecules of the invention and are well known in the art. The leader sequence(s) is (are) assembled in appropriate
30 phase with translation, initiation and termination sequences, and preferably, a leader sequence capable of directing secretion of translated protein, or a protein thereof, into the periplasmic space or extracellular

medium. Optionally, the heterologous sequence can encode a fusion protein including an C- or N-terminal identification peptide imparting desired characteristics, e.g., stabilization or simplified purification of expressed recombinant product. Once the vector has been incorporated into the appropriate host, the host is maintained under conditions suitable for high level expression of the nucleotide sequences, and, as desired, the collection and purification of the (poly)peptide(s) or fragments thereof of the invention may follow.

Furthermore, the vector of the present invention may also be a gene transfer or gene targeting vector. Gene therapy, which is based on introducing therapeutic genes into cells by ex-vivo or in-vivo techniques is one of the most important applications of gene transfer. Suitable vectors, methods or gene-delivering systems for in-vitro or in-vivo gene therapy are described in the literature and are known to the person skilled in the art; see, e.g., Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Onodua, *Blood* 91 (1998), 30-36; Verzeletti, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998), 2243-2251; Verma, *Nature* 389 (1997), 239-242; Anderson, *Nature* 392 (Supp. 1998), 25-30; Wang, *Gene Therapy* 4 (1997), 393-400; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957; US 5,580,859; US 5,589,466; US 4,394,448 or Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640, and references cited therein. In particular, said vectors and/or gene delivery systems are also described in gene therapy approaches in adipocyte (see, inter alia, US 5,869,037 or Zhou, *PNAS USA* 96 (1999), 2391-2395) or in the hypothalamus (see, inter alia, Geddes, *Front Neuroendocrinol.* 20 (1999), 296-316 or Geddes, *Nat. Med.* 3 (1997), 1402-1404). The nucleic acid molecules and vectors of the invention may be designed for direct introduction or for introduction via liposomes, viral vectors (e.g. adenoviral, retroviral), electroporation, ballistic (e.g. gene gun) or other delivery

systems into the cell. Additionally, a baculoviral system can be used as eukaryotic expression system for the nucleic acid molecules of the invention.

5 As will be discussed herein below, the nucleic acid molecule of the present invention and/or the above described vectors/hosts of the present invention may be particularly useful as pharmaceutical compositions. Said pharmaceutical compositions may be employed in diagnostic and/or therapeutic approaches, e.g. in gene therapy approaches. In this context,
10 it is envisaged that the nucleic acid molecules and/or vectors of the present invention may be employed to modulate, alter and/or modify the cellular expression and/or intracellular concentration of the (poly)peptide(s) of the invention or of (a) fragment thereof. Said modulation, alteration and/or modification may lead to up- or downregulation of the SOUP1 (poly)peptide and/or the gene product of the herein described SOUP1 gene. Furthermore,
15 said therapeutic approach(es) may lead to an alteration and/or modulation of the availability of active SOUP1 (poly)peptide/protein/gene product. In this context, the term "active" refers to the ability to perform its (normal) cellular function in an organism.

20 For gene therapy applications, nucleic acids encoding the (poly)peptide of the invention or fragments thereof may be cloned into a gene delivering system, such as a virus and the virus used for infection and conferring disease ameliorating or curing effects in the infected cells or organism.

25 As mentioned herein above, the nucleic acid molecule(s) and/or vector(s) may be employed in order to modulate/alter the gene expression or intracellular concentration of SOUP1 protein/(poly)peptide. Said modulation/alteration may also be achieved by antisense-approaches.

30 Antisense modulation of SOUP1 expression may employ antisense nucleic acids operably linked to gene regulatory sequences. For example, cells are

transfected with a vector comprising an *soup1* sequence with a promoter sequence oriented such that transcription of the gene yields an antisense transcript capable of binding to endogenous *soup1* encoding mRNA. Transcription of the antisense nucleic acid may be constitutive or inducible and the vector may provide for stable extrachromosomal maintenance and integration. Alternatively, single-stranded antisense nucleic acids that bind to genomic DNA or mRNA encoding a (poly)peptide of the invention or a fragment thereof may be administered to the target cell, in or temporarily isolated from a host, at a concentration that results in a substantial reduction in expression of said (poly)peptide. Furthermore, it is envisaged that expression of the (poly)peptide of the invention may be influenced, suppressed by other means than antisense approaches. Therefore, reduced expression of the (poly)peptide of the invention may also be achieved by RNA-mediated gene interference, which applies double-stranded RNA instead of antisense nucleic acids (see, Sharp, *Genes Dev.* 13 (1999), 139-141). Gene suppression by double stranded RNA or RNAi-approach is also described in Hunter, *Curr. Biol.* 10 (2000), R137-R140.

The nucleic acid molecule of the invention may therefore be used for the construction of appropriate anti-sense oligonucleotides which are able to inhibit the function of the nucleic acid molecules which either encode wildtype or mutant versions of the *SOUP1* (poly)peptide of this invention. Said anti-sense nucleotide comprises preferably at least 15 nucleotides, more preferably at least 20 nucleotides, even more preferably 30 nucleotides and most preferably at least 40 nucleotides.

In addition, ribozyme approaches are also envisaged in this invention. Ribozymes may specifically cleave the nucleic acid molecule of the invention.

In the context of the present invention ribozymes comprise, inter alia, hammerhead ribozymes, hammerhead ribozymes with altered core

sequences or deoxyribozymes (see, e.g., Santoro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 4262) and may comprise natural and in vitro selected and/or synthesized ribozymes. Nucleic acid molecules according to the present invention which are complementary to nucleic acid molecules coding for proteins/(poly)peptides regulating, causing or contributing to obesity and/or encoding a mammalian (poly)peptide involved in the regulation of body weight (see herein below) may be used for the construction of appropriate ribozymes (see, e.g., EP-B1 0 291 533, EP-A1 0 321 201, EP-A2 0 360 257) which specifically cleave nucleic acid molecules of the invention. Selection of the appropriate target sites and corresponding ribozymes can be done as described for example in Steinecke, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith, eds. Academic Press, Inc. (1995), 449-460.

The present invention also relates to a host cell transfected or transformed with the vector of the invention or a non-human host carrying the vector of the present invention, i.e. to a host cell or host which is genetically modified with a nucleic acid molecule according to the invention or with a vector comprising such a nucleic acid molecule. The term "genetically modified" means that the host cell or host comprises in addition to its natural genome a nucleic acid molecule or vector according to the invention which was introduced into the cell or host or into one of its predecessors/parents. The nucleic acid molecule or vector may be present in the genetically modified host cell or host either as an independent molecule outside the genome, preferably as a molecule which is capable of replication, or it may be stably integrated into the genome of the host cell or host.

The host cell of the present invention may be any prokaryotic or eukaryotic cell. Suitable prokaryotic cells are those generally used for cloning like *E. coli* or *Bacillus subtilis*. Furthermore, eukaryotic cells comprise, for example, fungal or animal cells. Examples for suitable fungal cells are yeast

cells, preferably those of the genus *Saccharomyces* and most preferably those of the species *Saccharomyces cerevisiae*. Suitable animal cells are, for instance, insect cells, vertebrate cells, preferably mammalian cells, such as e.g. CHO, HeLa, NIH3T3, MOLT-4, Jurkat, K562, HepG2, 3T3-442A, 3T3-L1 (and derivatives thereof), HIB-1B (see Villena, *Biochem J.* 331 (1998), 121-127), HEK 293, PAZ6 (see, Strobel, *Diabetologia* 42 (1999), 527-533). Further suitable cell lines known in the art are obtainable from cell line depositories, like the American Type Culture Collection (ATCC).

10 In a more preferred embodiment the host cell which is transformed with the vector of the invention is a mammalian cell, particularly an adipose cell, a brain cell, a hepatic cell, an epithelial cell, a blood cell or a cell (line) derived therefrom.

15 Non-human hosts are preferably non-human mammals, most preferably mice, rats, sheep, calves, dogs, monkeys or apes and may comprise *Psammomys obesus*. Said mammals may be indispensable for developing a cure, preferably a cure for obesity, adipositas, eating disorders and/or disorders leading to a pathological body mass/body weight. Furthermore, 20 the hosts of the present invention may be partially useful in producing the (poly)peptides (or fragments thereof) of the invention. It is envisaged that said (poly)peptide (or fragments thereof) be isolated from said host.

The non-human host of the present invention may also be a non-human 25 transgenic animal as described herein below (see Example 10). Particularly, the present invention envisages non-human transgenic animals comprising a mutated form of the nucleic acid molecules of the invention or non-human transgenic animals wherein the nucleic acid molecule of the present invention has been deleted and/or inactivated. Said deletion may be a 30 partial deletion. Particularly preferred non-human transgenic animals are *Drosophila*, *Nematodes* (like *C. elegans*), mice, rat, sheep and the like.

Furthermore, the present invention relates to a method of producing a (poly)peptide encoded by the nucleic acid molecule of the invention comprising culturing the host cell of the present invention under suitable conditions that allow the synthesis of said (poly)peptide and recovering
5 and/or isolating the (poly)peptide produced from the culture.

The transformed host cells can be grown in fermentors and cultured according to techniques known in the art to achieve optimal cell growth. The (poly)peptide of the invention can then be isolated from the growth
10 medium, cellular lysates, cellular membrane fractions or inclusion bodies. Once expressed, the protein of the present invention can be purified according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, gel electrophoresis and the like; see, Scopes, "Protein Purification", Springer-
15 Verlag, N.Y. (1982). For example, "Current Protocols in Molecular Biology" (2000, John Wiley and Sons) provide for purification protocols. Further purification schemes are known in the art and provide also for the purification of membrane proteins. For example purification from expression in yeast/yeast expression systems is described in Murdza-Inglis
20 (1991), JBC 266, 11871-11875, purification/expression in bacteria has been disclosed in Kaplan (1996), J. Bioenerg. Biomembr. 28, 41-47 or in eukaryotic cells (Casteilla (1990), PNAS 87, 5124-5128). Substantially pure proteins of at least about 60%, at least about 70%, at least about
25 80% or at least about 90 to 97% homogeneity are preferred, and 98 to 99% or more homogeneity are most preferred, for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the proteins may then be used therapeutically (including extracorporeally) or in developing and performing assay procedures.

30 Additionally, the present invention relates to a (poly)peptide encoded by the nucleic acid molecule of the invention or produced by or obtainable by the above-described method. The term "(poly)peptide" as employed herein

denotes either a peptide, a full-length protein or (a) fragment(s) thereof. A peptide is preferably a fragment of the (poly)peptide of the invention. The term "(poly)peptide" comprises (a) peptide(s) or (a) (poly)peptide(s) which encompass amino acid chains of any length, wherein the amino acid residues are linked by covalent peptide bonds. Preferably, said amino acid chains of a "peptide" comprise at least 10 amino acids, more preferably at least 20, more preferably at least 30, more preferably at least 40, even more preferably at least 50 and, most preferably at least 60 amino acids. It is even more preferred that the (poly)peptides of the invention comprise at least 100, more preferred at least 200, more preferred at least 300, more preferred at least 400, more preferred at least 500, even more preferred at least 600 amino acids.

The term "or (a) fragment(s) thereof" as employed in the present invention and in context with (poly)peptides of the invention, comprises specific peptides, amino acid stretches of the (poly)peptides as disclosed herein. It is preferred that said "fragment(s) thereof" is/are functional fragment(s). The term "functional fragment" denotes a part of the above identified (poly)peptide of the invention which fulfils, at least in part, physiological and/or structural activities of the (poly)peptide of the invention. It is, however, also envisaged that said fragment functions as intervening and/or inhibiting molecule for the (poly)peptide of the invention. For example, it is envisaged that fragments of the (poly)peptide of the invention may structurally and/or physiologically interact with the (poly)peptide of the invention and thereby inhibit the function of said (poly)peptide.

The (poly)peptides of the present invention may be recombinant (poly)peptides expressed in host cells like bacteria, yeasts, or other eukaryotic cells, like mammalian or insect cells. Alternatively, they may be isolated from viral preparations. In another embodiment of the present invention, synthetic (poly)peptides may be used. Therefore, such a (poly)peptide may be a (poly)peptide as encoded by the nucleic acid

molecule of the invention which only comprises naturally occurring amino acid residues, but it may also be a (poly)peptide containing modifications. These include covalent derivatives, such as aliphatic esters or amides of a carboxyl group, O-acetyl derivatives of hydroxyl containing residues and N-acyl derivatives of amino group containing residues. Such derivatives can be prepared by linkage to reactable groups which are present in the side chains of amino acid residues and at the N- and C-terminus of the protein. Furthermore, the (poly)peptide can be radiolabeled or labeled with a detectable group, such as a covalently bound rare earth chelate, or conjugated to a fluorescent moiety. The (poly)peptide of the present invention can be, for example, the product of expression of a nucleotide sequence encoding such a (poly)peptide, a product of chemical modification or can be purified from natural sources, for example, viral preparations. Furthermore, it can be the product of covalent linkage of (poly)peptide domains.

The peptides/(poly)peptides may also be produced by biochemical or synthetic techniques. Those methods are known to those of ordinary skill in the art (see, e.g. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149-2146; Stewart, "Solid Phase Peptide Synthesis", WH Freeman Co, San Francisco (1969); Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin (1987); Janson, "Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications", VCH Publishers, New York, Weinheim, Cambridge (1989); Wrede, "Concepts in Protein Engineering and Design", Walter de Gruyter, Berlin, New York (1994)).

Additionally, within the scope of the invention are peptides/(poly)peptides wherein the above mentioned amino acid(s) and/or peptide bonds have been replaced by functional analogs, inter alia by peptidomimetics. Peptidomimetics is well known in the art and corresponding art describing this method are mentioned below. Therefore, the present invention also encompasses functional derivatives and/or analogues of said peptides

comprising a specific SOUP1-derived peptide. Further methods for the preparation of peptides/(poly)peptides are described in Sambrook et al., loc. cit., or in Oxender and Fox (1987) "Protein Engineering", Alan Liss Inc. New York. Protein preparation of chemical derivatives and/or analogues are
5 described in, for example, Beilstein "Handbook of Organic Chemistry", Springer Edition New York, or in "Organic Synthesis", Wiley, New York.

The present invention also relates to a fusion protein comprising the (poly)peptide of the invention or (a) fragment thereof. Therefore, in addition
10 to the (poly)peptides of the present invention, said fusion protein can comprise at least one further domain, said domain being linked by covalent or non-covalent bonds. The linkage can be based on genetic fusion according to the methods known in the art (Sambrook et al., loc. cit., Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing
15 Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)) or can be performed by, e.g., chemical cross-linking as described in, e.g., WO 94/04686. The additional domain present in the fusion protein comprising the (poly)peptide of the invention may preferably be linked by a flexible linker, advantageously a (poly)peptide linker, wherein said (poly)peptide linker
20 preferably comprises plural, hydrophilic, peptide-bonded amino acids of a length sufficient to span the distance between the C-terminal end of said further domain and the N-terminal end of the peptide, (poly)peptide or antibody or vice versa. The above described fusion protein may further comprise a cleavable linker or cleavage site, which, for example, is
25 specifically recognized and cleaved by proteinases or chemical agents. Additionally, said at least one further domain may be of a predefined specificity or function. In this context, it is understood that the (poly)peptides of the invention may be further modified by conventional methods known in the art. This allows for the construction of fusion
30 proteins comprising the (poly)peptide of the invention and other functional amino acid sequences, e.g., organelle localization signals, transactivating domains, DNA-binding domains, hormone-binding domains, protein tags

WO 02/42455

26

PCT/EP01/13663

(e.g. GST, GFP, h-myc peptide, FLAG, HA peptide, Strep), transmembrane domains or fatty acid attachment motifs which may be derived from heterologous proteins.

5 The fusion protein of the invention may also be a mosaic (poly)peptide comprising at least two epitopes of the (poly)peptide of the invention wherein said mosaic (poly)peptide lacks amino acids normally intervening between the epitopes in the native SOUP1 protein.

10 Inter alia, such mosaic (poly)peptides are useful in the applications and methods described herein, since they may comprise within a single peptide or (poly)peptide a number of relevant epitopes possibly presented linearly or as multi-antigen peptide system in a case of lysines. Relevant epitopes can be separated by spacer regions.

15 It is in particular preferred that the fusion protein of the invention comprising said polypeptide or (a) fragment(s) thereof comprise(s) at least one, preferably at least two, more preferably at least three, more preferably at least four, more preferably at least five and most preferably six amino
20 acid sequences as depicted in any one of SEQ ID NOs: 15 to 50, 61 or 62. As disclosed herein above, said sequence relate to specifically deduced transmembrane regions of the SOUP1 proteins described herein. It is particularly preferred that the fusion protein of the invention comprises at least one and most preferably at least six amino acid sequences as
25 depicted in any one of SEQ ID NOs: 27 to 50. It is also envisaged that said fusion protein comprises transmembrane regions which are derived from different species, e.g. from human, mouse or zebrafish. Yet, most preferred are fusion proteins which comprise transmembrane regions from one species.

30 The nucleic acid molecule, the (poly)peptide (as well as the antibody or fragment or derivative thereof, the aptamer or other receptor described

herein), the fusion protein, the mosaic (poly)peptide or the anti-sense oligonucleotide of the invention may be detectably labeled. A variety of techniques are available for labeling biomolecules, are well known to the person skilled in the art and are considered to be within the scope of the present invention. Such techniques are, e.g., described in Tijssen, "Practice and theory of enzyme immuno assays", Burden, RH and von Knippenburg (Eds), Volume 15 (1985), "Basic methods in molecular biology"; Davis LG, Dibner MD; Battey Elsevier (1990), Mayer et al., (Eds) "Immunochemical methods in cell and molecular biology" Academic Press, London (1987), or in the series "Methods in Enzymology", Academic Press, Inc.

There are many different labels and methods of labeling known to those of ordinary skill in the art. Examples of the types of labels which can be used in the present invention include enzymes, radioisotopes (like ^{32}P or ^{125}I), colloidal metals, fluorescent compounds/fluorochromes (like fluorescein, rhodamine, Texas Red, etc.), chemiluminescent compounds, and chemi- or bioluminescent compounds (like dioxetanes, luminol or acridiniums).

Commonly used labels furthermore comprise, inter alia, enzymes (like horse radish peroxidase, β -galactosidase, alkaline phosphatase), biotin or digoxigenin. Labeling procedures, like covalent coupling of enzymes or biotinyl groups, iodinations, phosphorylations, biotinylation, random priming, nick-translations, tailing (using terminal transferases) are well known in the art.

Detection methods comprise, but are not limited to, autoradiography, fluorescence microscopy, direct and indirect enzymatic reactions, etc.

The present invention furthermore additionally relates to an antibody or a fragment or derivative thereof or an antiserum or an aptamer or another receptor specifically recognizing an epitope on the nucleic acid, or the (poly)peptide of the invention. The general methodology for producing

antibodies is well-known and has, for monoclonal antibodies, been described in, for example, Köhler and Milstein, Nature 256 (1975), 494 and reviewed in J.G.R. Hurrel, ed., "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", CRC Press Inc., Boca Raton, FL (1982). In accordance with the present invention the term "antibody" relates to monoclonal or polyclonal antibodies. Polyclonal antibodies (antiserum) can be obtained according to conventional protocols. Antibody fragments or derivatives comprise F(ab')₂, Fab, Fv or scFv fragments; see, for example, Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press 1988, Cold Spring Harbor, NY. Preferably the antibody of the invention is a monoclonal antibody. Furthermore, in accordance with the present invention, the derivatives of the invention can be produced by peptidomimetics. In the context of the present invention, the term "aptamer" comprises nucleic acids such as RNA, ssDNA (ss = single stranded), modified RNA, modified ssDNA or PNAs which bind a plurality of target sequences having a high specificity and affinity. Aptamers are well known in the art and, inter alia, described in Famulok, Curr. Op. Chem. Biol. 2 (1998), 320-327. The preparation of aptamers is well known in the art and may involve, inter alia, the use of combinatorial RNA libraries to identify binding sites (Gold, Ann. Rev. Biochem. 64 (1995), 763-797). Said other receptors may, for example, be derived from said antibody etc. by peptidomimetics. The specificity of the recognition implies that other known proteins, molecules are not bound. A suitable host for assessing the specificity would imply contacting the above recited compound comprising an epitope of the nucleic acid molecule or the (poly)peptide of the invention as well as corresponding compounds e.g. from protein or nucleic acid molecules known in the art, for example in an ELISA format and identifying those antibodies etc. that only bind to the compound of the invention but do not or to no significant extent cross-react with said corresponding compounds.

The invention also relates to an anti-sense oligonucleotide of a nucleic acid molecule of the invention. As said anti-sense oligonucleotide may be employed in scientific as well as in diagnostic or in therapeutic purposes.

5 The invention furthermore provides for a non-human animal expressing the polypeptide of the invention or the fusion protein of the invention or which is transfected with the vector of the invention which comprises the nucleic acid molecule of the invention.

10 It is envisaged, for example, that the non-human animal over- or under-expresses the polypeptide of the invention. Furthermore, the invention relates to a non-human animal, wherein the nucleic acid molecule of the invention or a homolog, paralog or ortholog thereof is silenced and/or mutated.

15 The above mentioned non-human animal is preferably selected from the group consisting of mouse, rat, sheep, hamster, pig, dog, monkey, rabbit, calf, horse, nematodes, fly and fish.

20 The invention also relates to transgenic non-human animals such as transgenic mice, rats, hamsters, dogs, monkeys, rabbits, pigs, *C. elegans*, *Drosophila*, fish (like zebrafish or torpedofish) comprising a nucleic acid molecule or vector of the invention. Said animal may have one or several copies of the same or different nucleic acid molecules encoding one or
25 several forms of the (poly)peptide of the invention, regulating, causing or contributing to obesity or involved in the regulation of body weight. These animals are partially useful as research models for obesity, adipositas, eating disorders, wasting and/or other disorders of body weight/body mass as described herein. Furthermore, said transgenic non-human animals are
30 well suited for, e.g., pharmacological studies of drugs in connection with mutant forms of the above described SOUP1 protein.

In another embodiment, the present invention relates to the use of the nucleic acid molecule, the vector, the host, the polypeptide, the fusion protein, the antibody, fragment or derivative thereof or an aptamer or another receptor or the anti-sense oligonucleotide of the invention for
5 controlling the function of a gene and/or a gene product which is influenced and/or modified by a polypeptide as defined herein, e.g. SOUP1. Said influence/modification may occur by direct interaction between proteins/protein fragments and/or by providing metabolic compounds, or ions that are necessary for the function, activity and/or expression of said
10 gene and/or gene product. It is particularly preferred that said gene and/or gene product is a gene and/or gene product expressed in organelles. Said organelle may be, inter alia, a mitochondrion or a peroxisome.

It is particularly preferred that said gene and/or gene product is a member
15 of the UCP family. Members of the UCP family are well known and described herein above.

The present invention furthermore provides for a composition comprising the nucleic acid molecule, the vector, the host, the polypeptide, the fusion
20 protein, the antibody, fragment or derivative thereof or an aptamer or another receptor or the anti-sense oligonucleotide of the invention. Said composition may be, inter alia, a diagnostic composition or a pharmaceutical e.g. therapeutic composition for use e.g. in human or veterinary medicine. Further, the composition may comprise suitable
25 carriers, diluents and/or adjuvants.

In addition, the present invention provides for the use of the composition as defined herein for detecting and/or verifying an disorder in cells, cell masses, organs and/or subjects and/or for the treatment, alleviation and/or
30 prevention of an disorder in cells, cell masses, organs and/or subjects. Said disorder may be a metabolic disorder or a mitochondrial disorder, whereby mitochondrial disorders comprise disorders like deafness, retinopathies,

progressive encephalopathies, ataxias, spastic paraplegia, metabolic acidosis and others.

Said metabolic disorder may comprise obesity, adipositas, eating disorders (bulimia nervosa, anorexia nervosa), cachexia (wasting), pancreatic dysfunction (like diabetes, in particular type 2 diabetes) and/or a disorder related to ROS (reactive oxygen species) production (in particular responses to infections, in aging and cancerogenesis).

For example, it has been shown that UCPs are involved in pancreatic disorders, e.g. diabetes. A role for uncoupling proteins in diabetes was demonstrated by induction of UCP3 in Streptozotocin-induced diabetes in rodents (see, inter alia, Hidaka, Proc Soc Exp Biol Med 224: 172-177 (2000), Hidaka, Diabetes 48: 430-435 (1999)).

Furthermore it was shown that UCP2 expression in pancreatic beta-cells influences beta-cell function and insulin secretion (Wang, Diabetes 48: 1020-1025 (1999); Chan, Diabetes 48: 1482-1486 (1999)).

Reactive oxygen species (ROS) can lead to membrane dysfunction, DNA damage and inactivation of proteins. Pathological consequences include cancer, arthritis and neurodegenerative disease. ROS limiting metabolism is a major mechanism to protection from cellular damage. In particular obesity can cause increased oxidative stress (Hayes, Free Radic Res 31: 273-300 (1999); Yang, Arch Biochem Biophys 378: 259-268 (2000)).

In contrast, increased ROS production in macrophages can improve immune response. So are UCP2 knockout mice more resistant against infection with certain pathogens.

Therefore, the compounds of the present invention, being capable of modifying, inter alia, UCPs may be well suited for the above identified purposes.

- 5 In a further embodiment, the present invention relates to the use of the nucleic acid molecule, the vector, the host, the polypeptide, the fusion protein, the antibody, fragment or derivative thereof or an aptamer or another receptor or the anti-sense oligonucleotide for identifying substances capable of interacting with the polypeptide as defined in herein.
- 10 Said substance is capable of interacting with said polypeptide may be (an) antagonist(s) or (an) agonist(s).

In yet a further embodiment, the present invention provides for a method of identifying a polypeptide or (a) substance(s) involved in cellular metabolism in an animal or capable of modifying homeostasis comprising

15 the steps of:

- (a) testing a collection of polypeptides or substances for interaction with the polypeptide of the invention (a) fragment(s) thereof or the fusion protein of the invention or
- 20 (a) fragment(s) thereof using a readout system; and
- (b) identifying polypeptides or substances which test positive for interaction in step (a).

The term "cellular metabolism" as used herein above may comprise an

25 metabolic event involved in the regulation of ion-, vitamin- or metabolite-transport across organelle membranes. These transport events or the regulation thereof may influence energy homeostasis, accumulation of storage compounds and/or radical production/elimination.

30 The polypeptide or substance identified by the method disclosed herein above may be, inter alia, a polypeptide or a substance interacting directly or indirectly (e.g. via linker proteins or via physiological parameters) with

the polypeptide of the invention, i.e. with SOUP1 proteins and/or a fragment thereof. The term "substance" as used herein broadly relates to physiological and non-physiological, e.g. synthetic substances.

5 The term "fragment" as used in the specification relates to fragments of SOUP1 proteins which comprise at least 5, preferably at least 10, more preferably at least 15 and even more preferably at least 25 amino acids and/or further comprise at least one, preferably at least 2, more preferably at least 3, more preferably at least 4, more preferably at least 5 and most
10 preferably at least 6 transmembrane regions. Yet, it is also envisaged that a fragment as used herein represents the N- or C-terminus of a SOUP1 protein.

Said testing for interaction of step (a) as described herein above may be
15 carried out by methods known to the skilled artisan and were described herein. In particular these assays comprise biochemical, immunological and/or molecular biological assays.

Said interaction assays employing read-out systems are well known in the
20 art and comprise, inter alia, two hybrid screenings (as, described, inter alia, in EP-O 963 376, WO 98/25947, WO 00/02911) GST-pull-down columns, co-precipitation assays from cell extracts as described, inter alia, in Kasus-Jacobi, Oncogene 19 (2000), 2052-2059, "interaction-trap" systems (as described, inter alia, in US 6,004,746) expression cloning (e.g. lamda gt11),
25 phage display (as described, inter alia, in US 5,541,109), in vitro binding assays and the like. Further interaction assay methods and corresponding read out systems are, inter alia, described in US 5,525,490, WO 99/51741, WO 00/17221, WO 00/14271 or WO 00/05410.

30 Similarly, interacting molecules/(poly)peptides may be deduced by cell-based techniques well known in the art. These assays comprise, inter alia, the expression of reporter gene constructs or "knock-in" assays, as

described, for, e.g., the identification of drugs/small compounds influencing the gene expression. Said "knock-in" assays may comprise "knock-in" in tissue culture cells, as well as in (transgenic) animals. Examples for successful "knock-ins" are known in the art (see, inter alia, Tanaka, J. Neurobiol. 41 (1999), 524-539 or Monroe, Immunity 11 (1999), 201-212).
Furthermore, biochemical assays may be employed which comprise, but are not limited to, binding of the (poly)peptides of the invention (or (a) fragment(s) thereof) to other molecules/(poly)peptides, peptides or binding of the (poly)peptides of the invention (or (a) fragment(s) thereof) to itself (themselves) (dimerizations, oligomerizations, multimerizations) and assaying said interactions by, inter alia, scintillation proximity assay (SPA) or homogenous time-resolved fluorescence assay (HTRFA).

Further method(s) which may be employed comprises FRET (fluorescence resonance energy transfer; as described, inter alia, in Ng, Science 283 (1999), 2085-2089), or fluorescence polarization assays. These methods are well known in the art and inter alia described in Fernandez, Curr. Opin. Chem. Biol. 2 (1998), 547-603.

Said "testing of interaction" may also comprise the measurement of a complex formation. The measurement of a complex formation is well known in the art and comprises, inter alia, heterogeneous and homogeneous assays. Homogeneous assays comprise assays wherein the binding partners remain in solution and comprise assays, like agglutination assays. Heterogeneous assays comprise assays like, inter alia, immuno assays, for example, ELISAs, RIAs, IRMAs, FIAs, CLIAs or ECLs.

Further methods and assays for identifying interaction and/or binding partners of the (poly)peptides of the invention or for the identification of agents/compounds which are capable of interfering with the binding of the (poly)peptides of the invention with this (specific) intracellular binding partners/targets are disclosed herein below. Said additional and/or further

method(s) and assay(s) may also be employed in the above described method for identifying a (poly)peptide involved in the regulation of body weight and/or capable of interacting with the SOUP1 (poly)peptide of the invention.

5

Any measuring or detection step of the method(s) of the present invention may be assisted by computer technology. For example, in accordance with the present invention, said detection and/or measuring step can be automated by various means, including image analysis, spectroscopy or

10

In yet another embodiment, the present invention relates to the method(s) described herein above, which further comprises the step of identifying the nucleic acid molecule(s) encoding the one or more interacting (poly)peptides.

15

The identification of such nucleic acid molecule(s) is well known in the art and comprises, inter alia, the use of specific and/or degenerate primers. Furthermore, recombinant technologies as described in Sambrook, loc. cit. or in Glick (1994), "Molecular Biotechnology", ASM Press, Washington may be employed.

20

In yet a further embodiment, the present invention relates to a method of identifying a polypeptide or (a) substance(s) involved in cellular metabolism in an animal or capable of modifying homeostasis comprising the steps of

25

- (a) testing a collection of polypeptides or substances for interaction with the polypeptide of the invention or identified by the method described herein above; and
- (b) identifying polypeptides that test positive for interaction in step (a); and optionally
- (c) repeating steps (a) and (b) with the polypeptides identified one or more times wherein the newly identified polypeptide

30

WO 02/42455

36

PCT/EP01/13663

replaces the previously identified polypeptide as a bait for the identification of a further interacting polypeptide.

5 The methods described herein above may further comprise the step of identifying the nucleic acid molecule(s) encoding the one or more interacting (poly)peptides.

10 The present invention also provides for the use of nucleic acid molecules as described herein or of polypeptides as described herein for the detection and/or isolation of genes and/or gene products involved in functional cascades of cell metabolism, in particular of energy metabolism.

15 Additionally, the present invention relates to a method of identifying a polypeptide involved in the regulation of body weight in a mammal comprising the steps of

- (a) contacting a collection of (poly)peptides with the polypeptide of the invention or (a) fragment(s) thereof or the fusion protein of the invention or (a) fragment(s) thereof under conditions that allow binding of said (poly)peptides;
- 20 (b) removing (poly)peptides from said collection of (poly)peptides that did not bind to said polypeptide of the invention or the fusion protein of the invention in step (a); and
- (c) identifying (poly)peptides that bind to said polypeptide of the invention or the fusion protein of the invention.

25

The method as described herein above may be carried out by the person skilled in the art without further ado. Said "contacting" of step (a) may, inter alia, be carried out in solution employing (magnetic) beads coupled with the (poly)peptide of the invention and/or fragments thereof. Non-bound (poly)peptides may be easily removed by methods known in the art, comprising, for example, magnetic separation, gravity, affinity column systems and corresponding washes and the like.

30

Methods for identifying bound (poly)peptides are well known in the art and comprise, inter alia, SDS PAGE analysis and Western blotting. Furthermore, techniques like 2D-gel electrophoresis, in-gel digests, microsequencing, N-terminal sequencing, MALDI-MS, analysis of peptides in mass spectroscopy, peptide mass fingerprinting, PSD-MALDI-MS and/or (micro-) HPLC. Separated polypeptides to be identified may be further analyzed by, inter alia, Edman-degradation, MALDI-MS methods, ladder sequencing (Thiede, FEBS 357 (1995), 65).

By use of the above described and mentioned methods (and others known in the art) amino acid sequences of the (poly)peptides to be identified can be deduced and sequenced. From these sequenced amino acid fragments, degenerative oligonucleotides may be deduced and synthesized that may be used to screen, for example, genomic or cDNA libraries to identify and clone the corresponding gene/cDNA.

Furthermore, phage display approaches may be employed in the method(s) of this invention. Phage display allows the identification of proteins that interact with a molecule of interest. Libraries of phage, each displaying a different peptide epitope are tested for binding to the molecule of interest. Bound phages can be purified and the insert encoding the peptide epitope may be sequenced. Phage display kit(s) are known in the art and commercially available, e.g., Display Systems Biotech Cat.No. 300-110.

The present invention relates, in yet another embodiment to the method(s) described herein, wherein said (poly)peptide of the invention is fixed to a solid support.

Solid supports are well known in the art and comprise, inter alia, commercially available column materials, polystyrene beads, latex beads, magnetic beads, colloid metal particles, glass and/or silicon chips and surfaces, nitrocellulose strips, membranes, sheets, duracytes, wells and

walls of reaction trays, plastic tubes etc. Suitable methods for fixing/immobilizing said (poly)peptide(s) of the invention are well known and include, but are not limited to ionic, hydrophobic, covalent interactions and the like.

5 In a particular preferred embodiment, said solid support is a gel filtration or an affinity chromatography material.

10 In a yet more preferred embodiment of the method of the invention as described herein above, said binding (poly)peptides are released prior to said identification in step (c).

15 Said release may be effected by elution. Such elution methods are well known in the art and comprise, inter alia, elution with solutions of different ionic strength or different pH, or with intercalating or competing agents/molecules/peptides.

20 Furthermore, in a yet more preferred embodiment, the present invention relates to the above described method of the invention, wherein said method further comprises the step of identifying the nucleic acid molecule(s) encoding the one or more binding (poly)peptides.

25 As pointed out herein above, said nucleic acid molecule(s) may be deduced, inter alia, by employing degenerate primers/oligonucleotides in order to detect the corresponding gene(s) and/or cDNA(s) or by expression cloning.

A method of identifying a compound influencing the expression of the nucleic acid molecule of the invention comprising the steps of

30 (a) contacting a host carrying an expression vector comprising the nucleic acid molecule of the invention or the nucleic acid molecule identified by the method of the invention operatively

linked to a readout system with a compound or a collection of compounds;

(b) assaying whether said contacting results in a change of signal intensity provided by said readout system; and, optionally,

5 (c) identifying a compound within said collection of compounds that induces a change of signal in step (b);

wherein said change in signal intensity correlates with a change of expression of said nucleic acid molecule.

10 Furthermore, the present invention provides for a method of identifying a compound influencing the activity of a (poly)peptide as defined herein above comprising the steps of

(a) contacting a host carrying an expression vector comprising the nucleic acid molecule of the invention operatively linked to a readout system and/or carrying a (poly)peptide of the invention linked to a readout system with a compound or a collection of compounds;

15 (b) assaying whether said contacting results in a change of signal intensity provided by said readout system; and, optionally

20 (c) identifying a compound within said collection of compounds that induces a change of signal in step (b);

wherein said change in signal correlates with a change in activity of said (poly)peptide.

25 The term "activity" as used herein above in context of the method of the invention also comprises the "function" of (a) (poly)peptide(s) of the invention. Said function may comprise, as mentioned herein above, enzymatic activities or other functions, like, inter alia, involvement in signalling pathways. Such activities and modulators of such activities may
30 be determined and/or identified by convenient in vitro or in vivo assays as described herein or by variations thereof. The underlying technology is widely and commonly known to the person skilled in the art.

Readout systems operatively linked to the nucleic acid molecules of the invention or linked to the (poly)peptides of the invention are disclosed herein and comprise, but are not limited to, assays based on radioactive labels, luminescence, fluorescence, etc. Inter alia, said readout system may
5 comprise fluorescence resonance energy transfer (FRET). The above described methods are particularly useful in (automated) high-throughput screenings. In context of this invention, the above mentioned "readout system operatively linked to the nucleic acid molecules of the invention" also comprises readout systems which are located on different molecules,
10 e.g. nucleic acid molecules, like, inter alia, other plasmids, vectors etc.

Said host of step (a) of the methods described herein above may be a eukaryotic host cell. Said host cell may be a yeast cell or a plant cell. It is particularly preferred that said eukaryotic host cell is a mammalian host
15 cell. However, said host cell may also be a prokaryotic cell, e.g. a bacterium. Particularly preferred are prokaryotic (host) cells as described herein above.

The term "compound" in the method(s) of the invention includes a single
20 substance or a plurality of substances which may or may not be identical. Said compound(s) may be comprised in, for example, samples, e.g., cell extracts from, e.g., plants, animals or microorganisms. Furthermore, said compound(s) may be known in the art but hitherto not known to be capable of influencing the activity of (a) (poly)peptide(s) of the invention or
25 not known to be capable of influencing the expression of the nucleic acid molecule of the invention, respectively. The plurality of compounds may be, e.g., added to a sample in vitro, to the culture medium or injected into the cell.

30 If a sample (collection of compounds) containing (a) compound(s) is identified in the method(s) of the invention, then it is either possible to isolate the compound from the original sample identified as containing the

compound in question or one can further subdivide the original sample, for example, if it consists of a plurality of different compounds, so as to reduce the number of different substances per sample and repeat the method with the subdivisions of the original sample. It can then be
5 determined whether said sample or compound displays the desired properties by methods known in the art such as described herein. Depending on the complexity of the samples, the steps described above can be performed several times, preferably until the sample identified according to the method of the invention only comprises a limited number
10 of or only one substance(s). Preferably said sample comprises substances of similar chemical and/or physical properties, and most preferably said substances are identical. The methods of the present invention can be easily performed and designed by the person skilled in the art, for example in accordance with other cell based assays described in the prior art (see,
15 e.g., EP-A-O 403 506). Furthermore, the person skilled in the art will readily recognize which further compounds and/or cells may be used in order to perform the methods of the invention, for example, host cells as described herein above or enzymes, if necessary, that, e.g., convert a precursor compound into the active compound which in turn influences the
20 expression of the nucleic acid molecule of the invention and/or influences the activity of (a) (poly)peptide of the invention. Such adaptation of the method of the invention is well within the skill of the person skilled in the art and can be performed without undue experimentation.

25 Compounds which can be used in accordance with the method of the present invention include, inter alia, peptides, proteins, nucleic acids including cDNA expression libraries, antibodies, small organic compounds, ligands, PNAs and the like. Said compounds can also be functional derivatives or analogues of known activators or inhibitors. Methods for the
30 preparation of chemical derivatives and analogues are well known to those skilled in the art and are described in, for example, Beilstein, loc. cit. Furthermore, said derivatives and analogues can be tested for their effects

according to methods known in the art and/or as described herein. Furthermore, peptidomimetics and/or computer aided design of appropriate activators or inhibitors of the expression of the nucleic acid molecules of the invention or of the activity of (a) (poly)peptide of the invention can be used, for example, according to the methods described herein. Appropriate computer systems for the computer aided design of, e.g., proteins and peptides are described in the prior art, for example, in Berry, Biochem. Soc. Trans. 22 (1994), 1033-1036; Wodak, Ann. N. Y. Acad. Sci. 501 (1987), 1-13; Pabo, Biochemistry 25 (1986), 5987-5991. The results obtained from the above-described computer analysis can be used in combination with the method of the invention for, e.g., optimizing known compounds, substances or molecules. Appropriate compounds can also be identified by the synthesis of peptidomimetic combinatorial libraries through successive chemical modification and testing the resulting compounds, e.g., according to the methods described herein. Methods for the generation and use of peptidomimetic combinatorial libraries are described in the prior art, for example in Ostresh, Methods in Enzymology 267 (1996), 220-234 and Dörner, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 709-715. Furthermore, the three-dimensional and/or crystallographic structure of inhibitors or activators of SOUP1 protein or the soup1 nucleic acid molecule can be used for the design of peptidomimetic inhibitors or activators of the (poly)peptide of the invention to be tested in the method of the invention (Rose, Biochemistry 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 1545-1558).

In a particularly preferred embodiment, the above described methods of the invention are method(s) wherein said change in signal intensity is an increase in signal intensity or a decrease in signal intensity. The above described method(s) of the invention for identifying compounds influencing the expression of the nucleic acid molecule of the invention and/or the activity of the (poly)peptide of the invention may also be employed for screening of said compound(s).

In yet a further embodiment, the invention provides for a method of assessing the impact of the expression of one or more polypeptides or of one or more fusion proteins of the invention in an animal comprising the steps of

- 5 (a) overexpressing a nucleic acid molecule coding for a polypeptide or a fusion protein of the invention in said animal; and
- (b) determining whether the weight of said animal has increased, decreased, whether metabolic changes are induced and/or
- 10 whether the eating behaviour is modified.

Similarly, the present invention also relates to a method of assessing the impact of the expression of one or more (poly)peptides or of one or more fusion proteins of the invention in an animal comprising the steps of

- 15 (a) underexpressing a nucleic acid molecule coding for a polypeptide or a fusion protein of the invention in said animal; and
- (b) determining whether the weight of said animal has increased or decreased, whether metabolic changes are induced and/or
- 20 whether the eating behaviour is modified.

Transgenic animals as described herein above may be particularly useful for the above described methods of assessing the impact of the expression of one or more (poly)peptide of the invention. The above mentioned

25 "underexpression" of the nucleic acid molecule of the invention comprises, inter alia, full deletions of both alleles, or the deletion of any one allele. Furthermore, said term comprises the generation of a mutation which leads to the expression of a less functional protein/(poly)peptide in the test animal.

A method of screening for an agent which modulates the interaction of a polypeptide as defined herein above with a binding target/agent, comprising the steps of

- (a) incubating a mixture comprising
 - 5 (aa) a polypeptide of the invention, or a fragment thereof or a fusion protein of the invention or a fragment thereof;
 - (ab) a binding target/agent of said (poly)peptide or fusion protein or fragment thereof; and
 - (ac) a candidate agent
- 10 under conditions whereby said (poly)peptide, fusion protein or fragment thereof specifically binds to said binding target/agent at a reference affinity;
- (b) detecting the binding affinity of said (poly)peptide, fusion protein or fragment thereof to said binding target to determine
- 15 an (candidate) agent-biased affinity; and
- (c) determining a difference between (candidate) agent-biased affinity and the reference affinity.

As pointed out herein above, a specific binding target/agent of the (poly)peptide(s) of the present invention may comprise molecules involved in signalling pathways and/or specific receptors contacting of the (poly)peptide of the invention. However, it is also envisaged that said binding target/agent of the (poly)peptide of the invention is said (poly)peptide itself, leading, inter alia, to dimerizations or multimerizations. Further (natural and artificial) binding targets/agents may be identified by methods known in the art and disclosed herein.

The "reference affinity" of the interaction of the (poly)peptides of the invention and its binding targets/agents may be established and/or deduced by methods known in the art. Said methods comprise, but are not limited to, in vitro and in vivo methods and may involve binding assays as described herein. In particular, said binding assays encompass any assay

where the molecular interaction of the (poly)peptides of the invention with binding targets/agents be evaluated. Said binding target/agent may comprise natural (e.g. intracellular) binding targets/agents, such as, e.g., SOUP1-substrate, SOUP1 (poly)peptide itself, SOUP1 (poly)peptide
5 regulators and/or molecules of signalling cascades. Within the scope of this invention are, however also non-natural binding partners of the (poly)peptide of the invention, which may comprise, e.g., antibodies or derivatives and/or fragments thereof, aptamers, as well as non-natural receptor molecules. Said binding targets/agents also comprise antagonists
10 as well as agonists of the (poly)peptides of the present invention.

Specific affinities, activities and/or function of the (poly)peptide(s) of the invention may be determined by convenient in vitro, cell-based or in vivo assays, e.g. in vitro binding assays, cell culture assays, in animals (e. g.
15 gene therapy, transgenics), etc. Binding assays encompass any assay where the molecular interaction of a (poly)peptide of the invention with a binding target is evaluated. The binding target may be a natural intracellular binding target such as oligomerization (dimerization, multimerization) of said (poly)peptide of the invention itself, a substrate or a regulating protein
20 of said (poly)peptide of the invention or another regulator that directly modulates the activity or the (cellular) localization of the (poly)peptides of the invention. Further binding targets/agents comprise non-natural binding targets like (a) specific immune protein(s) such as an antibody, or an SOUP1 (poly)peptide specific agent such as those identified in screening
25 assays as described below.

Specific screening assays are, inter alia, disclosed in US 5,854,003 or in US 5,639,858. Specific binding agents of the (poly)peptides of the invention may include SOUP1-specific receptors, such as those of the
30 family of heptahelical receptors. Other natural SOUP1 binding targets are readily identified by screening cells, membranes and cellular extracts and fractions with the disclosed materials and methods and by other methods

known in the art. For example, natural intracellular binding targets of the (poly)peptide of the invention may be identified with assays such as one-, two-, and three-hybrid screens. In addition, biochemical purification procedures, co-precipitation assays from cell extracts, „interaction-trap“
5 systems, expression cloning (e. g. in bacteria using lambda gt11 or in eukaryotic cell systems using plasmid expression vectors), phage display, and the like, may be utilised for identification of natural soup1 binding agents. Non-natural intracellular binding agents may be obtained in screens of chemical libraries such as described below, etc.

10

The invention provides efficient methods of identifying pharmacological agents, compounds or lead compounds for agents active at the level of SOUP1 modulatable cellular function. Generally, these screening methods involve assaying for compounds, which modulate interaction of the
15 (poly)peptides of the invention with a natural SOUP1 binding target. A wide variety of assays for binding agents are provided including labeled in vitro protein-protein binding assays, immunoassays, cell based assays, etc. The methods are amenable to automated, cost-effective high-throughput screening of chemical libraries for lead compounds and have immediate
20 application in a broad range of domestic and international pharmaceutical and biotechnology drug development programs. Identified reagents find use in the pharmaceutical industries for animal and human trials; for example, the reagents may be derivatised and rescreened in vitro and in vivo assays to optimise activity and minimise toxicity for pharmaceutical development.

25

In vitro binding assays employ a mixture of components including a (poly)peptide of the invention, which may be part of a fusion product with another peptide or (poly)peptide(s), e. g. a tag for detection or anchoring, etc. The (poly)peptides of the invention or fragment(s) thereof used in the
30 methods are usually added in an isolated, partially pure or pure form and are typically recombinantly produced. The assay mixture also comprises a candidate pharmacological agent at different concentrations. Candidate

agents encompass numerous chemical classes, though typically they are organic compounds; preferably small organic compounds. Small organic compounds have a molecular weight of more than 50 Da yet less than about 2,500 Da, preferably less than about 1,000 Da, more preferably, less than about 500 Da. Candidate agents comprise functional chemical groups necessary for structural interactions with proteins and/or DNA, and typically include at least an amine, carbonyl, hydroxyl or carboxyl group, preferably at least two of the functional chemical groups, more preferably at least three. The candidate agents often comprise cyclical carbon or heterocyclic structures and/or aromatic or polyaromatic structures substituted with one or more of the aforementioned functional groups. Candidate agents are also found among biomolecules including peptides, saccharides, fatty acids, steroids, purine, pyrimidines, derivatives, structural analogues or combinations thereof, and the like. Where the agent is or is encoded by a transfected nucleic acid, said nucleic acid is typically DNA or RNA.

Candidate agents are obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. For example, numerous means are available for random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant, and animal extracts are available or readily produced. Additionally, natural and synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical, and biochemical means. In addition, known pharmacological agents may be subject to directed or random chemical modifications, such as acylation, alkylation, esterification, amidification, etc., to produce structural analogues.

A variety of other reagents may also be included in the mixture. These include reagents required as biochemical energy sources, e. g. ATP or ATP analogues, nucleic acids, e. g. in nucleic acids binding assays, salts,

buffers, neutral proteins, e. g. albumin, detergents, etc., which may be used to facilitate optimal protein-protein and/or protein-nucleic acid binding and/or reduce non-specific or background interactions, etc. Also, reagents that otherwise improve the efficiency of the assay, such as protease inhibitors, nuclease inhibitors, antimicrobial agents, etc. may be used.

The resultant mixture is incubated under conditions whereby, but for the presence of the candidate pharmacological agent, the SOUP1 polypeptide specifically binds the cellular binding target, portion or analogue with a reference binding affinity. The mixture components can be added in any order that provides for the requisite binding and incubations may be performed at any temperature, which facilitates optimal binding. Incubation periods are likewise selected for optimal binding but also minimised to facilitate rapid, high-throughput screening. Generally a plurality of assay mixtures are run in parallel with different agent concentrations to obtain a differential response to the various concentrations. Typically, one of these concentrations serves as a negative control, i. e. at zero concentration or below the limits of assay detection.

After incubation, the agent-biased binding and/or affinity between the (poly)peptide of the invention and one or more binding targets is detected by any convenient way. For cell-free binding type assays, a separation step is often used to separate bound from unbound components. The separation step may be accomplished in a variety of ways. Conveniently, at least one of the components is immobilised on a solid substrate, which may be any solid from which the unbound components may be conveniently separated. The solid substrate may be made of a wide variety of materials and in a wide variety of shapes, e.g. microtiter plate, microbead, dipstick, resin particle, etc. The substrate is chosen to maximise the signal to noise ratios, primarily to minimise background binding, for ease of washing and cost.

Separation may be effected for example, by removing a bead or a dipstick from a reservoir, emptying or diluting a reservoir such as a microtiter plate well, rinsing a bead (e. g. beads with iron cores may be readily isolated and washed using magnets), particle, chromatographic column or filter with a wash solution or solvent. Typically, the separation step will include an extended rinse or wash or a plurality of rinses and washes. For example, where the solid substrate is a microtiter plate, the wells may be washed several times with a washing solution, which typically includes those components of the incubation mixture that do not participate in specific binding such as salts, buffer, detergent, non-specific protein, etc.

Alternatively, cell-free binding type assays may be performed in homogeneous formats that do not require a separation step, e.g. scintillation proximity assay (SPA), homogenous time-resolved fluorescence assay (HTRFA). Further methods which may be employed comprise fluorescence polarisation (FP) and fluorescence resonance energy transfer (FRET).

Detection may be effected in any convenient way. For cell based assays such as one, two, and three hybrid screens, the transcript resulting from SOUP1-target binding usually encodes a directly or indirectly detectable product (e.g. galactosidase activity, luciferase activity, etc.). For cell-free binding assays, one of the components usually comprises or is coupled to a label. A wide variety of labels may be employed-essentially any label that provides for detection of bound protein. The label may provide for direct detection as radioactivity, luminescence, polarisation of light, optical or electron density, etc. or indirect detection such as an epitope tag, an enzyme, etc. The label may be appended to the protein e. g. a phosphate group comprising a radioactive isotope of phosphorous, or incorporated into the protein structure, e. g. a methionine residue comprising a radioactive isotope of sulfur.

A variety of methods may be used to detect a specific label depending on the nature of the label and other assay components. For example, the label may be detected bound to a solid substrate or a portion of the bound complex containing the label may be separated from the solid substrate, and thereafter the label detected. Labels may be directly detected through optical or electron density, radiative emission, nonradiative energy transfer, emission of polarised light, etc., or indirectly detected with antibody conjugates, etc. For example, in the case of radioactive labels, emissions may be detected directly, e.g. with particle counters or indirectly, e.g. with scintillation cocktails and counters.

A difference in the binding affinity of the (poly)peptide of the invention to the target in the absence of the agent as compared with the binding affinity in the presence of the agent indicates that the agent modulates the binding of the SOUP1 polypeptide to the SOUP1 binding target. The difference, as used herein, is statistically significant and preferably represents at least a 50%, more preferably at least a 90% difference.

Analogously, in cell-based assays, a difference in SOUP1-dependent activity in the presence and absence of an agent indicates the agent modulates SOUP1 mediated cellular function or SOUP1 expression. Such cell-based approaches may involve transient or stable expression assays. In this method, cells are transfected with one or more constructs encoding in sum, a polypeptide comprising a portion of the (poly)peptide of the invention and a reporter under the transcriptional control of an soup1 responsive promotor. The cell may advantageously also be cotransfected with a construct encoding an SOUP1 activator, e. g. a receptor capable of stimulating SOUP1 activity, etc. Alternatively, the adipose promotor itself may be linked to a suitable reporter gene, e. g. luciferase, and used in cell-based assays to screen for compounds capable of modulating, via up- or down-regulation, adipose expression.

The methods described herein are particularly suited for automated high-throughput drug screening using robotic liquid dispensing workstations. Similar robotic automation is available for high-throughput cell plating and detection of various assay read-outs.

5
Candidate agents shown to modulate the expression of the nucleic acid molecules of the invention or association of (poly)peptides of the invention with a binding partner provide valuable reagents to the pharmaceutical industries for animal and human trials. Target therapeutic indications are
10 limited only in that the target soup1 cellular function (e. g. gene expression or association with a binding partner) be subject to modulation. In particular, candidate agents obtained from drug screening assays and the subject compositions, e.g. as soup1-derived nucleic acids or therapeutic polypeptides, provide therapeutic applications in diseases associated with
15 body-weight regulation and energy homeostatis, including treatment of obesity, disorders associated with wasting, such as cancer, infectious diseases and HIV infection, or bulimia. As will be discussed herein below, for therapeutic use, the compositions and agents may be administered by any convenient way, preferably parenterally, conveniently in a
20 physiologically acceptable carrier, e.g. phosphate buffered saline, saline, deionized water, or the like. Other additives may be included, such as stabilisers, bactericides, etc. Typically, the compositions are added to a retained physiological fluid such a blood or synovial fluid. Generally, the amount administered will be empirically determined, depending, for
25 example, upon the therapeutic objectives, the route of administration, and the condition of the patient. Typically, the clinician will administer a molecule of the present invention until a dosage is reached that provides the required biological effect. The progress of this therapy is easily monitored by conventional assays.

30
A method of refining the compound or agent identified by the method of the invention comprises

- (a) modeling said compound by peptidomimetics; and
- (b) chemically synthesizing the modeled compound.

Peptidomimetics is well known in the art and disclosed, inter alia, in
5 Beeley, Trends Biotech 12 (1994), 213-216, Wiley, Med. Res. Rev. 13
(1993), 327-384, Hruby, Biopolymers 43 (1997), 219-266, or references
cited therein or references cited herein above.

Methods of the generation and use of peptidomimetic combinatorial
10 libraries are described in the prior art, for example in Ostresh, Methods in
Enzymology 267 (1996), 220-234 and Dorner, Bioorg. Med. Chem. 4
(1996), 709-715. Methods for the chemical synthesis and/or the
preparation of chemical derivatives and analogues are well known to those
skilled in the art and are described in, for example, Beilstein, loc. cit. and
15 "Organic Synthesis", Wiley, New York, U.S.A., see supra.

It is envisaged in the present invention that the above mentioned
peptidomimetics methods and/or methods for chemical synthesis,
modification or for refining may also directly be employed on the
20 compounds of the invention, e.g. on the (poly)peptides or on the
fusionproteins of the invention.

The present invention relates to a method of producing a composition
comprising formulating the compound of the invention, the compound or
25 agents identified by the method(s) described herein or the compound
refined by the method(s) described herein above with a pharmaceutically
acceptable carrier and/or diluent.

Examples of suitable pharmaceutical carriers, excipients and/or diluents are
30 well known in the art and include phosphate buffered saline solutions,
water, emulsions, such as oil/water emulsions, various types of wetting
agents, sterile solutions etc. Compositions comprising such carriers can be

formulated by well known conventional methods. These pharmaceutical compositions can be administered to the subject at a suitable dose. Administration of the suitable compositions may be effected by different ways, e.g., by intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, intramuscular, 5 topical, intradermal, intranasal or intrabronchial administration. The dosage regimen will be determined by the attending physician and clinical factors. As is well known in the medical arts, dosages for any one patient depends upon many factors, including the patient's size, body surface area, age, the particular compound to be administered, sex, time and route of 10 administration, general health, and other drugs being administered concurrently. Proteinaceous pharmaceutically active matter may be present in amounts between 1 ng and 10 mg per dose; however, doses below or above this exemplary range are envisioned, especially considering the aforementioned factors. If the regimen is a continuous infusion, it should 15 also be in the range of 1 μ g to 10 mg units per kilogram of body weight per minute, respectively. Progress can be monitored by periodic assessment. The compositions of the invention may be administered locally or systemically. The compositions of the invention may also be administered directly to the target site, e.g., by biolistic delivery to an 20 internal or external target site or by catheter to a site in an artery. Preparations for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate. 25 Aqueous carriers include water, alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Parenteral vehicles include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's, or fixed oils. Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers, electrolyte replenishers (such as those based on 30 Ringer's dextrose), and the like. Preservatives and other additives may also be present such as, for example, antimicrobials, anti-oxidants, chelating agents, and inert gases and the like. Furthermore, the pharmaceutical

composition of the invention may comprise further agents depending on the intended use of the pharmaceutical composition.

5 Additionally, the present invention provides for a method of producing a composition comprising the compound(s) of the invention or the compound(s) or agent(s) identified by the method(s) of the invention comprising the steps of

- (a) modifying a compound of the invention, or a compound or agent identified by the method of the invention as a lead compound to achieve
- 10 (i) modified site of action, spectrum of activity, organ specificity, and/or
- (ii) improved potency, and/or
- (iii) decreased toxicity (improved therapeutic index), and/or
- 15 (iv) decreased side effects, and/or
- (v) modified onset of therapeutic action, duration of effect, and/or
- (vi) modified pharmacokinetic parameters (resorption, distribution, metabolism and excretion), and/or
- 20 (vii) modified physico-chemical parameters (solubility, hygroscopicity, color, taste, odor, stability, state), and/or
- (viii) improved general specificity, organ/tissue specificity, and/or
- (ix) optimized application form and route
- by
- 25 (i) esterification of carboxyl groups, or
- (ii) esterification of hydroxyl groups with carbon acids, or
- (iii) esterification of hydroxyl groups to, e.g. phosphates, pyrophosphates or sulfates or hemi succinates, or
- (iv) formation of pharmaceutically acceptable salts, or
- 30 (v) formation of pharmaceutically acceptable complexes, or
- (vi) synthesis of pharmacologically active polymers, or
- (vii) introduction of hydrophilic moieties, or

WO 02/42455

55

PCT/EP01/13663

- (viii) introduction/exchange of substituents on aromates or side chains, change of substituent pattern, or
- (ix) modification by introduction of isosteric or bioisosteric moieties, or
- 5 (x) synthesis of homologous compounds, or
- (xi) introduction of branched side chains, or
- (xii) conversion of alkyl substituents to cyclic analogues, or
- (xiii) derivatisation of hydroxyl group to ketales, acetals, or
- (xiv) N-acetylation to amides, phenylcarbamates, or
- 10 (xv) synthesis of Mannich bases, imines, or
- (xvi) transformation of ketones or aldehydes to Schiff's bases, oximes, acetals, ketals, enolesters, oxazolidines, thiozolidines
- or combinations thereof; and
- 15 (b) formulating the product of said modification with a pharmaceutically acceptable carrier.

Pharmaceutical acceptable carriers are well known in the art, as described herein above. It is envisaged that also the compounds of the invention, i.e.

20 the (poly)peptides or fusionproteins of the invention, the nucleic acid molecules of the invention be employed in the above described method for producing a composition. Preferably, said composition(s) is/are a pharmaceutical composition(s) as described herein.

25 Therefore, in a more preferred embodiment, the present invention relates to a method of producing a composition comprising the compound(s) of the invention or the compound(s) or agent(s) identified by the method(s) of the invention, wherein said composition is a pharmaceutical composition for preventing or treating obesity, adipositas, eating disorders, bulimia,

30 wasting and/or disorders leading to increased or decreased body weight/body mass as, inter alia, described herein below.

It is particularly preferred that the present invention relates to a method for producing a composition comprising the compound(s) of the invention or compound(s) or agent(s) identified by the method(s) of the invention, wherein said composition is a pharmaceutical composition for preventing, alleviating or treating obesity, adipositas, eating disorders (like bulimia nervosa, anorexia nervosa), wasting syndromes (like cachexia), mitochondrial disorders, pancreatic dysfunctions (like diabetes), the prevention of insulin resistance, disorders related to ROS production (like response to infections, cancer, aging).

10

In yet another embodiment, the present invention provides for a composition comprising

- (a) an inhibitor of the (poly)peptide of the invention or identified by the method or refined by the method of the invention;
- 15 (b) an inhibitor of the expression of the gene identified by the method described herein or the nucleic acid molecule of the invention; and/or
- (c) a compound identified by the method of the invention.

20 Said inhibitor of the (poly)peptide of the invention may be a compound which functions as inhibitor of the wildtype (poly)peptide of the invention, the SOUP1 protein. Said inhibitor may lead to induction of weight loss may influence regulatory cells (pancreatic beta-cells) and thereby improve beta-cell function or preventing insulin resistance, it may change ROS (reactive oxygen species) production leading to a decreased ROS concentration (causing reduced molecular damage in aging, cancerogenesis and increased ischemic tolerance). However opposite effects could occur due to tissue specific reactions and metabolic situation. Said inhibitor may also be an inhibitor specifically interacting with (a) mutated form(s) of the (poly)peptide of the invention and thereby lead to a decrease in body weight/body mass or to an maintainance of the current body weight/body mass.

30

It is to be understood that the term "inhibitor" of the (poly)peptide identified by the methods of the invention also relates to (an) inhibitor(s) which influence the activity and/or function of interacting (poly)peptides as identified by the method of the present invention. Said interaction may be direct or indirect. Said "inhibitor" may also interfere with and/or modify the interaction of the (poly)peptide of the invention with its binding targets/agents as defined herein. The above described applies mutatis mutandis for the term "inhibitor of the expression of the nucleic acid molecule of the invention or of the gene identified by the method(s) of the invention". Said inhibitor may interfere with transcriptional and/or translational processes.

Similarly, the present invention relates to a composition comprising

- (a) a stimulator of the (poly)peptide of the invention or of the (poly)peptide identified or refined by the method(s) described herein above;
- (b) a stimulator of the expression of the nucleic acid molecule of the invention or of the gene identified by the method(s) of the invention;
- (c) a compound identified by the method(s) of the invention; and/or
- (d) the vector of the invention.

The term "stimulation of the (poly)peptide" of the invention relates to a compound which functions as a stimulator (activator) of the (poly)peptides of the invention. Said stimulator/activator may lead to a induction of weight gain and may be useful for the treatment of wasting. It may also change the ROS production which may lead to increased efficacy in (a) immune response(s). Yet, opposite effects are also envisaged, due to tissue specific reactions and metabolic situations. The here described "stimulators" may, inter alia, lead to an increased interaction of the (poly)peptide of the invention with its binding target. The term also relates

to a stimulator/activator of the mutated form(s) of the (poly)peptides of the present invention. Said stimulator(s) of the mutated form(s) may lead to an increase in body weight/body mass or to an maintenance of the current body weight/body mass.

5

"Inhibitors" as well as "stimulators of the (poly)peptide of the invention" may be deduced and/or evaluated by methods known in the art and disclosed herein.

10 The term "stimulator of a (poly)peptide identified or refined by the method(s) of the present invention" relates also to a stimulator which influences the activity/function of (interacting) (poly)peptides as identified by the method of the present invention they may interact with said (poly)peptides in either direct or indirect fashion. As already mentioned for
15 the term "inhibitor" as defined herein above, the above said applies, mutatis mutandis, for the term "stimulator of the expression of the nucleic acid molecule of the invention or of the gene identified by the method(s) of the invention".

20 The above mentioned "inhibitors" and "stimulators" not only relate to (poly)peptides, but may also comprise small molecules which bind to, interfere with and/or interact with the (poly)peptides and/or nucleic acid molecules of the invention or with (poly)peptides and/or genes identified by the method(s) of the invention. Examples of such small molecules
25 comprise, but are not limited to small peptides, anorganic and/or organic substances or peptide-like molecules, like peptide-analogs comprising D-amino acids. Said "inhibitors" and "stimulators" may further comprise antibodies, derivatives and/or fragments thereof, aptamers or specific (oligo)nucleotides. The "inhibitors" and "stimulators" may also be part of
30 the pharmaceutical and/or diagnostic compositions as disclosed herein.

As pointed out herein above, said "inhibitors" or "stimulators" may also comprise small organic compounds as defined herein above.

In addition, the present invention relates to a composition comprising a
5 nucleic acid molecule of the invention, a (poly)peptide of the invention, a
fusionprotein of the invention, an antibody or (a) fragment(s) or
derivative(s) thereof or an aptamer of the invention or an anti-sense
oligonucleotide of the invention. Furthermore, said composition may
comprise (poly)peptides, nucleic acid molecules, genes and/or compounds
10 or agents as identified by the methods of the present invention.

In a preferred embodiment of the invention, said composition is a
pharmaceutical, e.g. therapeutic composition. Pharmaceutical compositions
comprising, optionally, pharmaceutically acceptable carriers have been
15 described herein above. The pharmaceutical compositions of the present
invention are particularly useful for the treatment and/or the prevention of
complex disorders of appetite regulation and/or energy metabolism.

It is particularly preferred that said pharmaceutical composition is employed
20 in treating and/or preventing obesity, adipositas, eating disorders, bulimia,
disorders of body weight/body mass. It is, however, also envisaged that
said pharmaceutical compositions be used in disorders like, inter alia,
wasting (cachexia), weight loss due to cancer or infectious diseases or
weight loss in immuno-compromised patients, like, HIV-patients.

25 It is furthermore envisaged that the pharmaceutical composition of the
invention may be used in combination with other agents employed in the
treatment of body weight/mass disorders. Said agents may comprise, but
are not limited to, agents reducing/enhancing food intake, agents
30 blocking/activating nutrient absorption, agents increasing/decreasing
thermogenesis, agents modulating fat and/or protein metabolism or
storage, agents modulating the central controller regulating body weight.

Said agents may, inter alia, comprise, agents like sibutramine, orlistat, ephedrine or caffeine, diethylpropione, phentermine, fluoxetine, sertraline, or phenylpropanolamine.

5 Furthermore, the present invention relates to a composition comprising a nucleic acid molecule of the invention, a (poly)peptide of the invention, a fusionprotein of the invention, an antibody, a derivative or fragment thereof, an aptamer of the invention at least a primer or a set of primers as defined herein or an anti-sense oligonucleotide of the invention. Particularly
10 preferred primers are primers as employed in the appended examples and/or depicted in SEQ ID NOs. 55 to 60.

It is, e.g., envisaged that primers deduced from the nucleic acid molecules of the invention are employed for diagnostic or scientific purposes. Said
15 primers may, inter alia, be employed to find and/or verify mutations of SOUP1 genes in individuals. Preferably, said individuals are humans. Furthermore, primers as deduced from the nucleic acid sequences disclosed herein, in particular from sequences as shown in SEQ ID NOs: 9, 11, 13 and 51 may be employed/used to detect and/or isolate homologous
20 sequences in further species.

In a particular preferred embodiment said composition is a diagnostic composition. Said diagnostic composition may comprise the components as defined herein above wherein said components are bound to/attached to
25 and/or linked to a solid support as defined herein above. It is furthermore envisaged, that said diagnostic composition comprises a compound(s) of this invention on (micro-)chips. Therefore, said diagnostic composition may, inter alia, comprise the nucleic acid molecules of the invention on so-called "gene chips" or the (poly)peptides of the invention on so-called
30 "protein-chips". Diagnostic gene chips may comprise a collection of the nucleic acid molecules of the invention that, e.g., specifically detect mutations in the SOUP1-gene of animals, in particular of humans. Said

diagnostic compositions and in particular the diagnostic gene chip as described herein above may be particularly useful for screening patients for (genetic) defects underlying, e.g. obesity, adipositas, disorders of body weight/body mass, or eating disorders.

5 It is preferred that said compounds of the present invention to be employed in a diagnostic composition are detectably labeled. A variety of techniques are available for labeling biomolecules, are well known to the person skilled in the art and are considered to be within the scope of the present invention. Such techniques are, e.g., described in Tijssen, "Practice and
10 theory of enzyme immuno assays", Burden, RH and von Knippenburg (Eds), Volume 15 (1985), "Basic methods in molecular biology"; Davis LG, Dibmer MD; Battey Elsevier (1990), Mayer et al., (Eds) "Immunochemical methods in cell and molecular biology" Academic Press, London (1987), or
15 in the series "Methods in Enzymology", Academic Press, Inc.

There are many different labels and methods of labeling known to those of ordinary skill in the art. Examples of the types of labels which can be used in the present invention include enzymes, radioisotopes, colloidal metals,
20 fluorescent compounds, chemiluminescent compounds, and bioluminescent compounds.

Furthermore, the present invention relates to the use of

- (a) an inhibitor of the (poly)peptide identified or refined by the
25 method of the invention;
 - (b) an inhibitor of the expression of the gene identified by the method of the invention; and/or
 - (c) a compound identified by the method of the invention;
- for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of
30 obesity, adipositas, eating disorders, wasting syndromes (e.g. cachexia), mitochondrial disorders, pancreatic dysfunctions, disorders related to ROS production.

Similarly, the present invention also provides for the use of

- (a) a stimulator of the (poly)peptide identified or refined by the method of the invention;
 - (b) a stimulator of the expression of the gene identified by the method of the invention; and/or
 - (c) a compound identified by the method of the invention;
- for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of obesity, adipositas, eating disorders, wasting syndromes (cachexia), mitochondrial disorders, pancreatic dysfunctions, disorders related to ROS production.

Furthermore, the present invention relates to the use of an agent as identified by the method of the invention for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment, alleviation and/or prevention of obesity, adipositas, eating disorders, wasting syndromes (cachexia, also in cancer, HIV-infections), mitochondrial disorders as described herein, pancreatic dysfunctions (like diabetes), disorders related to ROS production (like cancer, aging, infections).

In addition, the present invention relates to the use of a nucleic acid molecule as depicted in SEQ ID NOs: 3 or 4 (dUCP) or of (a) fragment(s) thereof for the preparation of a non-human animal which over- or underexpresses the gene product as encoded by SEQ ID NOs: 3 or 4 or (a) fragment(s) thereof. Said non-human animal is preferably a fruit fly. The use as described herein above is illustrated in the appended examples.

In a particular preferred embodiment, the present invention relates to the use of a fruit fly as defined in herein above for the detection of polypeptides capable of contributing to membrane stability and/or function in organelles, capable of modifying mitochondrial proteins, and/or capable of influencing cellular metabolism.

Furthermore, the invention provides for a kit comprising at least one of a nucleic acid molecule, a vector, a host, a polypeptide, a fusion protein, an antibody or a fragment or derivative thereof or an antiserum, an aptamer or another receptor and an anti-sense oligonucleotide of the invention.

5
Advantageously, the kit of the present invention further comprises, optionally (a) reaction buffer(s), storage solutions and/or remaining reagents or materials required for the conduct of scientific or diagnostic assays or the like. Furthermore, parts of the kit of the invention can be
10 packaged individually in vials or bottles or in combination in containers or multicontainer units.

The kit of the present invention may be advantageously used, inter alia, for carrying out the method of producing a (poly)peptide of the invention and
15 could be employed in a variety of applications referred herein, e.g., as diagnostic kits, as research tools or vaccination tools. Additionally, the kit of the invention may contain means for detection suitable for scientific medical and/or diagnostic purposes. The manufacture of the kits follows preferably standard procedures which are known to the person skilled in
20 the art.

The figures show:

Figure 1 shows the nucleotide and amino acid sequence of *Drosophila* UCPy. Shown are the full length cDNA (SEQ ID NO:3), the open reading
25 frame (SEQ ID NO:4), and the deduced amino acid sequence (SEQ ID NO:5).

Figure 2 shows the overexpression of *Drosophila* UCPy in the eye. In the
30 fly shown on the left part of the picture, the dUCPy expression is normal, and the eye is normally developed. In the fly shown on the right part of the picture, dUCPy was overexpressed, and the phenotype observed shows a

WO 02/42455

64

PCT/EP01/13663

reduction of the fly eye. If SOUP1 is co-expressed in this phenotype, the eye defect can be rescued. The eye of such rescue flies (not shown) is almost identical to the normal eye of the left fly.

- 5 Figure 3a. shows the cDNA of *Drosophila melanogaster* for Accession Number GH22139. Shown are the full length cDNA nt 1-2953 (SEQ ID NO:6), the open reading frame (SEQ ID NO:7), and the deduced amino acid sequence (SEQ ID NO:8).
- 10 Figure 3b. shows the cDNA of *Drosophila melanogaster* for the splice variant of Accession Number GH22139. Shown are the dSOUP-sp1 open reading frame (nt 688-1497 and 2482-2641 of SEQ ID NO:6), and the deduced amino acid sequence for the SOUP splice variant dSOUP-sp1.
- 15 Figure 3c. shows the gene prediction from the SOUP1 locus in public databases. Shown are the open reading frame of splice variant dSOUP-CG8026 (nt 688-1569, 2280-2320 and 2482-2641 of SEQ ID NO:6), and the deduced amino acid sequence for splice variant dSOUP-CG8026, as predicted from public databases.
- 20 Figure 4 shows the transmembrane domain plot of SOUP1 proteins. Figure 4a shows the transmembrane domain plot for *Drosophila* SOUP1, Figure 4b shows the transmembrane domain plot for human SOUP1-CG8026,
- 25 Figure 4c shows the transmembrane domain plot for human SOUP1, Figure 4d shows the transmembrane domain plot for mouse SOUP1, Figure 4e shows the transmembrane domain plot for zebrafish SOUP1.
- 30 Figure 5 shows the transmembrane domains of SOUP1 variants. Figure 5a shows the comparison of different *Drosophila* SOUP1 variants. The nucleotide numbering relates to the sequence in SEQ ID NO: 6. The

WO 02/42455

65

PCT/EP01/13663

transmembrane domains of splice variants dSOUP1 and dSOUP1-sp1 are different. Splice variant dSOUP1-CG8026 would generate a protein with seven transmembrane domains.

- 5 The transmembrane domains in dSOUP1, variant dSOUP1-spl, variant dSOUP1-CG8026, human SOUP1 (hSOUP1), and mouse (mSOUP1) are shown in figures 5b, 5c, 5d, 5e and 5f, respectively.

- 10 Figure 6. shows human SOUP1. Shown are the open reading frame (SEQ ID NO:9), and the deduced aminoacid sequence for human SOUP (SEQ ID NO:10).

- 15 Figure 7. shows mouse SOUP1. Shown are the open reading frame (SEQ ID NO:11), and the deduced aminoacid sequence for mouse SOUP (SEQ ID NO:12).

- 20 Figure 8. shows the alternative mouse gen 6i. Shown are the open reading frame (SEQ ID NO:13), and the deduced aminoacid sequence for mouse 6i (SEQ ID NO:14).

- Figure 9. shows Danio rerio SOUP1. Shown are the open reading frame (SEQ ID NO:51), and the deduced aminoacid sequence for mouse SOUP (SEQ ID NO:52).

- 25 Figure 10 shows the expression of UCP2 in a beta-actin-mSOUP-flg transgenic mouse model *in vivo*.

Figure 10 a shows the northern analysis,

Figure 10 b shows the quantification of the data shown in Figure 10 a.

- 30 Figure 11 shows the localization of SOUP1 in mitochondria of NIH 3T3 cells. NIH 3T3 cells were transiently transfected with an expression vector

WO 02/42455

66

PCT/EP01/13663

for mouse Soup, fixed und immunostained with an antisera against mouse Soup (see Example 13).

The examples illustrate the invention.

5

Example 1: Cloning of a *Drosophila melanogaster* gene with homology to human Uncoupling Proteins (UCPs)

10 A BLAST homology search was performed in a public database (NCBI/NIH) looking for *Drosophila* genes with sequence homology to the human UCP2 and UCP3 genes. The search yielded sequence fragments of a family of *Drosophila* genes with UCP homology. They are clearly different to the next related mitochondrial proteins (oxoglutarate carrier).

15 Using the sequence fragment of one of this genes (here called dUCPy) a PCR primer pair was generated (Upper 5'-CTAAACAAACAATTCCAAACATAG (SEQ ID NO: 1), Lower 5'-AAAAGACATAGAAAATACGATAGT (SEQ ID NO: 2)) and a PCR reaction performed on *Drosophila* cDNA using standard PCR conditions. The
20 amplification product was radioactively labelled and used to screen a cDNA library made from adult *Drosophila* flies (Stratagene). A full-length cDNA clone was isolated, sequenced (figure 1) and used for further experiments.

**Example 2: Cloning of the dUCPy cDNA into an *Drosophila* expression
25 vector**

In order to test the effects of dUCPy expression in *Drosophila* cells the dUCPy cDNA was cloned into the expression vector pUAST (Ref.: Brand A & Perrimon N, Development 1993, 118:401-415) using the restriction sites
30 NotI and KpnI. The resulting expression construct was injected into the germline of *Drosophila* embryos and *Drosophila* strains with a stable integration of the construct were generated. Since the expression vector

pUAST is activated by the yeast transcription factor Gal4 which is normally absent from *Drosophila* cells dUCPy is not yet expressed in these transgenic animals. If pUAST-dUCPy flies are crossed with a second *Drosophila* strain that expresses Gal4 in a tissue specific manner the offspring flies of this mating will express dUCPy in the Gal4 expressing tissue.

The cross of pUAST-dUCPy flies with a strain that expresses Gal4 in all cells of the body (under control of the actin promoter) showed no viable offspring. This means that dUCPy overexpression in all body cells is lethal. This finding is consistent with the assumption that dUCPy overexpression could lead to a collapse of the cellular energy production.

Expression of dUCPy in a non-vital organ like the eye (Gal4 under control of the eye-specific promoter of the "eyeless" gene) results in flies with visibly damaged eyes (figure 2). This easily visible eye phenotype is the basis of a genetic screen for gene products that can modify UCP activity.

Example 3: dUCPy modifier screen

Parts of the genomes of the strain with Gal4 expression in the eye and the strain carrying the pUAST-dUCPy construct were combined on one chromosome using genomic recombination. The resulting fly strain has eyes that are permanently damaged by dUCPy expression. Flies of this strain were crossed with flies of a large collection of mutagenized fly strains. In this mutant collection a special expression system (EP-element, Ref.: Rørth P, Proc Natl Acad Sci U S A 1996, 93(22):12418-22) is integrated randomly in different genomic loci. The yeast transcription factor Gal4 can bind to the EP-element and activate the transcription of endogenous genes close the integration site of the EP-element. The activation of the genes therefore occurs in the same cells (eye) that overexpress dUCPy. Since the mutant collection contains several thousand

strains with different integration sites of the EP-element it is possible to test a large number of genes whether their expression interacts with dUCPy activity. In case a gene acts as an enhancer of UCP activity the eye defect will be worsened; a suppressor will ameliorate the defect.

5

Using this screen a novel gene with suppressing activity was discovered that is here called Suppressor Of Uncoupling Protein (SOUP1). Expression of SOUP1 together with dUCPy in the Drosophila eye leads to a rescue of the dUCPy induced defect (figure 2).

10

Example 4: Cloning of SOUP1 from Drosophila (dSOUP1)

Genomic DNA neighbouring to the eye-defect rescuing EP-element was cloned and sequenced. This sequence was used for a BLAST search in a public Drosophila gene database. A short sequence fragment (EST) from cDNA clone GH22139 (Drosophila Genome Project) with identical sequence was discovered in the database search. This publicly available cDNA clone was ordered and then fully sequenced (figure 3a).

Example 5: Overexpression of GH22139 in the Drosophila eye

To ensure that GH22139 encodes for the genetically identified dUCPy suppressor SOUP1 the GH22139 cDNA was cloned into the expression vector pUAST (using restriction sites BglII and XhoI). By means of germ line injection transgenic animals were generated. pUAST-GH22139 transgenic flies were crossed with the flies expressing dUCPy in the eye. In the offspring of this cross (flies expressing dUCPy and GH22139) the eye defect was rescued. This proved that the GH22139 cDNA encodes for SOUP1.

30

Example 6: Sequence analysis of dSOUP1

The analysis of the deduced aminoacid sequence of the SOUP1 cDNA with bioinformatic tools (Ref.: J.Glasgow et al., Proc.Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology. 175-182, AAAI Press, 1998) showed that the SOUP1 protein has the characteristic pattern of a mitochondrial carrier protein with 6 transmembrane domains (figure 4a).

Example 7: Possible splice variants of dSOUP1 and comparison with a predicted gene in public databases

Sequence alignments, transmembrane-domain predictions and splice-predictions suggest that the Drosophila SOUP1 gene exists in different splice variants (Figure3b, c and Fig. 5a). The cDNA clone GH22139 can form two splice variants (dSOUP1 and dSOUP1-spl) with a different 6th TM-domain. Searching the fully sequenced Drosophila genome in public databases revealed a gene prediction (dSOUP1-CG8026, Ref. Adams, M.D. et al., 2000 Science 287:2185) that suggests a splice variant with 7 TM-domains. The homologies between the variant are:

amino acid homology in %	(identity/similarity)
dSOUP1 - dSOUP1-CG8026	(82/82)
dSOUP1spl - dSOUP1-CG8026	(89/89)
dSOUP1 - dSOUP1spl	(93/94)

The amino acids of the predicted TM-domains of the different splice variant an species are depicted in Fig. 5b to f).

Example 8: Cloning of SOUP1 homologues from human (hSOUP1), mouse (mSOUP1), and zebrafish (zSOUP1)

Using the complete cDNA sequence of *Drosophila* SOUP1 a BLAST search in a public database was performed. Several short, uncomplete sequence fragments from different species (zebra fish, chick, mouse, macaque, human) were found. Since none of the sequences in the database were complete the human sequence fragment was used to synthesize PCR-primers. The PCR amplification product was radioactively labeled and used as a probe to screen a human adipocyte cDNA library and a human hippocampus cDNA library. From both libraries cDNA clones could be isolated. The sequence of the human SOUP1 is shown in figure 6. It shows the characteristic 6 transmembrane domain pattern as well (figure 4c). The following PCR primers can be used to amplify the ORF of the human SOUP1 gene: Upper 5'-ATG GAC TAC GGG GAC TTT ATC AA (SEQ ID NO: 55), Lower 5'-ACC GAC GCC TTC TTT CCA ACT (SEQ ID NO: 56).

The identification of the mouse Soup1 gene was done in an equivalent approach. The sequence of mSOUP1 is shown in figure 7. It shows the characteristic 6 transmembrane domain pattern as well (figure 4d). The following PCR primers can be used to amplify the ORF of the mouse SOUP1 gene: Upper 5'-GGC GGC CAC TAC ATC ACG (SEQ ID NO: 57), Lower 5'-TGCCTCAAGAACATAGACTG (SEQ ID NO: 58).

During the isolation of mouse SOUP1 cDNA clones the clone 6i was isolated that has an alternative sequence. The sequence of the open reading frame is shown in figure 8. The deduced amino-acid sequence differs in three positions from the other mouse SOUP1 clone.

The identification of the zebrafish Soup1 gene was done in an equivalent approach. The sequence of zSOUP1 is shown in figure 9. It shows the characteristic 6 transmembrane domain pattern as well (figure 4e). The

following PCR primers can be used to amplify the ORF of the zebrafish SOUP1 gene: Upper 5'-ATGACCGCTACCATTTCCAGGCAGAGGCAC (SEQ ID NO: 59), Lower 5'-TTAGTGATACTCGCCCAAAGCAAGCGTGA (SEQ ID NO: 60).

5

Example 9: Generation of a flag-tagged *mSOUP* transgene

A carboxy-terminally flag-tagged *mSOUP* transgene (herein referred to as *mSOUPFlag*) was generated by performing RT-PCR on cDNA derived from mouse pancreas RNA using *mSOUP* gene specific primers (*mSOUP* forward primer: 5' GGCGGCCACTACATCAG3' (SEQ ID NO:63), flag-tagged *mSOUP* reverse primer: 5' CTACTTGTCATCATCGTCCTTGTAGTCGCTCACTTTCTTTCTCT 3' (SEQ ID NO:64)).

10

Example 10: Generation of beta-actin-*mSOUPFlag* transgenic mice

The *mSOUPFlag* (see Example 9) was expressed in mice under the control of the ubiquitous human beta-actin promoter using techniques known to those skilled in the art (for example, see, Gunnig et al. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84,4831-4835). A transgenic construct DNA was injected into C57/BL6 mouse embryos (Harlan Winkelmann, Borchon, Germany) using standard techniques (see, for example, Brinster et al. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82,4438-4442). Using this technique, eight independent mouse founderlines were generated.

15

Example 11: *mSOUP* expression analysis via TaqMan analysis

The expression of the *mSOUPFlag* transgene was monitored by TaqMan analysis. For this analysis, 1-100 ng, preferably 50ng cDNA derived from different mouse tissues (for example, colon, heart, liver, lung, stomach, intestine, white adipose tissue (WAT), thymus, spleen, muscle, kidney) and

20

25

30

a *mSOUP* specific primer/probe pair were used (*mSOUP* forward primer (SEQ ID NO: 65): 5'-CTCTGTCGCAGCGCTATCC-3', *mSOUP* reverse primer (SEQ ID NO: 66): 5'-GAAGGCGGGCTCTCACAAC-3', *mSOUP* probe (SEQ ID NO: 67): 5'-AATATTGCCGTAG CAGCAACATACCCGT-3').

5

TaqMan analysis was performed using standard techniques known to those skilled in the art.

10 In the eight independent mouse founder lines analysed, ectopic *mSOUP* expression using wild-type mice as a reference was detected in all tissues apart from brown adipose tissue (BAT). The two founder lines showing highest transgene expression levels were used for further analysis.

Example 12: *mUCP2* expression analysis via Northern blot analysis

15

To study the effect of ubiquitous, ectopic *mSOUPFlag* expression in a transgenic mouse model *in vivo*, *mUCP2* expression in actin-*mSOUPFlag* transgenic mice (and in control littermate) was monitored by Northern blot analysis using 20g total RNA and a 1.0kb *mUCP2* cDNA encompassing the complete UCP2 open reading frame as a probe. To ensure equal loading, the Northern blot was rehybridized with a 1.4kb *human-actin* cDNA as a probe. Northern blot analysis was performed using standard techniques (see, for example, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

20

25 Expression of mouse UCP2 was detected in all tissues tested (see FIGURE 10). Comparison of *mUCP2* expression levels in transgenic mice relative to control littermates revealed increased *mUCP2* expression in several different tissues analysed.

30

Quantification analysis using an Instant Imager and corresponding analysis software showed 1.5 - 4.1 fold increased *mUCP2* expression in lung, small

intestine, thymus, WAT, spleen and kidney of actin-*mSOUPIflag* transgenic mice relative to the wild-type control littermates (see FIGURE 10B)

Example 13: Fluorescence microscopy analysis of mouse Soup localisation in NIH3T3 cells.

NIH 3T3 cells were transiently transfected with an expression vector for mouse Soup, fixed und immunostained with an antisera against mouse Soup. The immunofluorescence was examined at 630x magnification and appropriate filters for the Cy3-labelled secondary antibody. It was shown that Soup is cleared localized in the mitochondria of NIH 3T3 cells (SEE FIGURE 11).

NIH3T3 cells were seeded into 24 wells plates containing Poly-D-Lysine coated coverslips (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) at 25.000 cells per well. The day after seeding, cells were transiently transfected with the Soup expression construct under the control of a CMV-Promoter with Lipofectamin Plus (InvitroGen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's instructions. 48 hours after transfection, cells were fixed in 4% para-formaldehyde and immunostained according to Dörner *et al.* (1998) J Biol Chem. 273: 20267-75). In brief, cells were permeabilized with 0.75% Triton X-100 for 10 minutes in PBS, endogenous autofluorescence blocked by treatment of the cells with 0.1 NaBH₄ in PBS for 10 minutes. After a short PBS wash, cell were incubated in blocking buffer (PBS, 0.5 % BSA, 5% goat serum, 0.045% fish gelatine) for 1 hour. Primary antisera (1:25, overnight) and secondary antibody (anti-rabbit-Cy3, 1:200, 1 hour) were applied in blocking buffer followed by washes in blocking buffer. The cover slips were mounted on glass slides and immunostained cells were examined in an fluorescence microscope with the appropriate filter set for Cy3.

Example 14: Anti mSOUP antibodies

Anti mouse SOUP antibodies were raised in rabbits by immunizing with the synthetic peptide SEQ ID NO:68: CYENVSHFLYDLREKKVS, corresponding
5 to the C-terminus of mouse SOUP protein (C- a.a. 300-316 from SEQ ID NO:14). The antibodies were affinity purified using a SULFO-Link column (Order No. Pierce 44895) carrying the synthetic peptide SEQ ID NO:68: (CYENVSHFLYDLREKKVS), according to the manufacturers' protocol.

WO 02/42455

75

PCT/EP01/13663

Claims

1. A nucleic acid molecule encoding a polypeptide contributing to membrane stability and/or function of organelles, wherein said nucleic acid molecule
- (a) hybridizes at 65°C in a solution containing 0.2 x SSC and 0.1% SDS to a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8, of SEQ ID NO: 54, of SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 and/or SEQ ID NO: 52 and/or the complementary strand thereof;
- (b) hybridizes at 65°C in a solution containing 0.2 x SSC and 0.1% SDS to a nucleic acid molecule as depicted in SEQ ID NO: 6, 7 or 53, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 and/or SEQ ID NO: 51 and/or the complementary strand thereof;
- (c) it is degenerate with respect to the nucleic acid molecule of (a) or (b);
- (d) encodes a polypeptide which comprises at least one, preferably at least two, more preferably at least three, more preferably at least four, more preferably at least five and most preferably six amino acid sequences as depicted in any one of SEQ ID NOs: 15 to 50, 61 and 62;
- (e) encodes a polypeptide which is at least 85%, preferably at least 90%, more preferably at least 95%, more preferably at least 98% and up to 99,6% identical to SEQ ID NO: 8;
- (f) encodes a polypeptide which is at least 90%, preferably at least 95%, more preferably at least 98% and up to 99,6% identical to SEQ ID NO: 54;
- (g) encodes a polypeptide which is at least 35%, preferably at least 50%, more preferably at least 60%, more preferably at least 70%, more preferably at least 80%, more preferably at least 90%, most preferably at least 95% and most preferably

- at least 99% identical to the amino acid sequence as depicted in any one of SEQ ID NOs: 10, 12, 14 or 52;
- (h) differs from the nucleic acid molecule of (a) to (g) by mutation and wherein said mutation causes an alteration, deletion, duplication or premature stop in the encoded polypeptide; or
- 5 (i) has the sequence as depicted in SEQ ID NOs: 9, 11, 13 or 51.
2. The nucleic acid molecule of claim 1 which is DNA.
- 10 3. The nucleic acid molecule of claim 1 or 2, wherein said polypeptide contributing to membrane stability and/or function in organelles is expressed in mitochondria and/or peroxisomes.
- 15 4. The nucleic acid molecules of claim 3, wherein said polypeptide participates in the maintenance of said membrane.
5. The nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 4, wherein said polypeptide contributing to membrane stability and/or function in
- 20 organelles is a transporter molecule and/or a regulator of a transporter molecule.
6. The nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 5, wherein said polypeptide is a modifying polypeptide.
- 25 7. The nucleic acid molecule of claim 6, wherein said modifying polypeptide is a modifier of mitochondrial proteins.
8. The nucleic acid molecule of claim 7, wherein said mitochondrial
- 30 protein is a member of the UCP family.

WO 02/42455

77

PCT/EP01/13663

9. The nucleic acid molecule of claim 8, wherein said member of the UCP family is UCP1, UCP2, UCP3, UCP4, UCP5, StUCP or AtUCP.
10. A vector comprising the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9.
11. A host cell or a non-human host organism transformed with the vector of claim 10.
12. A method for producing a polypeptide comprising culturing a host cell of claim 11 under suitable conditions and isolating the polypeptide produced.
13. A polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9 or produced by the method of claim 12.
14. A fusion protein comprising the polypeptide of claim 13 or (a) fragment(s) thereof.
15. The fusion protein of claim 14, wherein said (a) fragment(s) thereof comprise(s) at least one, preferably at least two, more preferably at least three, more preferably at least four, more preferably at least five and most preferably six amino acid sequences as depicted in any one of SEQ ID NOs: 15 to 50.
16. An antibody, fragment or derivative thereof or an aptamer or another receptor specifically recognizing the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9 or the polypeptide of claim 13 or the fusion protein of claims 14 or 15.

WO 02/42455

78

PCT/EP01/13663

17. An anti-sense oligonucleotide, hybridization probe or amplification primer of a nucleic acid molecule as defined in any one of claims 1 to 9.
- 5 18. A non-human animal expressing the polypeptide of claim 13 or the fusion protein of claim 14, transfected with the vector of claim 10, or comprising the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9.
- 10 19. A non-human animal, wherein the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9 or a homolog, paralog or ortholog thereof is silenced and/or mutated.
- 15 20. The non-human animal of claim 18 or 19 which is selected from the group consisting of mouse, rat, sheep, hamster, pig, dog, monkey, rabbit, calf, horse, nematodes, fly and fish.
- 20 21. Use of the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9, the vector of claim 10, the host of claim 11, the polypeptide of claim 13, the fusion protein of claim 14 or 15, the antibody, fragment or derivative thereof or an aptamer or another receptor of claim 16 or the anti-sense oligonucleotide, hybridization probe or amplification primer of claim 17 for monitoring and/or controlling the function of a gene and/or a gene product which is influenced and/or modified by a polypeptide as defined in any one of claims 1 to 9.
- 25 22. The use of claim 22, wherein said gene and/or gene product is a gene and/or gene product expressed in organelles.
- 30 23. The use of claim 22, wherein said organelle is a mitochondrion or a peroxisome.

24. The use of any one of claims 21 to 23, wherein said gene and/or gene product is a member of the UCP family.
25. A composition comprising the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9, the vector of claim 10, the host of claim 11, the polypeptide of claim 13, the fusion protein of claim 14 or 15, the antibody, fragment or derivative thereof or an aptamer or another receptor of claim 16 or the anti-sense oligonucleotide, hybridization probe or amplification primer of claim 17.
26. The composition of claim 25 which is a diagnostic composition.
27. The composition of claim 25 which is a pharmaceutical composition.
28. Use of the composition of claim 25 or claim 26 for detecting and/or verifying a disorder in cells, cell masses, organs and/or subjects.
29. Use of the composition of claim 25 or of claim 27 for the treatment, alleviation and/or prevention of a disorder in cells, cell masses, organs and/or subjects.
30. The use of claim 28 or 29, wherein said disorder is a metabolic disorder or a mitochondrial disorder.
31. The use of claim 30, wherein said metabolic disorder is selected from obesity, adipositas, eating disorders (bulimia nervosa, anorexia nervosa), cachexia (wasting), pancreatic dysfunction and/or a disorder related to ROS production.
32. Use of the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9, the vector of claim 10, the host of claim 11, the polypeptide of claim 13, the fusion protein of claim 14 or 15, the antibody, fragment or

derivative thereof or an aptamer or another receptor of claim 16 or the anti-sense oligonucleotide, hybridization probe or amplification primer of claim 17 for identifying substances capable of interacting with the polypeptide as defined in claim 13.

5

33. The use of claim 32, wherein said substance(s) capable of interacting with said polypeptide is/are (an) antagonist(s) or (an) agonist(s).

10

34. A method of identifying a polypeptide or (a) substance(s) involved in cellular metabolism in an animal or capable of modifying homeostasis comprising the steps of:

15

- (a) testing a collection of polypeptides or substances for interaction with the polypeptide of claim 13 or (a) fragment(s) thereof or the fusion protein of claim 14 or 15 or (a) fragment(s) thereof using a readout system; and
- (b) identifying polypeptides or substances which test positive for interaction in step (a).

20

35. A method of identifying a polypeptide or (a) substance(s) involved in cellular metabolism in an animal or capable of modifying homeostasis comprising the steps of

25

- (a) testing a collection of polypeptides or substances for interaction with the polypeptide identified by the method of claim 34; and
- (b) identifying polypeptides that test positive for interaction in step (a); and optionally
- (c) repeating steps (a) and (b) with the polypeptides identified one or more times wherein the newly identified polypeptide replaces the previously identified polypeptide as a bait for the identification of a further interacting polypeptide.

30

36. The method of claim 34 or 35 further comprising the step of identifying the nucleic acid molecule(s) encoding the one or more interacting (poly)peptides.
- 5 37. A method of identifying a polypeptide involved in the regulation of body weight in a mammal comprising the steps of
- (a) contacting a collection of (poly)peptides with the polypeptide of claim 13 or (a) fragment(s) thereof or the fusion protein of claim 14 or 15 or (a) fragment(s) thereof under conditions that allow binding of said (poly)peptides;
 - 10 (b) removing (poly)peptides from said collection of (poly)peptides that did not bind to said polypeptide of claim 13 or the fusion protein of claim 14 or 15 in step (a); and
 - (c) identifying (poly)peptides that bind to said polypeptide of claim 13 or the fusion protein of claim 14 or 15.
- 15 38. The method of claim 37 wherein said polypeptide of claim 13 or said fusion protein of claim 14 or 15 is fixed to a solid support.
- 20 39. The method of claim 38 wherein said solid support is a gel filtration or an affinity chromatography material.
40. The method of any one of claims 37 to 39 wherein, prior to said identification in step (c), said binding (poly)peptides are released.
- 25 41. The method of claim 40 wherein said release is effected by elution.
42. The method of any one of claims 37 to 41 further comprising the step of identifying the nucleic acid molecule(s) encoding the one or more binding (poly)peptides.
- 30

43. A method of identifying a compound influencing the expression of the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9 comprising the steps of
- 5 (a) contacting a host carrying an expression vector comprising the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9 or the nucleic acid molecule identified by the method of claim 36 or 42 operatively linked to a readout system with a compound or a collection of compounds;
- 10 (b) assaying whether said contacting results in a change of signal intensity provided by said readout system; and, optionally,
- (c) identifying a compound within said collection of compounds that induces a change of signal in step (b);
- wherein said change in signal intensity correlates with a change of expression of said nucleic acid molecule.
- 15 44. A method of identifying a compound influencing the activity of a polypeptide of claim 13 comprising the steps of
- (a) contacting a host carrying an expression vector comprising the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9
- 20 operatively linked to a readout system and/or carrying a (poly)peptide of the invention linked to a readout system with a compound or a collection of compounds;
- (b) assaying whether said contacting results in a change of signal intensity provided by said readout system; and, optionally
- 25 (c) identifying a compound within said collection of compounds that induces a change of signal in step (b);
- wherein said change in signal correlates with a change in activity of said (poly)peptide.
- 30 45. The method of claim 43 or 44 wherein said host is a eukaryotic host cell.

WO 02/42455

83

PCT/EP01/13663

46. The method of claim 45 wherein said eukaryotic host cell is a mammalian host cell.
47. The method of claim 43 or 44 wherein said host is a bacterium or a yeast.
48. The method of any one of claims 43 to 47 wherein said change in signal intensity is an increase in signal intensity.
49. The method of any one of claims 43 to 47 wherein said change in signal intensity is a decrease in signal intensity.
50. A method of assessing the impact of the expression of one or more polypeptides of claim 13 or of one or more fusion proteins of claim 14 or 15 in an animal comprising the steps of
- (a) overexpressing the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9 or the nucleic acid molecule identified by the method of claim 36 or 42 in said animal; and
 - (b) determining whether the weight of said animal has increased, decreased, whether metabolic changes are induced and/or whether the eating behaviour is modified.
51. A method of assessing the impact of the expression of one or more polypeptides of claim 13 or of one or more fusion proteins of claim 14 or 15 in an animal comprising the steps of
- (a) underexpressing the nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9 or the nucleic acid molecule identified by the method of claim 36 or 42 in said animal; and
 - (b) determining whether the weight of said animal has increased, decreased, whether metabolic changes are induced and/or whether the eating behaviour is modified.

52. A method of screening for an agent which modulates the interaction of a polypeptide of claims 13 with a binding target/agent, comprising the steps of
- (a) incubating a mixture comprising
 - (aa) a polypeptide of claim 13, or a fragment thereof or a fusion protein of claim 14 or 15 or a fragment thereof;
 - (ab) a binding target/agent of said (poly)peptide or fusion protein or fragment thereof; and
 - (ac) a candidate agent
 - (b) detecting the binding affinity of said (poly)peptide, fusion protein or fragment thereof to said binding target to determine an (candidate) agent-biased affinity; and
 - (c) determining a difference between (candidate) agent-biased affinity and the reference affinity.
53. A method of refining the compound identified by the method of any one of claims 43 to 49 or the agent identified by the method of claim 52 comprising
- (a) modeling said compound by peptidomimetics; and
 - (b) chemically synthesizing the modeled compound.
54. A method of producing a composition comprising formulating the compound identified by the method of any one of claims 43 to 49 or the agent identified by the method of claim 52 or the compound refined by the method of claim 53 with a pharmaceutically acceptable carrier and/or diluent.

55. A method of producing a composition comprising the compound identified by the method of any one of claims 43 to 49 or the agent identified by the method of claim 52 comprising the steps of

(a) modifying a compound identified by the method of any one of claims 43 to 49 or the agent of claim 52 as a head compound to achieve

(i) modified site of action, spectrum of activity, organ specificity, and/or

(ii) improved potency, and/or

(iii) decreased toxicity (improved therapeutic index), and/or

(iv) decreased side effects, and/or

(v) modified onset of therapeutic action, duration of effect, and/or

(vi) modified pharmacokinetic parameters (resorption, distribution, metabolism and excretion), and/or

(vii) modified physico-chemical parameters (solubility, hygroscopicity, color, taste, odor, stability, state), and/or

(viii) improved general specificity, organ/tissue specificity, and/or

(ix) optimized application form and route

by

(i) esterification of carboxyl groups, or

(ii) esterification of hydroxyl groups with carbon acids, or

(iii) esterification of hydroxyl groups to, e.g. phosphates, pyrophosphates or sulfates or hemi succinates, or

(iv) formation of pharmaceutically acceptable salts, or

(v) formation of pharmaceutically acceptable complexes, or

(vi) synthesis of pharmacologically active polymers, or

(vii) introduction of hydrophilic moieties, or

- (viii) introduction/exchange of substituents on aromates or side chains, change of substituent pattern, or
- (ix) modification by introduction of isosteric or bioisosteric moieties, or
- 5 (x) synthesis of homologous compounds, or
- (xi) introduction of branched side chains, or
- (xii) conversion of alkyl substituents to cyclic analogues, or
- (xiii) derivatisation of hydroxyl group to ketals, acetals, or
- (xiv) N-acetylation to amides, phenylcarbamates, or
- 10 (xv) synthesis of Mannich bases, imines, or
- (xvi) transformation of ketones or aldehydes to Schiff's bases, oximes, acetals, ketals, enolesters, oxazolidines, thiazolidines
- or combinations thereof; and
- 15 (b) formulating the product of said modification with a pharmaceutically acceptable carrier.
56. The method of claim 54 or 55 wherein said composition is a pharmaceutical composition.
- 20 57. The method of claim 56, wherein said composition is a pharmaceutical composition for preventing, alleviating or treating obesity, adipositas, eating disorders, wasting syndromes (cachexia), mitochondrial disorders, pancreatic dysfunctions, disorders related to
- 25 ROS production.
58. A composition comprising
- (a) an inhibitor of the (poly)peptide of claim 13 or identified by the method of any one of claims 34, 35 or 37 to 41 or refined by the method of claim 53;
- 30 (b) an inhibitor of the expression of the gene identified by the method of claim 36 or 42; and/or

(c) a compound identified by the method of claim 43 or 44.

59. A composition comprising

- 5 (a) a stimulator of the (poly)peptide of claim 13 or identified by the method of any one of claims 34, 35 or 37 to 41 or refined by the method of claim 53;
- (b) a stimulator of the expression of the gene identified by the method of claim 36 or 42; and/or
- 10 (c) a compound identified by the method of claim 43 or 44.

60. The composition of claim 58 or 59 which is a pharmaceutical composition.

61. Use of

- 15 (a) an inhibitor of the (poly)peptide identified by the method of any one of claims 34, 35, 37 to 41 or 43 to 49 or refined by the method of claim 53;
- (b) an inhibitor of the expression of the gene identified by the method of claim 36 or 42; and/or
- 20 (c) a compound identified by the method of claim 49;
- for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of obesity, adipositas, eating disorders, wasting syndromes (cachexia), mitochondrial disorders, pancreatic dysfunctions, disorders related to ROS production.

25 62. Use of

- (a) a stimulator of the (poly)peptide identified by the method of any one of claims 34, 35, 37 to 41 or 43 to 49 or refined by the method of claim 53;
- 30 (b) a stimulator of the expression of the gene identified by the method of claim 36 or 42; and/or
- (c) a compound identified by the method of claim 48;

for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of obesity, adipositas, eating disorders, wasting syndromes (cachexia), mitochondrial disorders, pancreatic dysfunctions, disorders related to ROS production.

5

63. Use of an agent as identified by the method of claim 52 for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment, alleviation and/or prevention of obesity, adipositas, eating disorders, wasting syndromes (cachexia), mitochondrial disorders, pancreatic dysfunctions, disorders related to ROS production.

10

64. Use of a nucleic acid molecule as depicted in SEQ ID NOs: 3 or 4 or of (a) fragment(s) thereof for the preparation of a non-human animal which over- or underexpresses the gene product as encoded by SEQ ID NOs: 3 or 4 or (a) fragment(s) thereof.

15

65. The use of claim 64, wherein said non-human animal is a fruit fly or a mouse.

20

66. Use of a non-human animal as defined in claim 64, e.g. a fruit fly or a mouse as defined in claim 65 for the detection of polypeptides capable of contributing to membrane stability and/or function in organelles, capable of modifying mitochondrial proteins, and/or capable of influencing cellular metabolism.

25

67. Kit comprising at least one of
(a) a nucleic acid molecule of any one of claims 1 to 9;
(b) a vector of claim 10;
(c) a host of claim 11;
(d) a polypeptide of claim 13;
(e) a fusion protein of claim 14 or 15;

30

- (f) an antibody or a fragment or derivative thereof or an antiserum, an aptamer or another receptor of claim 16; and
- (g) an anti-sense oligonucleotide, hybridization probe or amplification primer of claim 17.

WO 02/42455

1/21

PCT/EP01/13663

Figure 1
Drosophila UCPy

full length cDNA (SEQ ID No. 3)

```
CGAGNAAAGTGTACTATCTAAACACATTTCAAACAATCTTAAACAAACAAATCCAAACATACAATCCCACTTACCACCTTA
CCGACCAAAATTACGAGTTTACAAATGGACAAAGCTGAACCGGACTACTGGCATCTTCGATCCTTGGAAATCGAAGAGGAGC
CGCGATTTCCGCCCAACAACGTGGCTGATCCACATACCGCAAGATCTGTTCCAGCTTTCCTGATCAACACCTTCATGATGGA
GCCAATCTGGCCGAGTCCGTGTGTTTCCCATTSAGCTGGCCCAAGACCCGAGTGCAGGTAGATGGCGAGCAGGCCAAGAA
GACGGGTAAAGCGATGCCAACTTTCCGTTGCACTCTTACCAACATGATCCGAGTGGAGGGATTCAAGTGGCTCTACCCCG
GCTTCTCGGCAATGTGACCCGAAACTTTATCTTCAACTCGTTACGTGTGTCTCTACGACGTTTTCGGCGGCCCTTTT
CTCTACCAgAAGCAACGAGACGAGGAAGTGCTCAAGATCTACATGGCGCTGGGATGCAGCTTCAACCGCAGGCTGCATGTC
CCAGGCACCTGGCCAAATCCCTTTTGACATCGTCAAGGTGCGAATGCGAGaCGGAAGaCGCCGCCAGCTGGGCTATGATG
TGCGGGTgAACAGCATGGTGCAGGCCCTTGGTGGACATCTACCGCCGTGGCGGAGTGGCCAGTATGTGgAAGGGTGTAGGG
CCAGCTGCATGCGTGTGCTGCTGATGACGACCGGCGATGTGGGAGTACgATATCAGTAAAGCGACCTTCAAGCGCCT
GCTGGACTTGGAGAGGCTGCGCACTGGCTTCTGTCTTCCATGtGGCCGGACTACAGCGATCCGTGCTCAGCACGC
CGCGaACGTGtCAAGTCCCGGATGATGAaCCAGCCGTGgAOCGAGAGCGCGCAAGAAATCTGTACTACAAGAACTCCCTC
GacTGCATTAGGAAGCTGGTCAAGGAGGAGGGTGTCTACGCTGATATAGGGGCTCATGCCCACTTGGTTTTCCGCTGGG
ACCGTCTCTAGTGTCTTTTGGCTGTCCGTGAGCAGCTGCTCAGTGGaAAGGCCAGAGTGGATTTAGGAGCAAACTTA
TCAATCTTACTATCGTATTTTGTATGCTCTTTAAACACGCAATAAAAGGGTGCAAGTCAAAACATCTATATATATTA
TAAATATaCTTTAAATCCCAAAAAAAAAAAAAAACTCGTCCGAAATTCGAT
```

open reading frame (SEQ ID No. 4)

```
ATGGACAAAGCTGAACCGGACTACTGGCATCTTCGATCCTTGGAAATCGAAGAGGAGCCCGGATTTCCGCCAAACAAAGCT
CGTGTACTCACTAAACCGACGCAATCTGTTCCAGCTCTACGTCAACACCTTCATTGGAGCCAATCTGGCCGAGTGTGTG
TTTTCCCATTTGGAGCTGGCCAAAGACCCGGATGCAAGTATGGCGAGCAGGCCAAGAAGACGGGTAAAGCGATGCCAACT
TTCCGTGCAACTCTTACCAACATGATCCGAGTGGAGGATTCAAGTGGCTCTACGCCGGCTTCTCGGCAATGTGACCGG
AAACTTTATCTTCAACTCGTACGTGTGTCTCTACGAGCTTTTCGGCGCCCTTTCTCTACCAgAACGAAACGGAACG
AGGAAGTCTCAAGATCTACATGGCGCTGGAGTCAAGTTCACCGAGCGCTGCAATCCCAAGCACTGtCAATCCCTT
GACATcGTCAAGTGTGgAATGCGAGaCGGAAGaCGCCGCCAGCTGGGCTATGATGTGGCGGTgAACAGCTGTGCA
GGCCTTCTGTGgACATCTACCGCCGTGGCGGACCTGCCAGTATGTGgAAGGGTGTAGGGCCAGCTGCATGCGTGCCTGCC
TgATGACGACCGCGCATGTGGGcAGTTCgATATACAGTAAGCGCACCTTCAAGCGCCTGcTGGACTTGGAGGAGGCGCTG
CCACTGCGTCTGtGTCTCTCCATGtGGCGCGGACTAAGGCGATCCGTGCTCAGCACCGCGCGaACGTGtCAAGTGTGCG
GATGATGAaCCAGCGCGTGAaCGAGAGCGCGCAAGATcTGTACTACAGAACTCCCTCGaCTGCATTAGGAAGCTGTGCA
GGGAGGAGGGTGTCTCACGTGTGATAAGGCCCTCATGCCAActTGGTGTGGCTGGGACGGTCTCAGTGTCTTTTGG
CTGTCGCTCGACGAGCTGGTCAAGTGAaAGGCCAGAGTGGATTTTAA
```

deduced aminoacid sequence (SEQ ID No. 5)

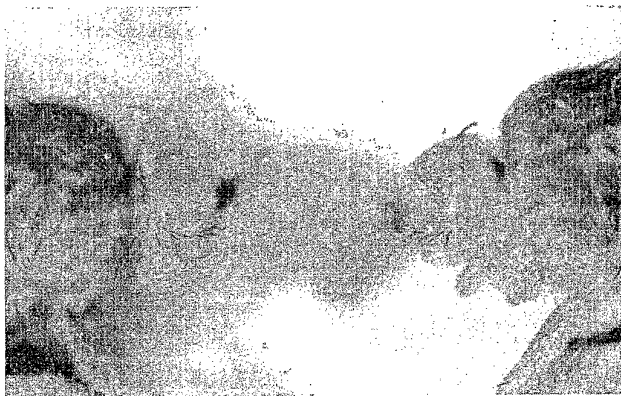
```
MDKAERDIYHLRLSEIEEPFRFPPTNVADPLTARNLFQLYVNTFIGANLAESCFFLDVAKTRMQVDGEQAKTGRKAMPT
FRATLTNMI RVEGPKSLYAGFSAMVTRNFI FNSLRVLVLYDVFRFPFLYQNERNEEVLKIYMALGCSFTAGCIAQALANPF
DIVKVRMTSGRRRLGYDVRVNSMVQAFVDIYRRGLPSMWGVGVPSCMRACLMTGDNVGSYDISKRTFKRLDLEBGL
PLRFVBSKCASTPVSLSPTANVIKSRQNMQFVNRSGKNLYIKNSLDCIRKLVREBQVILNKGMLPTWRLGPFPSVLFW
LSVREQLRQWKGSGSF
```

WO 02/42455

2/21

PCT/EP01/13663

Figure 2

Overexpression of *Drosophila* UCPy in the Eye

Overexpression of the *Drosophila* UCP-homologue dUCPy in the eye. In the left fly without dUCPy-overexpression the eye is normally developed, in the right fly with dUCPy-overexpression the eye is clearly reduced. Co-expression of *SOUP1* rescues the eye defect. The eye of such rescue flies is almost identical to the normal eye of the left fly.

PCT/EP01/13663

Drosophila melanogaster cDNA (GH22139)

full length cDNA (SEQ ID No. 6)

[illegible]

open reading frame (SEQ ID No. 7)

[illegible]

deduced aminoacid sequence (SEQ ID No. 8)

MNPIKAQSTGSPKKFNVAHVKYELHVAAGVSGGVSTLHLPLDLIKIRFAVNDGRATVTPYQRLGSSAFTTIRQEGFRGLY
 KGVTPNVWSSGSSWGLYFMFYNTIKTFIQGGNTMPLGPTMMMAAESGILTLTNPIWVKTRLCIQDAASSAEYRGM
 HALGQIKYEBGRGLRFGVPGMLGSHGAIQFMTEYELKNAENYRKLPLDTKLATTEYLAFAPAVSKLAAATPYQVVR
 LRLDGHVHGRGTCNCKOTWYRERBGRGQVQVTPYVWPTENKYNVRLWJLWETSLS

WO 02/42455

4/21

PCT/EP01/13663

Figure 3b

Drosophila melanogaster cDNA splice variant

dsOUPI-spl open reading frame

```
ATGAATCCGATCAAGGCACAGTCAACGGGCACTCCCAAGAAATCAACGTATTGCGACACGTCAGTACGAGCATTTGGTTGC
CGGAGTATCCGGCGGAGTGGTGTCCACACTCATTTCTACATCCCTTGGATTGATCAAGATTGGATTGCGAGTTAACGATGGCC
GGACAGCTACCGTGGCCGCAATACCGGGGACTGAGCAGCGCTTACACGATTTTCCGGCAAGAGGGCTTCCGGGACTCTAC
AAGGGCTCACCCTCAAGTCTGGGGATCGGGCTCCTCTGGGGCTGFMCTTCATGTTTACAGACCATTAAGACATTTAT
CCAGGAGGAACACAGACCATGCTCCCATGGGCTCCACAAATGAACATGCTTGCAGCTGCTGAGTCGGGATTTCTACCTGCTGC
TGACCAACCCCATCTGGTGGTGAAGACGCTCTCTGCTGCACTGCGATGCCGAGTAGTGGCGAGTACAGGGGCAATGATC
CACGCTTGGCCGAGATATACAGGAGGAGGGAATCCGTGGCTGTACCGCGGCTTTGTTCCTCCGGCATGTTGGGGCTCTCCCA
CGGACCATTCAGTTTCATGACCTACGAGGAGGCTGAAGACGCTTACAGGAATATCGCAAACTGCCCATCGACACGAGCTGG
CCACACAGTACTTGGCTTCCGGCTGTCTCCAGCTGATCGCAGCGGGCCACCTACCCGTTACAGGTGGTCCGGGCA
CGGCTGCAAGACCAACATCACCGATACACGACCTGGGACTGCATCAACAGACTTGGAGGTTTGGAGGCTACAGAGGCTT
CTACAAGGGGCTGAAGGCGAGTTTAACCCGAGTAGTGCCTGCTGCATGGTCACTTTCTGGTGTACGAGACGTCGCGATT
TCTGCTGCGCGAGCGGAAGCGAATTGAGACTAAGAGGATGCGTGGAGGTGTGA
```

dsOUPI-spl deduced aminoacid sequence

```
MNPIKAQSTGSPKPKFNVFAHVKYELVAGVSGVSTLLHPLDLIKIRFVNDGRTATVPQYRGLSSAFTTIFRQEGFRGLY
KGVTPNVWGSWSWLYFMFYNTIKTFIQGGNTIMPLGPTMMMLAAESGILTLNTPNIWVKTRLCQCDAAASSAEYRGM
HALGQIYKEGIRGLYRGFVPMGLVSHGAIQPMYEEUKNATNEYKLPIDTKLATTEYLAFVSKLIAAAATYFYQVVRA
RLQDHHRYNTWDCKIKQTRFEGYRGFYKGLKASLTVRVFACMTFLVYENVSHFLARRRRIETKEDADV.
```

WO 02/42455

5/21

PCT/EP01/13663

Figure 3c

Gene prediction from the SOUP1 locus in public database

dSOUP1-CG8026 open reading frame

```
ATGAATCCGATCAAGGCACAGTCAACGGGACGTCCCAAGAAATCAACGTATTGCGACACAGTCAAGTACGAGCATTGGTTGC
CGGAGTATCCGGGCGAGTGGTGTCCACACTCATTTTACATCCCTGGATTGTATCAAGATTCGATTCCGAGTTAACGATGGCC
GGACAGCTACGGTGGCGCATATCCGGGGACTGAGCAGCGCTTACACGATTTTCCGGCAAGAGGGCTTCCGGGACTCTTAC
AAAGGGCTCACCCTCAATGTCTGGGGATCGGGCTCCTCTTGGGGCTGTACTTCATGTTCTACAACACCATTAAGACATTTAT
CCAAGGAGGAAACACGACCATTGGCCATGGGGCCCAATGAACATGCTTGCAGCTGCTGAGTCCGGGAATCTCACCCCTGCTGC
TGACCAACCCCATCTGGGTGGTGAAGACGGCTCTCTGCTGCACTGGATGCCGGAGTAGTCCGAGTACAGGGGCATGATC
CAGCCTTGGGGCAGATATACAGGAGGAGGGAATCCGTGGCTGTACCGGGCTTTGTTCCGGCATGTTGGGGTCTTCCCA
CGGAGCCATCCAGTTTCATGACCTACGAGGAGCTGAGAGACCCCTACACGATATTCGCAAACTCCCATCGACAGAGCTGG
CCACACCCAGTACTTGGCTTCCGGCTGTCTCAGAGTGAATCCAGCGCGGCCCTTACCCGTACCGAGTGGTCCGGACA
CGGCTGCGAGGACACCATCACCGATACACGCGCACCTGGGACTGCATCAACAGACTTGGAGGTACGAGGCGATGGAGGTTT
CTATAAGGGCTGGTGCCTACCTGGTCCACCTCACGCCCAACATCTGCATGCTGCTTTTTCATTTTCCAAAGGGCTCAT
GGCAGCTTGAGTTTGGGGCTTACAGAGGCTTCTACAGGGGCTGAAGCGAGTTTAACCGAGTAGTGCTGCTGCTGCTGCTG
ACCTTTCTGCTGACGAGAACGTCTCGCATTTCTGCTCGCCAGGCGGAAGCGAATTGAGACTAAAGAGGATGCTCGGACGT
GTGA
```

dSOUP1-CG8026 deduced amino acid sequence

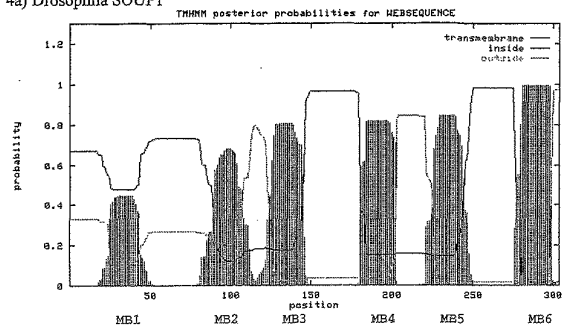
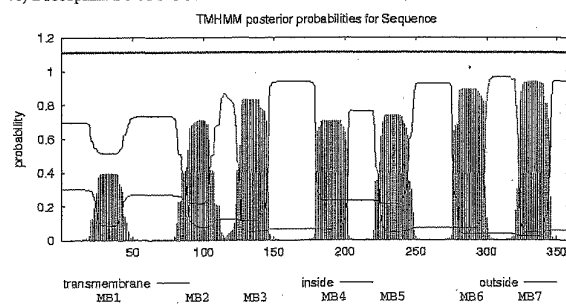
```
MNPDKAQSTGSPKKFNVFAHVKEHLVAGVSGGVSTLILHFLDLIKIRFAVNDGRATVPQYRGLSSAFTTIFRQEGFRGLY
KGVTFNVWSGSSWGLYFMFYNTIKFTIQGGNTMPLGPTMMLAAAESGILLTLTNPIWVVKRLCLQCDAASSAEVRGMI
HALGQIYKEEGIRGLYRGFVFGMLGVSHGAIQFMTYEELKNAYNEYKLPIDTKLATTEYLAFVAVSKLIAAAATYFYQVVRA
RLQDHHRRYNGTWDCIQQTWRYERMRGFEYGLVPLVHVTFNICMPASFHLSKGSWQLEFEGYRGFYKGLKASLIRVVVPCMV
TFLVYENVSHFLIARRRRIETKEDASDV.
```

WO 02/42455

6/21

PCT/EP01/13663

Figure 4
Transmembrane domain plot of SOUP1 proteins. Calculated following: J.Glasgow et al., Proc.Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology. 175-182, AAAI Press, 1998

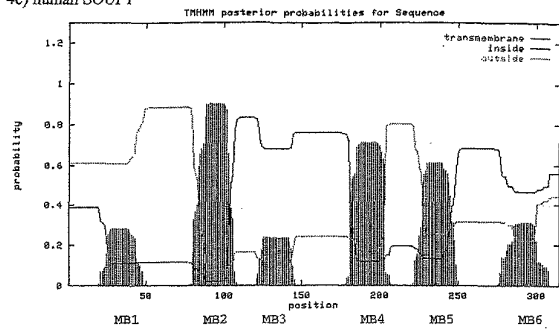
4a) *Drosophila* SOUP14b) *Drosophila* SOUP1-CG8026

WO 02/42455

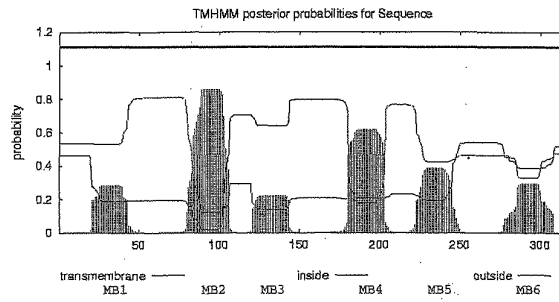
7/21

PCT/EP01/13663

4c) human SOUP1



4d) mouse SOUP1

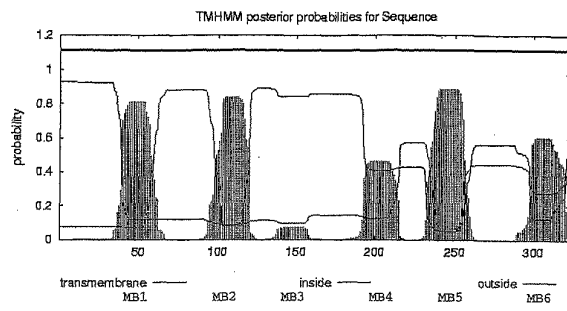


WO 02/42455

8/21

PCT/EP01/13663

4e) zebrafish SOUP1

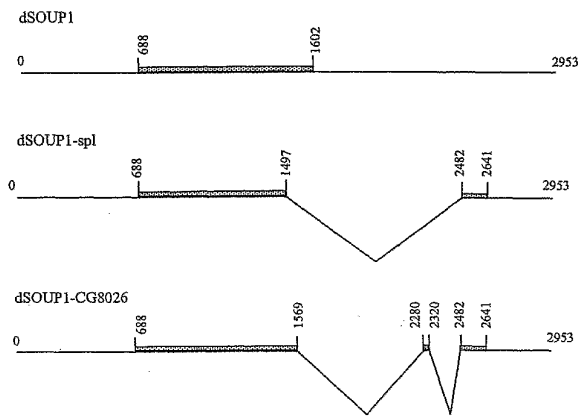


WO 02/42455

9/21

PCT/EP01/13663

Figure 5a

Comparison of different *Drosophila* SOUP1 variantsSplice variants of dSOUP

Splice of dSOUP1. The nucleotide numbering relates to the sequence in SEQ ID No 6. In splice variant dSOUP1 and dSOUP1-spl the 6th Transmembrane-domain is different. Splice variant dSOUP1-CG8026 would generate a protein with 7 transmembrane-domains.

WO 02/42455

10/21

PCT/EP01/13663

Figure 5b

Transmembrane domains in dSOUP1

MB-1 in dSOUP

Minimal	26-41	LVAGVSGGVVSTLILH
Maximal	21-48	VKYEHLVAGVSGGVVSTLILHPLDLIKI

MB-2 in dSOUP

Minimal	85-107	GVTPNVWGS GSSWGLYFMFYNTI
Maximal	81-111	GLYKGVTPNVWGS GSSWGLYFMFYNTIKTFI

MB-3 in dSOUP

Minimal	124-146	MNMLAAESGILTLLL TNPIWVV
Maximal	121-147	GPTMNMLAAESGILTLLL TNPIWVVK

MB-4 in dSOUP

Minimal	180-202	GLYRGFVPGMLGVSHGAIQFMTY
Maximal	179-203	RGLYRGFVPGMLGVSHGAIQFMTYE

MB-5 in dSOUP

Minimal	225-245	EYLAFAAVSKLIAAAATYPYQ
Maximal	221-248	LATTEYLAFAAVSKLIAAAATYPYQVVR

MB-6 in dSOUP

Minimal	277-298	FYKGLVPYLVHVTPNICMVMLI
Maximal	276-299	GFYKGLVPYLVHVTPNICMVMLIW

WO 02/42455

11/21

PCT/EP01/13663

Figure 5c

Transmembrane domains in dSOUP1-spl

MB-1 in dSOUP-spl		
Minimal	26-41	LVAGVSGGVVSTLILH
Maximal	21-48	VKYEHLVAGVSGGVVSTLILHPLDLIKI
MB-2 in dSOUP-spl		
Minimal	85-107	GVTPNVWGS GSSWGLYFMFYNTI
Maximal	81-111	GLYKGVTPNVWGS GSSWGLYFMFYNTIKTFI
MB-3 in dSOUP-spl		
Minimal	124-146	MNMLAAESGIL TLLTNPIWVV
Maximal	121-147	GPTMNMLAAESGIL TLLTNPIWVVK
MB-4 in dSOUP-spl		
Minimal	180-202	GLYRGFVPGMLGVSHGAIQFMTY
Maximal	179-203	RGLYRGFVPGMLGVSHGAIQFMTYE
MB-5 in dSOUP-spl		
Minimal	225-245	EYLAFAAVSKLIAAAATYPYQ
Maximal	221-248	LATTEYLAFAAVSKLIAAAATYPYQVVR
MB-6 in dSOUP-spl		
Minimal	277-298	FYKGLKASLTRVVPACMVTFVLV
Maximal	276-299	GFYKGLKASLTRVVPACMVTFLVY

WO 02/42455

12/21

PCT/EP01/13663

Figure 5d

Transmembrane domains in dSOUP1-CG8026

MB-1 in CG8026

Minimal	26-41	LVAGVSGGVVSTLILH
Maximal	21-48	VKYEHLVAGVSGGVVSTLILHPLDLIKI

MB-2 in CG8026

Minimal	85-107	GVTPTNVWGSWGLYFMFYNTI
Maximal	81-111	GLYKGVTPNVWGSWGLYFMFYNTIKTFI

MB-3 in CG8026

Minimal	124-146	MNMLAAESGILTLLLTNPIWVV
Maximal	121-147	GPTMNMLAAESGILTLLLTNPIWVVK

MB-4 in CG8026

Minimal	180-202	GLYRGFVPGMLGVSHGAIQFMTY
Maximal	179-203	RGLYRGFVPGMLGVSHGAIQFMTYE

MB-5 in CG8026

Minimal	225-245	EYLAFAAVSKLIAAAATYPYQ
Maximal	221-248	LATTEYLAFAAVSKLIAAAATYPYQVVR

MB-6 in CG8026

Minimal	277-299	FYKGLVPYLVHVTPNICMPASFH
Maximal	276-300	GFYKGLVPYLVHVTPNICMPASFHL

MB-7 in CG8026

Minimal	323-345	LTRVVPACMVTFLVYENVSHFL
Maximal	321-346	ASLTRVVPACMVTFLVYENVSHFLA

WO 02/42455

13/21

PCT/EP01/13663

Figure 5e

Transmembrane domains in hSOUP1

MB-1		
Minimal	26-41	LIAGVSGGVLSNLALH
Maximal	23-48	YENLIAGVSGGVLSNLALHPLDLVKI
MB-2		
Minimal	81-104	LYQGVTPNIWGAGLSWGLYFFFYN
Maximal	80-106	GLYQGVTPNIWGAGLSWGLYFFFYNAI
MB-3		
Minimal	123-143	YLVSAAEAGAMTLCITNPLWV
Maximal	122-144	EYLVSAAEAGAMTLCITNPLWVT
MB-4		
Minimal	181-203	GLYKGFVPGLFGTSHGALQFMAY
Maximal	180-206	RGLYKGFVPGLFGTSHGALQFMAYELL
MB-5		
Minimal	225-246	VEYISVAALSKIFAVAATYPYQ
Maximal	221-249	QLSTVEYISVAALSKIFAVAATYPYQVVR
MB-6		
Minimal	281-299	GIAPNLRVTPACCITFVV
Maximal	277-303	GFYKGIAPNLRVTPACCITFVYENV

WO 02/42455

14/21

PCT/EP01/13663

Figure 5f

Transmembrane domains in mSOUP1

MB-1		
Minimal	26-41	LVAGVSGGVLSNLALH
Maximal	23-48	YENLVAGVSGGVLSNLALHPLDLVKI
MB-2		
Minimal	81-104	LYQGVTPNVWGAGLSWGLYFFFYN
Maximal	80-106	GLYQGVTPNVWGAGLSWGLYFFFYNAI
MB-3		
Minimal	123-143	YLVSAAEAGAMTLCITNPLWV
Maximal	122-144	EYLVSAAEAGAMTLCITNPLWVT
MB-4		
Minimal	181-203	GLYKGFVPGLFGTSHGALQFMAY
Maximal	180-206	RGLYKGFVPGLFGTSHGALQFMAYELL
MB-5		
Minimal	225-246	AEYISVAALSKIFAVAATYPYQ
Maximal	221-249	QLSTA EYISVAALSKIFAVAATYPYQVVR
MB-6		
Minimal	281-299	GIAPNLIRVTPACCITFVV
Maximal	277-303	GFYKGIAPNLIRVTPACCITFVVYENV

WO 02/42455

15/21

PCT/EP01/13663

Figure 6

human SOUP1

open reading frame (SEQ ID No. 9)

```
ATGACGGGCGCAGGCCAGTCGGCGTCGGGTCGTCGGCGTGGAGCACGGGTATTCGGCCACGTCGGGTATGAGAACC
TGATAGCGGGCGGTGAGCGGCGGCGTCTTATCCAACCTTGGGCTGCATCCGCTCGACCTCGTGAAGATCCGCTTCGC
CGTGAGTGATGGATTGGAACTGAGACCGAAATATAATGGAATTTACATTTGCTTGACTACCATTTGGAAGCTTGAT
GGACTACGGGGACTTTATCAAGGAGTAACCCCAATATATGGGGTGCAGGTTTATCCTGGGGACTCTACTTTTCT
TTTACATGCCATCAAGTCATATAAAACAGAAAGAGAGCTGAACGTTTGAAGGCAACAGAATACCTTGTCTCAGC
TGCTGAAGCTGGAGCCATGACCCCTCGCAATACAAACCTTATGGTAAAGAACTCGCTTAAAGTTACAGTAT
GATGCTGTGTGTAACCTCCACACCCCAATPAAAGGAATGTTGATACCTTGTGAAAGAAATATAGTAGAG
GTTGCTGCGATTTATATAAGGGATTGTTCTCGGGCTGTTTGGAAACATCGCAGGTGCCCTTCAAGTTATGGCATA
TGAAATGCTGAAGTTGAAGTACAACCAAGCATATCATAGATTACAGAAAGCCAGTTGAGCACAGTAGAATATATA
TCTGTTGCGAGCACTATCCAAATATTTGCTGTCCGAGCAACATACCAATATCAAGTCTGAAGAGCTCGTCTTCAGG
ATCAACACATGTTTACAGTGTGTAAATAGATGTATACAAAGACATGGAGGAAGAGGCGTGGTGGATTTTA
CAGGGGAATTGCTCTAATTTGATTAGAGTGACTCCAGCCCTGCTGTATTACCTTTGTGTATATGAAACGTTCTCA
CATTTTTTACTTGACCTTAGAGAAAAGAGAAAGTAA
```

deduced aminoacid sequence (SEQ ID No. 10)

```
MTGQGSASGSSAWSTVFRHRYENLIAGVSGVLNLAHLPLDLVIRFAVSDGLELRPKYNGILHCLTTWKLD
GLRGLYQVTFNINWAGLSWGLYFFFTNAIKSYETEGRAERLEATEYLVSAAEAGAMTLCITNPLWVTRRLMLQY
DAVVNSPHRQYKGFDFLWLYKYEGVRLYKGFVPLFGTSHGALQFHAIELLLKINQHINLPEQLSTVEYI
SVRLSKIFAVAAATFIQVVRARLQDQEMFISGVLDVITKWRLEGVGFYKGIAPNLIRVTPACCITFVVYENVS
HFLDLREKRY.
```

WO 02/42455

16/21

PCT/EP01/13663

Figure 7

Mouse SOUP1

open reading frame (SEQ ID NO 11)

```
ATGACAGGCGCAGGGCCAGTCGGCTGCCGGGTCGGCGGCGTGGAGCGTGGTGTTCGCCACGTCGCGGTACGAGAACCTGGT
GGCTGGCGTGAAGTGCGGGGCTCTTGTCCAACCTGGCGCTGCACCCGCTCGACCTCGTGAAGATCCGCTTGGCTGTGAGTG
ATGGACTGGAGTAAGACCAAAATATAAAGGAATTTTGCAATTGCTTGGCTACCATTTGGAAAGTTGATGGACTACGAGGA
CTTTATCAAGGAGTAACCCCGAATGTGTGGGTGCCGGTTTATCTCGGAGCTCTACTTTTCTTTTACAATGCCATCAA
ATCGTATAAGACAGAGGAGAGCTGAACAGTTAGAGCCATTAGAGTACCTCTCTCAGCTCTGAGCTGGAGCCATGA
CTCTGTGCATTACAAACCCATTATGGGTGACGAAACTGCCCTTATGTTCAGATATGGTGTGTGCTAGGCCCTCAGCAG
AGACAGTATAAAGGAATGTTTGATGCCACTTGTGAATAATATAAATATGAAGTGTGCTGGTGGATTATACAAGGGATTTGT
CCCTGGGCTGTTTTGAACATCAGATGTGGCCCTTCAGTTTATGGCATATGAGTTGCTAAAGTGAAGTACAAACAAACACA
TCAATAGATTACCGGAACCCAGCTGAGTACAGCAGAAATACATCTCTGTGCGAGCGCTATCCAAAATATTTGCCGTAGCA
GCAACATACCCGTATCAGGTGTGTGAGAGCCCGCTTCAGGATCAGCATGTGTCTTATGGTGGTGTATACAGATGTGATCAC
AAAGACGTGGAGGAAGGAAGGCATCGGTGGATTTTACAAGGAATGCCCCCAATCTGATTAGAGTGACTCCAGGCTGCT
GCATCACCTTTGTGGTTTATGAATAATGTCCTCACTTTTATATGACCTTAGAGAAAAGAAAGTGGGCTAA
```

deduced aminoacid sequence (SEQ ID NO 12)

```
MTGQGGSAAGSAASVVFRHRYENLVAGVSGVLSNLAHPLDLVIRFAVSDGLEVRPKYEGILHCLATIMKVDGLRG
LYQGVTPNVWAGLSWGLYFFFNALIKSYETBGRABQLEPLEYLVSAAEAGAMTLCITNPLWVTKRLMLQYGGVAFSPQ
RQYKGMFDALVKIYKYGVRGLYKGFVPLFGTSHGALQPMAYELLALKYKHINKLPEAQLSTAEYISVAALSKIFAVA
ATYFPQVVRARLQDQHSVSGGVTDVITKTWREGIGGFYKGIAPHLIRVTFACCITFVVYENVSHFLYDLREKVG.
```

WO 02/42455

17/21

PCT/EP01/13663

Figure 8

Alternative mouse gene 6i

open reading frame (SEQ ID 13)

```
ATGACAGGCCAGGGCCAGTCGCGCTGCGGGTCCGGCGCGCTGGAGCGCGGTTCCGCCAGGTCGGGTACGAGAACCTGGT
GGCTGGCGTGAAGTGGCGGGGCTCTTGCCAACTGGCGCTGCACCGCGCTCGACCTCGTGAAGATCCGCTTCGCTGTGAGTG
ATGGACTGGAGTAAGACCAAATATATAAGGAATTTGCAATGCTTGGCTACCAATTTGGAAGTTGATGGAATACGAGGA
CTTTATCAAGAGTAACCCGAAATGTGTGGGTGCGGGTTATCTTGGGGACTCTACTTTTCTTTTACAAATGCCATCAA
ATCGTATAAGACAGAGGGAAGAGCTGAACAGTTAGAGCCATTAGAGTACCTCGTCTCAGCTGCTGAAGCTGAGCCATGA
CTCTGTGCATTACAAACCCATTATGGGTGACGAAAACCTGCGCTTATGTTPACAATATGGTGGTGTGCTAGCCCTTCACAG
AGACAGTATAAAGGAATGTTTGAATGCACTTTGTGAATATATATAATATGAAGGTGTGCGTGGATTATACAAAGGATTGT
CCCTGGGCTCTTTTGAACATCACATGGTCCCTTCAGTTTATGGCATATGAGTTTCTTAAAGTTGAGTACACAAACACA
TCATATGATACCCGAAAGCCAGCTGAGTACAGCAATACATCTCTGTCCAGGCTATCCAAATATTTGCGTAGCA
GCACATATACCCGTATCAGGTTGTGAGAGCCCGCTTCAGGATCAGCATGTCTTATGTTGGTGTAAACAGATGTGATCAC
AAAAGCTGGAGAAAGAGGCTCGGTGGATTTTACAAAGGAATGCCCCCAATCTGATTAGGGTACCTCCAGCTCGT
GCATCACCTTTTGTGTTTATGAAAATGTCTCTCACTTTTATATAGACCTTAGAGAAAAGAAAGTGAGCTAA
```

deduced aminoacid protein (SEQ ID 14)

```
MTGQGSAAAGSAWVAVFRHVVYENLVAGVSGVLSNLALHFLDLVKIRFAVSDGLEVRPKYKGLHCLATIMKYDGLRG
LYQGVTPNVWAGLSWGLYFFFYNAIKSYKTEGRABQLEPLEYLVSAARAGAMTLCITNPLMVTREIMLQYGVASPSQ
RQYKGMFDALVNIYKYGVRGLYKGFVPLPOTSHGALQFMAYELLKLYNKHINRLPEAQLSTABYISVAALSKIFAFA
ATYTPYQVVRARLQDQHVSYGGVTDVITKTKWKEGIGGFYKGLAFNLIRVTPACCTTFVYENVSHFLYDLREKVS.
```

WO 02/42455

18/21

PCT/EP01/13663

Figure 9

Danio rerio SOUP1

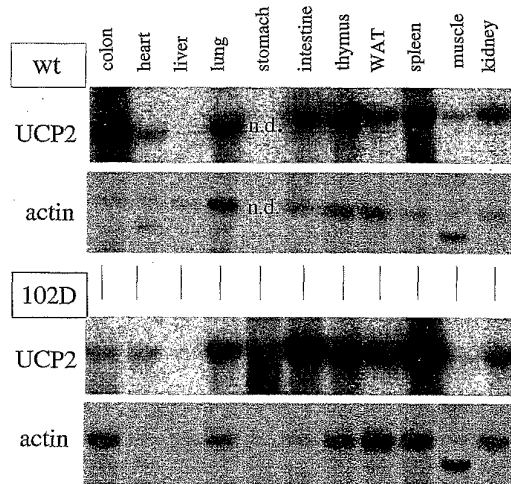
open reading frame (SEQ ID 51)

```
ATGACCGCTACCAATTCCAGGCAGAGGCACGCCGAGTCGCTGCAGACTCTTCTGGCTCTTTTCCATTACAGCAA
ACCTCCTGCAACTTTCAAACACATCAAAATATGAGATCTTGACGCCGGCTCGCTGGTGGTGTATTCCACAATGGT
GCTACATCCATTGGATTGATCAAAATCAGGTTTGGCAGTAAGTGATGGTCTGAAAATGAGGCCCAATACGATGGCATG
TTAGACTGCATGAAGACCATCTGGAAGCTGGAAGGCATTAGAGGATCTCTATCAGGAGTGAAGCCCAACATCTGGGGGG
CCGGATCATCATGAGGCTCTCTACTTCCATTTTATAATGCTATTAAAGCATACACACAGGAGGACCGCAACAGAGCT
GAGTGCATGTGAACACCTGGTGTCCGACGCGAGGCAGGCATCTTGACGCTTTGGCTCACCATTCCAGTCTGGGTGACA
AAGACCCCGCTGCTGCTGCAGTACAATGCAGACCTTTCACGGAAGCAGTACAGGGAATGATGAGCCCTCGGTGAAA
TATACCTGCACGAGGGTATCCAGGACTATACAGGGGTTTGTGCTGGCTGGCTGGGACTTCCCATGCTGCACATGCA
GTTCATGACCTATGAGGGCTTAAAGAGAGACAGAACAAATGCAAGAGATGCCCTCGAATCCCTGCTGTCCCATTG
GATACATCGCCATAGCAGCCATATCCAAATATTCGCTGTACAGTAAACATACCCCTATCAGGTGGTCCGGCTCGCC
TGACAGACCAACACAACTACAGTGAATAGTGGATGTCTATGAGAGGACCTGGAGCAACGAGGGGTGGAGGGCTT
TTACAAAGGGATGGTCCAAACCTGGTCCGAGTCATTCCTGCTGCTGCACTCTCTGCTGTTTGAATAATGTGCA
CGCTTGCTTTTGGGCGAGTACTACTAA
```

deduced aminoacid sequence (SEQ ID 52)

```
MTATISRQRHAAVAADSSGSSFSITANLLQLSKHIKENLAAGLAGGVISTMVLHPLDLIKIRFAVSDGLKMRPQYDGM
LDCMKTIWKLGGIRGLYQGVTPNIWAGSSWGLYFLFYNAIKATYGGHQTELSACEHLVSAAEAILLTLCLTNFVWVT
KTRLVLYQYNADFSRKQYKGMMDALVKIYRHEGLPGLTRGFVPLVGTSHAALLQPMYTBGLKREQNKCKKMPSESLSPL
ETIAIAALSKIFAVAVYYFYQVVRARLQDQRHMYSGIVDVNRRTWSHEGVGGFYKGMVNLVRVIPACCTIFLVFENV
RULLGETH.
```

Figure 10A

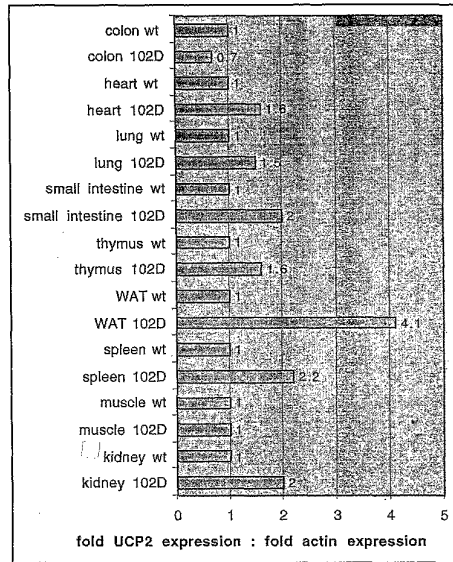


WO 02/42455

20/21

PCT/EP01/13663

Figure 10B



WO 02/42455

21/21

PCT/EP01/13663

Figure 11



WO 02/42455

1/30

PCT/EP01/13663

SEQUENCE LISTING

<110> DeveloGen AG
 <120> Modifier of organelle metabolism
 <130> 26407PWO
 <140>
 <141>
 <150> 00 125 693.2
 <151> 2000-11-23
 <160> 68
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA
 <400> 1
 ctaaacaaac aattccaaac atag 24
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA
 <400> 2
 aaaagacata gaaaatacga tagt 24
 <210> 3
 <211> 1248
 <212> DNA
 <213> Drosophila melanogaster
 <400> 3
 aagtgttact atctaaacac atttcaaaca attottaaca aacaattoca aacatacaat 60
 tccacttacc acttaccgac caaattacga gtttacaatg gacaaagctg aacgcgacta 120
 ctggcatctt cgatccttgg aaatogaaga ggagccgcga ttccgcgcaa caaacgtcgc 180
 tgatccacta accgcacgca atctgttcca gctctacgtc aacaccttca ttggagccaa 240
 tctggccgag tctgtgtgtt tccatttga cgtggccaag acccggtatg aggtagatgg 300
 cgagcaggcc aagaagacgg gtaaacgat gccaaacttc cgtgcaactc ttaccaacat 360
 gatccagatg gagggattca agtcgtctta cgcgggttc tggcaatgg tgaccgaaa 420
 ctttatcttc aactcgttac gtgtgtgtot ctacgaactt ttccggcgcc cttttctcta 480
 ccagaacgea cggaacgagg aagtgtctaa gatctacatg gcgctgggat gcagcttcac 540
 cgcaggtctg attgccagg cactggccaa tccctttgac atcgtcaagg tgcgaatgca 600
 gacggaagga cgcgcgcgcc agctgggcta tgatgtgcgg gtgaacagca tgggtcaggc 660
 ctctgtggac atctaccgcc gtggcggaact gccagtatg tggagggtg tagggccagc 720
 ctgcgtcgtt gcctgcctga tgacgaccgg cgaatgtggc agttaagata tcagtaagcg 780
 cacttcaag cgcctgctgg acttgagga aggcctgcca ctgcgtttcg tgtcttccat 840
 gtgcgcgga ctaacggcat ccgtgctcag cagccggcg aacgtgatca agtcgcggat 900

WO 02/42455

2/30

PCT/EP01/13663

gatgaaccag ccggtgaacg agagcggcaa gaatctgtac tacaagaact cctcgcactg 960
 cattaggaag ctggtcaggg aggagggtgt cctcacgttg tataagggcc tcatgcccac 1020
 ttggtttcgc ctgggaccgt tctcagtgct cttttggctg tccgtcgagc agctgcgtca 1080
 gtggaaggcc cagagtggtat tttaggagca aactatcaat cttactatcg tattttgtat 1140
 gtccttttaac acgcaataaa aagggtgcaa gtcaaaccaat ctattataca tattataaat 1200
 ataactttaa tcccaaaaaa aaaaaaaaaa actcgtgccg aattcgat 1248

<210> 4
 <211> 1008
 <212> DNA
 <213> Drosophila melanogaster

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1005)

<400> 4
 atg gac aaa gct gaa cgc gac tac tgg cat ctt cga tcc ttg gaa atc 48
 Met Asp Lys Ala Glu Arg Asp Tyr Trp His Leu Arg Ser Leu Glu Ile
 1 5 10 15
 gaa gag gag ccg cga ttt ccg cca aca aac gtc gct gat cca cta acc 96
 Glu Glu Glu Pro Arg Phe Pro Pro Thr Asn Val Ala Asp Pro Leu Thr
 20 25 30
 gca cgc aat ctg ttc cag ctc tac gtc aac acc ttc att gga gcc aat 144
 Ala Arg Asn Leu Phe Gln Leu Tyr Val Asn Thr Phe Ile Gly Ala Asn
 35 40 45
 ctg gcc gag tcg tgt gtt ttc cca ttg gac gtg gcc aag acc cgg atg 192
 Leu Ala Glu Ser Cys Val Phe Pro Leu Asp Val Ala Lys Thr Arg Met
 50 55 60
 cag gta gat gcc gag cag gcc aag aag acg ggt aaa gcc atg cca act 240
 Gln Val Asp Gly Glu Gln Ala Lys Lys Thr Gly Lys Ala Met Pro Thr
 65 70 75
 ttc cgt gca act ctt acc aac atg atc cga gtg gag gga ttc aag tcg 288
 Phe Arg Ala Thr Leu Thr Asn Met Ile Arg Val Glu Gly Phe Lys Ser
 85 90 95
 ctc tac gcc gcc ttc tcg gca atg gtg acc cga aac ttt atc ttc aac 336
 Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Ala Met Val Thr Arg Asn Phe Ile Phe Asn
 100 105 110
 tcg tta cgt gtt gtt ctc tac gac gtt ttc cgg cgc cct ttt ctc tac 384
 Ser Leu Arg Val Val Leu Tyr Asp Val Phe Arg Arg Pro Phe Leu Tyr
 115 120 125
 cag aac gaa cgg aac gag gaa gtg ctc aag atc tac atg gcg ctg gga 432
 Gln Asn Glu Arg Asn Glu Glu Val Leu Lys Ile Tyr Met Ala Leu Gly
 130 135 140
 tgc agc ttc acc gca gcc tgc att gcc cag gca ctg gcc aat ccc ttt 480
 Cys Ser Phe Thr Ala Gly Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Asn Pro Phe
 145 150 155 160
 gac atc gtc aag gtg cga atg cag acg gaa gga cgc cgc cgc cag ctg 528
 Asp Ile Val Lys Val Arg Met Gln Thr Glu Gly Arg Arg Gln Leu
 165 170 175
 gcc tat gat gtg cgg gtg aac agc atg gtg cag gcc ttc gtg gac atc 576

WO 02/42455 3/30 PCT/EP01/13663

Gly Tyr Asp Val Arg Val Asn Ser Met Val Gln Ala Phe Val Asp Ile
180 185 190

tac cgc cgt ggc gga ctg ccc agt atg tgg aag ggt gta ggg ccc agc 624
Tyr Arg Arg Gly Gly Leu Pro Ser Met Trp Lys Gly Val Gly Pro Ser
195 200 205

tgc atg cgt gcc tgc ctg atg acg acc ggc gat gtg ggc agt tac gat 672
Cys Met Arg Ala Cys Leu Met Thr Thr Gly Asp Val Gly Ser Tyr Asp
210 215 220

atc agt aag cgc acc ttc aag cgc ctg ctg gac ttg gag gaa ggc ctg 720
Ile Ser Lys Arg Thr Phe Lys Arg Leu Leu Asp Leu Glu Glu Gly Leu
225 230 235 240

cca ctg cgt ttc gtg tct tcc atg tgc gcc gga cta acg gca tcc gtg 768
Pro Leu Arg Phe Val Ser Ser Met Cys Ala Gly Leu Thr Ala Ser Val
245 250 255

ctc agc acg ccg gcg aac gtg atc aag tgg cgg atg atg aac cag ccg 816
Leu Ser Thr Pro Ala Asn Val Ile Lys Ser Arg Met Met Asn Gln Pro
260 265 270

gtg aac gag agc ggc aag aat ctg tac tac aag aac tcc ctc gac tgc 864
Val Asn Glu Ser Gly Lys Asn Leu Tyr Tyr Lys Asn Ser Leu Asp Cys
275 280 285

att agg aag ctg gtc agg gag gag ggt gtc ctc acg ttg tat aag ggc 912
Ile Arg Lys Leu Val Arg Glu Glu Gly Val Leu Thr Leu Tyr Lys Gly
290 295 300

ctc atg ccc act tgg ttt cgc ctg gga cgc ttc tca gtg ctc ttt tgg 960
Leu Met Pro Thr Trp Phe Arg Leu Gly Pro Phe Ser Val Leu Phe Trp
305 310 315 320

ctg tcc gtc gag cag ctg cgt cag tgg aaa ggc cag agt gga ttt tag 1008
Leu Ser Val Glu Gln Leu Arg Gln Trp Lys Gly Gln Ser Gly Phe
325 330 335

<210> 5
<211> 335
<212> PRT
<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 5
Met Asp Lys Ala Glu Arg Asp Tyr Trp His Leu Arg Ser Leu Glu Ile
1 5 10 15

Glu Glu Glu Pro Arg Phe Pro Pro Thr Asn Val Ala Asp Pro Leu Thr
20 25 30

Ala Arg Asn Leu Phe Gln Leu Tyr Val Asn Thr Phe Ile Gly Ala Asn
35 40 45

Leu Ala Glu Ser Cys Val Phe Pro Leu Asp Val Ala Lys Thr Arg Met
50 55 60

Gln Val Asp Gly Glu Gln Ala Lys Lys Thr Gly Lys Ala Met Pro Thr
65 70 75 80

Phe Arg Ala Thr Leu Thr Asn Met Ile Arg Val Glu Gly Phe Lys Ser
85 90 95

WO 02/42455

4/30

PCT/EP01/13663

Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Ala Met Val Thr Arg Asn Phe Ile Phe Asn
 100 105 110
 Ser Leu Arg Val Val Leu Tyr Asp Val Phe Arg Arg Pro Phe Leu Tyr
 115 120 125
 Gln Asn Glu Arg Asn Glu Glu Val Leu Lys Ile Tyr Met Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Ser Phe Thr Ala Gly Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Asn Pro Phe
 145 150 155 160
 Asp Ile Val Lys Val Arg Met Gln Thr Glu Gly Arg Arg Arg Gln Leu
 165 170 175
 Gly Tyr Asp Val Arg Val Asn Ser Met Val Gln Ala Phe Val Asp Ile
 180 185 190
 Tyr Arg Arg Gly Gly Leu Pro Ser Met Trp Lys Gly Val Gly Pro Ser
 195 200 205
 Cys Met Arg Ala Cys Leu Met Thr Thr Gly Asp Val Gly Ser Tyr Asp
 210 215 220
 Ile Ser Lys Arg Thr Phe Lys Arg Leu Leu Asp Leu Glu Glu Gly Leu
 225 230 235 240
 Pro Leu Arg Phe Val Ser Ser Met Cys Ala Gly Leu Thr Ala Ser Val
 245 250 255
 Leu Ser Thr Pro Ala Asn Val Ile Lys Ser Arg Met Met Asn Gln Pro
 260 265 270
 Val Asn Glu Ser Gly Lys Asn Leu Tyr Tyr Lys Asn Ser Leu Asp Cys
 275 280 285
 Ile Arg Lys Leu Val Arg Glu Glu Gly Val Leu Thr Leu Tyr Lys Gly
 290 295 300
 Leu Met Pro Thr Trp Phe Arg Leu Gly Pro Phe Ser Val Leu Phe Trp
 305 310 315 320
 Leu Ser Val Glu Gln Leu Arg Gln Trp Lys Gly Gln Ser Gly Phe
 325 330 335

<210> 6

<211> 2953

<212> DNA

<213> Drosophila melanogaster

<400> 6

ctgctgggaa ttccggcacga gaagtcgatt agtcgttttt cgttggagag ctgtctgttc 60
 gcatttatcc gctgtctcgc gcgtagaaaa gttgttactt aatgttcatt gctgccacac 120
 gtgcttgatt attaatggca gtgcgctaatt cagtcgcttg tcagctgagc agaccacaaa 180
 aaacgaaggc aattatttag gctgcctctt cagttcggca ttacataaga aacgaatggc 240
 caaacgaaaa taattttgaa acaatttcgg agttaatatt gcatcagcaa ttctgaacag 300
 cagatacaca aaaagggcag caatttggcc aacaaagtct tcataaacga caacaaacga 360
 gtgaaaatat gagctgggca acaacaaagc aaaggcacaa atgtttcaac ttagcagcg 420
 gcagcaacaa aaacaaccgg agcagcggca gcagcagcaa caacaacaac tgtgcgccta 480
 gcaacaagat aatttcgacg agcgatttcc ttgatttgc gccatctgt gtcgaaagca 540

WO 02/42455

5/30

PCT/EP01/13663

```

gccgaaaagc caaagagtgt aaatagcacg tagttttagt acaattcact gtacgaaaaa 600
tgagtttcaa cgggggcagc caataagcct gcgatagcaa caataatata gaacgagcgc 660
aaaagaaatc accagagatt gcacaatagt aatccgatca aggcacagtc aacgggcagt 720
ccaagaaatc tcaacgtatt cgcacacgtc aagtacgagc atttgggtgc cggagtatcc 780
ggcggagtgg tgtccacact cattctacat cccctggatt tgatcaagat tcgattcgca 840
gttaacgatg gccggacagc taoggtgccc caataccggg gactgagcag cgccttcacc 900
acgattttcc ggcaagaggg cttccgggga ctctacaagc gcgtcacccc caatgtctgg 960
ggatcgggct cctcttgggg cctgtacttc atgttctaca acaccattaa gacatttatc 1020
caaggaggaa acacgacctt gccattgggc cccacaatga acatgcttgc agctgctgag 1080
tcgggaattc tcaccctgct gctgaccaac cccatctggg tggatgaagc ggcctctctg 1140
ctgcaagtgc atgcgcgcag tagtgccgag tacaggggca tgatccacgc cttgggcccag 1200
atatcaaggg aggggggaat ccgtggcctg taocggcgct ttgtcccgcc catgttgggc 1260
gtctcccaag gagccatcca gttcatgacc tacaggagag tgaagaaocg ctacaaacgaa 1320
tatcgcaaac tgcctatcga caggaagctg gccaccacgy agtacttggc cttcggcgct 1380
gtctcccaag tgatcgagc ggccggccac tgggactacc aggtgttccg ggcacggctg 1440
caggacacac atcaccgata caacggcacc tgggactacc tggatcaagc ttggaggtac 1500
gagcgcatgc gaggtttcta taagggcctg gtgcccaccc tggatcaagc caacggcacc 1560
atctgcagtg tcatgtgat ctgggagagc ctgacagagt agatggagta ttagtactag 1620
atcatcgaa ctggaatctg acagagaatt taagctaagc acctagaata cacgaatctt 1680
tctgtttccc tcgatgtgac agctaacagc agaaaatgac aaacttattc tgtattattg 1740
ttgtaactcg atttgggttt agccctagca ccttacttta gccttaagtg tattccatat 1800
ctagtttatt gtacatcctt cactcccaac ctgcaagta actgatgtga tggggcgctc 1860
gtcaaaatag cccctgocca tgaattgtaa ttcaaaaa gcatttcttg cactcttcat 1920
aaaaaacaac acatatttag ttcttagttt agttaaata ttattcttat aacggcttgg 1980
aatgtgttaa gcacaaagaa aaaccagtta ctgtttagtt gatacaaaat ttctgtttgg 2040
caaaagagat cttcatagtt ttgaaaatg gtttataatt ttaaggataa accttgacat 2100
ttatgtaaat aagcataaac gcattgtgaa accaacttag tctacagtg gaacaatctt 2160
attgaaatca aagaaagat aagaaatgag aaattactta cccattattaa aagggccagc 2220
tggcagacct aatgaaagc caagaaacaa actaaagcaa acactgtcac cgcgtccagc 2280
ctggtctctt tcatttgtcc aagggtccat ggcagcttga gtaagtgtc cttgctcctt 2340
ccgtccctaa agtcttcgat caccocctta attgtgcaga atctcttgc taactgtaaa 2400
cagccaatgc gcccttactg taagttagtg tagctttcag ttctcagctc ctaccgcgat 2460
tggttttggt tctctttgca ggtttgaggg ctacagagcc ttctacaagg ggcgtgaagg 2520
gagtttaacc cagatagtgc ctgcctgcat ggtcactctt ctggtgtcag agaacgtctc 2580
gcatttctcg ctgcagagc ggaagcgaat tgagactaaa cgggatgcgt cggacgtgtg 2640
atcttctctt ggttgagttc cttttaggct tctaagataa atatatccc tcacgacatt 2700
tccatagtgc tctatagta cggggcagtt gcaatcgtgc tgagcatgag cagctgcttt 2760
tagtttaagt ttagttagtt gttgcgaaga cttatttggc cttttcgtag taagtaaatg 2820
gattgttgtt cctaagtgtg gatcagaatg gatttgtgat tgaattcaga cgaaagtgtt 2880
acaatatacc tgtgaaatat aagtcocatg cctcactctt gaaaataaac caaatctttg 2940
tgagcccaaa aaa 2953

```

<210> 7

<211> 915

<212> DNA

<213> *Drosophila melanogaster*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(912)

<400> 7

```

atg aat ccg atc aag gca cag tca acg ggc agt ccc aag aaa ttc aac 48
Met Asn Pro Ile Lys Ala Gln Ser Thr Gly Ser Pro Lys Lys Phe Asn
1 5 10 15

```

```

gta ttc gca cac gtc aag tac gag cat ttg gtt gcc gga gta tcc gcc 96
Val Phe Ala His Val Lys Tyr Glu His Leu Val Ala Gly Val Ser Gly
20 25 30

```

```

gga gtg gtg tcc aca ctc att cta cat ccc ctg gat ttg atc aag att 144
Gly Val Val Ser Thr Leu Ile Leu His Pro Leu Asp Leu Ile Lys Ile

```

WO 02/42455	6/30	PCT/EP01/13663
35	40	45
cga ttc gca gtt aac gat ggc cgg aca gct acg gtg cgg caa tac cgg 192		
Arg Phe Ala Val Asn Asp Gly Arg Thr Ala Thr Val Pro Gln Tyr Arg		
50	55	60
gga ctg agc agc gcc ttc acc acg att ttc cgg caa gag ggc ttc cgc 240		
Gly Leu Ser Ser Ala Phe Thr Thr Ile Phe Arg Gln Glu Gly Phe Arg		
65	70	75
gga ctc tac aaa ggc gtc acc ccc aat gtc tgg gga tgg ggc tcc tct 288		
Gly Leu Tyr Lys Gly Val Thr Pro Asn Val Trp Gly Ser Gly Ser Ser		
85	90	95
tgg ggc ctg tac ttc ttc atg ttc tac aac acc att aag aca ttt atc caa 336		
Trp Gly Leu Tyr Phe Met Phe Tyr Asn Thr Ile Lys Thr Phe Ile Gln		
100	105	110
gga gga aac acg acc atg cca ttg ggc ccc aca atg aac atg ctt gca 384		
Gly Gly Asn Thr Thr Met Pro Leu Gly Pro Thr Met Asn Met Leu Ala		
115	120	125
gct gct gag tgg gga att ctc acc ctg ctg ctg acc aac ccc atc tgg 432		
Ala Ala Glu Ser Gly Ile Leu Thr Leu Leu Leu Thr Asn Pro Ile Trp		
130	135	140
gtg gtg aag acg cgt ctc tgc ctg cag tgc gat gcc gcg agt agt gcc 480		
Val Val Lys Thr Arg Leu Cys Leu Gln Cys Asp Ala Ala Ser Ser Ala		
145	150	155
gag tac agg ggc atg atc cac gcc ttg ggc cag ata tac aag gag gag 528		
Glu Tyr Arg Gly Met Ile His Ala Leu Gly Gln Ile Tyr Lys Glu Glu		
165	170	175
gga atc cgt ggc ctg tac cgc ggc ttt gtt ccc ggc atg ttg ggc gtc 576		
Gly Ile Arg Gly Leu Tyr Arg Gly Phe Val Pro Gly Met Leu Gly Val		
180	185	190
tcc cac gga gcc atc cag ttc atg acc tac gag gag ctg aag aac gcc 624		
Ser His Gly Ala Ile Gln Phe Met Thr Tyr Glu Glu Leu Lys Asn Ala		
195	200	205
tac aac gaa tat cgc aaa ctg ccc atc gac acg aag ctg gcc acc acc 672		
Tyr Asn Glu Tyr Arg Lys Leu Pro Ile Asp Thr Lys Leu Ala Thr Thr		
210	215	220
gag tac ttg gcc ttc gcg gct gtc tcc aag ctg atc gca gcg gcg gcc 720		
Glu Tyr Leu Ala Phe Ala Ala Val Ser Lys Leu Ile Ala Ala Ala Ala		
225	230	235
acc tac cgg tac cag gtg gtc cgg gca cgg ctg cag gac cac cat cac 768		
Thr Tyr Pro Tyr Gln Val Val Arg Ala Arg Leu Gln Asp His His His		
245	250	255
cga tac aac ggc acc tgg gac tgc atc aaa cag act tgg agg tac gag 816		
Arg Tyr Asn Gly Thr Trp Asp Cys Ile Lys Gln Thr Trp Arg Tyr Glu		
260	265	270
gcg atg cga ggt ttc tat aag ggc ctg gtg ccc tac ctg gtc cac gtc 864		
Arg Met Arg Gly Phe Tyr Lys Gly Leu Val Pro Tyr Leu Val His Val		
275	280	285
acg ccc aac atc tgc atg gtc atg ctg atc tgg gag aag ctg acc agc 912		

WO 02/42455

7/30

PCT/EP01/13663

Thr Pro Asn Ile Cys Met Val Met Leu Ile Trp Glu Lys Leu Thr Ser
 290 295 300

tag

915

<210> 8
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Drosophila melanogaster

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

WO 02/42455 8/30 PCT/EP01/13663

Arg Met Arg Gly Phe Tyr Lys Gly Leu Val Pro Tyr Leu Val His Val
275 280 285

Thr Pro Asn Ile Cys Met Val Met Leu Ile Trp Glu Lys Leu Thr Ser
290 295 300

<210> 9
<211> 948
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(945)

<400> 9
atg acg ggc cag ggc cag tcg gcg tcc ggg tcg tcg gcg tgg agc acg 48
Met Thr Gly Gln Gly Gln Ser Ala Ser Gly Ser Ser Ala Trp Ser Thr
1 5 10 15

gta ttc cgc cac gtc cgg tat gag aac ctg ata gcg ggc gtg agc ggc 96
Val Phe Arg His Val Arg Tyr Glu Asn Leu Ile Ala Gly Val Ser Gly
20 25 30

ggc gtc tta tcc aac ctt gcg ctg cat ccg ctc gac ctc gtg aag atc 144
Gly Val Leu Ser Asn Leu Ala Leu His Pro Leu Asp Leu Val Lys Ile
35 40 45

cgc ttc gcc gtg agt gat gga ttg gaa ctg aga ccg aaa tat aat gga 192
Arg Phe Ala Val Ser Asp Gly Leu Glu Leu Arg Pro Lys Tyr Asn Gly
50 55 60

att tta cat tgc ttg act acc att tgg aaa ctt gat gga cta cgg gga 240
Ile Leu His Cys Leu Thr Thr Ile Trp Lys Leu Asp Gly Leu Arg Gly
65 70 75 80

ctt tat caa gga gta acc cca aat ata tgg ggt gca ggt tta tcc tgg 288
Leu Tyr Gln Gly Val Thr Pro Asn Ile Trp Gly Ala Gly Leu Ser Trp
85 90 95

gga ctc tac ttt ttc ttt tac aat gcc atc aag tca tat aaa aca gaa 336
Gly Leu Tyr Phe Phe Phe Tyr Asn Ala Ile Lys Ser Tyr Lys Thr Glu
100 105 110

gga aga gct gaa cgt tta gag gca aca gaa tac ctt gtc tca gct gct 384
Gly Arg Ala Glu Arg Leu Glu Ala Thr Glu Tyr Leu Val Ser Ala Ala
115 120 125

gaa gct gga gcc atg acc ctc tgc att aca aac cca tta tgg gta aca 432
Glu Ala Gly Ala Met Thr Leu Cys Ile Thr Asn Pro Leu Trp Val Thr
130 135 140

aaa act cgc ctt atg tta cag tat gat gct gtt gtt aac tcc coa cac 480
Lys Thr Arg Leu Met Leu Gln Tyr Asp Ala Val Val Asn Ser Pro His
145 150 155 160

ccg caa tat aaa gga atg ttt gat aca ctt gtg aaa ata tat aag tat 528
Pro Gln Tyr Lys Gly Met Phe Asp Thr Leu Val Lys Ile Tyr Lys Tyr
165 170 175

gaa ggt gtg cgt gga tta tat aag gga ttt gtt cct ggg ctg ttt gga 576

WO 02/42455 9/30 PCT/EP01/13663

Glu Gly Val Arg Gly Leu Tyr Lys Gly Phe Val Pro Gly Leu Phe Gly
180 185 190

aca tcg cac ggt gcc ctt cag ttt atg gca tat gaa ttg ctg aag ttg 624
Thr Ser His Gly Ala Leu Gln Phe Met Ala Tyr Glu Leu Leu Lys Leu
195 200 205

aag tac aac cag cat atc aat aga tta cca gaa gcc cag ttg agc aca 672
Lys Tyr Asn Gln His Ile Asn Arg Leu Pro Glu Ala Gln Leu Ser Thr
210 215 220

gta gaa tat ata tct gtt gca gca cta tcc aaa ata ttt gct gtc gca 720
Val Glu Tyr Ile Ser Val Ala Ala Leu Ser Lys Ile Phe Ala Val Ala
225 230 235 240

gca aca tac cca tat caa gtc gta aga gct cgt ctt cag gat caa cac 768
Ala Thr Tyr Pro Tyr Gln Val Val Arg Ala Arg Leu Gln Asp Gln His
245 250 255

atg ttt tac agt ggt gta ata gat gta atc aca aag aca tgg agg aaa 816
Met Phe Tyr Ser Gly Val Ile Asp Val Ile Thr Lys Thr Trp Arg Lys
260 265 270

gaa ggc gtc ggt gga ttt tac aag gga att gct cct aat ttg att aga 864
Glu Gly Val Gly Phe Tyr Lys Gly Ile Ala Pro Asn Leu Ile Arg
275 280 285

gtg act cca gcc tgc tgt att acc ttt gtg gta tat gaa aac gtc tca 912
Val Thr Pro Ala Cys Cys Ile Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Val Ser
290 295 300

cat ttt tta ctt gac ctt aga gaa aag aga aag taa 948
His Phe Leu Leu Asp Leu Arg Glu Lys Arg Lys
305 310 315

<210> 10
<211> 315
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Met Thr Gly Gln Gly Gln Ser Ala Ser Gly Ser Ser Ala Trp Ser Thr
1 5 10 15

Val Phe Arg His Val Arg Tyr Glu Asn Leu Ile Ala Gly Val Ser Gly
20 25 30

Gly Val Leu Ser Asn Leu Ala Leu His Pro Leu Asp Leu Val Lys Ile
35 40 45

Arg Phe Ala Val Ser Asp Gly Leu Glu Leu Arg Pro Lys Tyr Asn Gly
50 55 60

Ile Leu His Cys Leu Thr Thr Ile Trp Lys Leu Asp Gly Leu Arg Gly
65 70 75 80

Leu Tyr Gln Gly Val Thr Pro Asn Ile Trp Gly Ala Gly Leu Ser Trp
85 90 95

Gly Leu Tyr Phe Phe Phe Tyr Asn Ala Ile Lys Ser Tyr Lys Thr Glu
100 105 110

WO 02/42455 10/30 PCT/EP01/13663

Gly Arg Ala Glu Arg Leu Glu Ala Thr Glu Tyr Leu Val Ser Ala Ala
115 120 125

Glu Ala Gly Ala Met Thr Leu Cys Ile Thr Asn Pro Leu Trp Val Thr
130 135 140

Lys Thr Arg Leu Met Leu Gln Tyr Asp Ala Val Val Asn Ser Pro His
145 150 155 160

Pro Gln Tyr Lys Gly Met Phe Asp Thr Leu Val Lys Ile Tyr Lys Tyr
165 170 175

Glu Gly Val Arg Gly Leu Tyr Lys Gly Phe Val Pro Gly Leu Phe Gly
180 185 190

Thr Ser His Gly Ala Leu Gln Phe Met Ala Tyr Glu Leu Leu Lys Leu
195 200 205

Lys Tyr Asn Gln His Ile Asn Arg Leu Pro Glu Ala Gln Leu Ser Thr
210 215 220

Val Glu Tyr Ile Ser Val Ala Ala Leu Ser Lys Ile Phe Ala Val Ala
225 230 235 240

Ala Thr Tyr Pro Tyr Gln Val Val Arg Ala Arg Leu Gln Asp Gln His
245 250 255

Met Phe Tyr Ser Gly Val Ile Asp Val Ile Thr Lys Thr Trp Arg Lys
260 265 270

Glu Gly Val Gly Gly Phe Tyr Lys Gly Ile Ala Pro Asn Leu Ile Arg
275 280 285

Val Thr Pro Ala Cys Cys Ile Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Val Ser
290 295 300

His Phe Leu Leu Asp Leu Arg Glu Lys Arg Lys
305 310 315

<210> 11
<211> 951
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(948)

<400> 11
atg aca ggc cag ggc cag tcg gct gcc ggg tcg gcg gcg tgg agc gtg 48
Met Thr Gly Gln Gly Gln Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Trp Ser Val
1 5 10 15

gtg ttc cgc cac gtc cgg tac gag aac ctg gtg gct ggc gtg agt ggc 96
Val Phe Arg His Val Arg Tyr Glu Asn Leu Val Ala Gly Val Ser Gly
20 25 30

ggg gtc ttg tcc aac ctg gcg ctg cac ccg ctc gac ctc gtg aag atc 144
Gly Val Leu Ser Asn Leu Ala Leu His Pro Leu Asp Leu Val Lys Ile
35 40 45

WO 02/42455	11/30	PCT/EP01/13663
cgc ttc gct gtg agt gat gga ctg gaa gta aga cca aaa tat aaa gga Arg Phe Ala Val Ser Asp Gly Leu Glu Val Arg Pro Lys Tyr Lys Gly 50 55 60		192
att ttg cat tgc ttg gct acc ett tgg aaa gtt gat gga cta cga gga Ile Leu His Cys Leu Ala Thr Ile Trp Lys Val Asp Gly Leu Arg Gly 65 70 75 80		240
ctt tat caa gga gta acc ccg aat gtg tgg ggt gcc ggt tta tcc tgg Leu Tyr Gln Gly Val Thr Pro Asn Val Trp Gly Ala Gly Leu Ser Trp 85 90 95		288
gga ctc tac ttt ttc ttt tac aat gcc atc aaa tcg tat aag aca gag Gly Leu Tyr Phe Phe Phe Tyr Asn Ala Ile Lys Ser Tyr Lys Thr Glu 100 105 110		336
gga aga gct gaa cag tta gag cca tta gag tac ctc gtc tca gct gct Gly Arg Ala Glu Gln Leu Glu Pro Leu Glu Tyr Leu Val Ser Ala Ala 115 120 125		384
gaa gct gga gcc atg act ctg tgc att aca aac cca tta tgg gtg acg Glu Ala Gly Ala Met Thr Leu Cys Ile Thr Asn Pro Leu Trp Val Thr 130 135 140		432
aaa act cgc ctt atg tta caa tat ggt ggt gtt gct agc cct tca cag Lys Thr Arg Leu Met Leu Gln Tyr Gly Gly Val Ala Ser Pro Ser Gln 145 150 155		480
aga cag tat aaa gga atg ttt gat gca ctt gtg aaa ata tat aaa tat Arg Gln Tyr Lys Gly Met Phe Asp Ala Leu Val Lys Ile Tyr Lys Tyr 165 170 175		528
gaa ggt gtg cgt gga tta tac aag gga ttt gtc cct ggg ctg ttt gga Glu Gly Val Arg Gly Leu Tyr Lys Gly Phe Val Pro Gly Leu Phe Gly 180 185 190		576
aca tca cat ggt gcc ctt cag ttt atg gca tat gag ttg cta aag ttg Thr Ser His Gly Ala Leu Gln Phe Met Ala Tyr Glu Leu Leu Lys Leu 195 200 205		624
aag tac aac aaa cac atc aat aga tta ccg gaa gcc cag ctg agt aca Lys Tyr Asn Lys His Ile Asn Arg Leu Pro Glu Ala Gln Leu Ser Thr 210 215 220		672
gca gaa tac atc tct gtc gca gcg cta tcc aaa ata ttt gcc gta gca Ala Glu Tyr Ile Ser Val Ala Ala Leu Ser Lys Ile Phe Ala Val Ala 225 230 235 240		720
gca aca tac ccg tat cag gtt gtg aga gcc cgc ctt cag gat cag cat Ala Thr Tyr Pro Tyr Gln Val Val Arg Ala Arg Leu Gln Asp Gln His 245 250 255		768
gtg tct tat ggt ggt gta aca gat gtg atc aca aag acg tgg agg aaa Val Ser Tyr Gly Gly Val Thr Asp Val Ile Thr Lys Thr Trp Arg Lys 260 265 270		816
gaa ggc atc ggt gga ttt tac aaa gga att gcc ccc aat ctg att aga Glu Gly Ile Gly Gly Phe Tyr Lys Gly Ile Ala Pro Asn Leu Ile Arg 275 280 285		864
gtg act cca gcc tgc tgc atc acc ttt gtg gtt tat gaa aat gtc tct Val Thr Pro Ala Cys Cys Ile Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Val Ser 290 295 300		912

WO 02/42455

12/30

PCT/EP01/13663

cac ttt tta tat gac ctt aga gaa aag aaa gtg ggc taa
 His Phe Leu Tyr Asp Leu Arg Glu Lys Lys Val Gly
 305 310 315

951

<210> 12
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12
 Met Thr Gly Gln Gly Gln Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Trp Ser Val
 1 5 10 15
 Val Phe Arg His Val Arg Tyr Glu Asn Leu Val Ala Gly Val Ser Gly
 20 25 30
 Gly Val Leu Ser Asn Leu Ala Leu His Pro Leu Asp Leu Val Lys Ile
 35 40 45
 Arg Phe Ala Val Ser Asp Gly Leu Glu Val Arg Pro Lys Tyr Lys Gly
 50 55 60
 Ile Leu His Cys Leu Ala Thr Ile Trp Lys Val Asp Gly Leu Arg Gly
 65 70 75 80
 Leu Tyr Gln Gly Val Thr Pro Asn Val Trp Gly Ala Gly Leu Ser Trp
 85 90 95
 Gly Leu Tyr Phe Phe Phe Tyr Asn Ala Ile Lys Ser Tyr Lys Thr Glu
 100 105 110
 Gly Arg Ala Glu Gln Leu Glu Pro Leu Glu Tyr Leu Val Ser Ala Ala
 115 120 125
 Glu Ala Gly Ala Met Thr Leu Cys Ile Thr Asn Pro Leu Trp Val Thr
 130 135 140
 Lys Thr Arg Leu Met Leu Gln Tyr Gly Gly Val Ala Ser Pro Ser Gln
 145 150 155 160
 Arg Gln Tyr Lys Gly Met Phe Asp Ala Leu Val Lys Ile Tyr Lys Tyr
 165 170 175
 Glu Gly Val Arg Gly Leu Tyr Lys Gly Phe Val Pro Gly Leu Phe Gly
 180 185 190
 Thr Ser His Gly Ala Leu Gln Phe Met Ala Tyr Glu Leu Leu Lys Leu
 195 200 205
 Lys Tyr Asn Lys His Ile Asn Arg Leu Pro Glu Ala Gln Leu Ser Thr
 210 215 220
 Ala Glu Tyr Ile Ser Val Ala Ala Leu Ser Lys Ile Phe Ala Val Ala
 225 230 235 240
 Ala Thr Tyr Pro Tyr Gln Val Val Arg Ala Arg Leu Gln Asp Gln His
 245 250 255
 Val Ser Tyr Gly Gly Val Thr Asp Val Ile Thr Lys Thr Trp Arg Lys
 260 265 270

WO 02/42455

13/30

PCT/EP01/13663

Glu Gly Ile Gly Gly Phe Tyr Lys Gly Ile Ala Pro Asn Leu Ile Arg
275 280 285

Val Thr Pro Ala Cys Cys Ile Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Val Ser
290 295 300

His Phe Leu Tyr Asp Leu Arg Glu Lys Lys Val Gly
305 310 315

<210> 13
<211> 951
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(948)

<400> 13
atg aca ggc cag ggc cag tgc gct gcc ggg tgc gcg gcg tgg agc gcg 48
Met Thr Gly Gln Gly Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Trp Ser Ala
1 5 10 15
gtg ttc cgc cac gtc cgg tac gag aac ctg gtg gct gcc gtg agt ggc 96
Val Phe Arg His Val Arg Tyr Glu Asn Leu Val Ala Gly Val Ser Gly
20 25 30
ggg gtc ttg tcc aac ctg gcg ctg cac ccg ctc gac ctc gtg aag atc 144
Gly Val Leu Ser Asn Leu Ala Leu His Pro Leu Asp Leu Val Lys Ile
35 40 45
cgc ttc gct gtg agt gat gga ctg gaa gta aga cca aaa tat aaa gga 192
Arg Phe Ala Val Ser Asp Gly Leu Glu Val Arg Pro Lys Tyr Lys Gly
50 55 60
att ttg cat tgc ttg gct acc att tgg aaa gtt gat gga cta cga gga 240
Ile Leu His Cys Leu Ala Thr Ile Trp Lys Val Asp Gly Leu Arg Gly
65 70 75 80
ctt tat caa gga gta acc ccg aat gtg tgg ggt gcc ggt tta tcc tgg 288
Leu Tyr Gln Gly Val Thr Pro Asn Val Trp Gly Ala Gly Leu Ser Trp
85 90 95
gga ctc tac ttt ttc ttt tac aat gcc atc aaa tgc tat aag aca gag 336
Gly Leu Tyr Phe Phe Phe Tyr Asn Ala Ile Lys Ser Tyr Lys Thr Glu
100 105 110
gga aga gct gaa cag tta gag cca tta gag tac ctc gtc tca gct gct 384
Gly Arg Ala Glu Gln Leu Glu Pro Leu Glu Tyr Leu Val Ser Ala Ala
115 120 125
gaa gct gga gcc atg act ctg tgc att aca aac cca tta tgg gtg acg 432
Glu Ala Gly Ala Met Thr Leu Cys Ile Thr Asn Pro Leu Trp Val Thr
130 135 140
aaa act cgc ctt atg tta caa tat ggt ggt gtt gct agc oct tca cag 480
Lys Thr Arg Leu Met Leu Gln Tyr Gly Gly Val Ala Ser Pro Ser Gln
145 150 155 160
aga cag tat aaa gga atg ttt gat gca ctt gtg aat ata tat aaa tat 528
Arg Gln Tyr Lys Gly Met Phe Asp Ala Leu Val Asn Ile Tyr Lys Tyr

WO 02/42455 14/30 PCT/EP01/13663

165 170 175

gaa ggt gtg cgt gga tta tac aag gga ttt gtc cct ggg ctg ttt gga 576
 Glu Gly Val Arg Gly Leu Tyr Lys Gly Phe Val Pro Gly Leu Phe Gly
 180 185 190

aca tca cat ggt gcc ctt cag ttt atg gca tat gag ttg cta aag ttg 624
 Thr Ser His Gly Ala Leu Gln Phe Met Ala Tyr Glu Leu Leu Lys Leu
 195 200 205

aag tac aac aaa cac atc aat aga tta cag gaa gcc cag ctg agt aca 672
 Lys Tyr Asn Lys His Ile Asn Arg Leu Pro Glu Ala Gln Leu Ser Thr
 210 215 220

gca gaa tac atc tct gtc gca gcg cta tcc aaa ata ttt gcc gta gca 720
 Ala Glu Tyr Ile Ser Val Ala Ala Leu Ser Lys Ile Phe Ala Val Ala
 225 230 235 240

gca aca tac ccg tat cag gtt gtg aga gcc cgc ctt cag gat cag cat 768
 Ala Thr Tyr Pro Tyr Gln Val Val Arg Ala Arg Leu Gln Asp Gln His
 245 250 255

gtg tct tat ggt ggt gta aca gat gtg atc aca aag acg tgg agg aaa 816
 Val Ser Tyr Gly Gly Val Thr Asp Val Ile Thr Lys Thr Trp Arg Lys
 260 265 270

gaa ggc atc ggt gga ttt tac aaa gga att gcc ccc aat ctg att agg 864
 Glu Gly Ile Gly Gly Phe Tyr Lys Gly Ile Ala Pro Asn Leu Ile Arg
 275 280 285

gtg act cca gcc tgc tgc atc acc ttt gtg gtt tat gaa aat gtc tct 912
 Val Thr Pro Ala Cys Cys Ile Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Val Ser
 290 295 300

cac ttt tta tat gac ctt aga gaa aag aaa gtg ago taa 951
 His Phe Leu Tyr Asp Leu Arg Glu Lys Lys Val Ser
 305 310 315

<210> 14
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14
 Met Thr Gly Gln Gly Gln Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Trp Ser Ala
 1 5 10 15

Val Phe Arg His Val Arg Tyr Glu Asn Leu Val Ala Gly Val Ser Gly
 20 25 30

Gly Val Leu Ser Asn Leu Ala Leu His Pro Leu Asp Leu Val Lys Ile
 35 40 45

Arg Phe Ala Val Ser Asp Gly Leu Glu Val Arg Pro Lys Tyr Lys Gly
 50 55 60

Ile Leu His Cys Leu Ala Thr Ile Trp Lys Val Asp Gly Leu Arg Gly
 65 70 75 80

Leu Tyr Gln Gly Val Thr Pro Asn Val Trp Gly Ala Gly Leu Ser Trp
 85 90 95

WO 02/42455

15/30

PCT/EP01/13663

Gly Leu Tyr Phe Phe Phe Tyr Asn Ala Ile Lys Ser Tyr Lys Thr Glu
 100 105 110
 Gly Arg Ala Glu Gln Leu Glu Pro Leu Glu Tyr Leu Val Ser Ala Ala
 115 120 125
 Glu Ala Gly Ala Met Thr Leu Cys Ile Thr Asn Pro Leu Trp Val Thr
 130 135 140
 Lys Thr Arg Leu Met Leu Gln Tyr Gly Gly Val Ala Ser Pro Ser Gln
 145 150 155 160
 Arg Gln Tyr Lys Gly Met Phe Asp Ala Leu Val Asn Ile Tyr Lys Tyr
 165 170 175
 Glu Gly Val Arg Gly Leu Tyr Lys Gly Phe Val Pro Gly Leu Phe Gly
 180 185 190
 Thr Ser His Gly Ala Leu Gln Phe Met Ala Tyr Glu Leu Leu Lys Leu
 195 200 205
 Lys Tyr Asn Lys His Ile Asn Arg Leu Pro Glu Ala Gln Leu Ser Thr
 210 215 220
 Ala Glu Tyr Ile Ser Val Ala Ala Leu Ser Lys Ile Phe Ala Val Ala
 225 230 235 240
 Ala Thr Tyr Pro Tyr Gln Val Val Arg Ala Arg Leu Gln Asp Gln His
 245 250 255
 Val Ser Tyr Gly Gly Val Thr Asp Val Ile Thr Lys Thr Trp Arg Lys
 260 265 270
 Glu Gly Ile Gly Gly Phe Tyr Lys Gly Ile Ala Pro Asn Leu Ile Arg
 275 280 285
 Val Thr Pro Ala Cys Cys Ile Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Val Ser
 290 295 300
 His Phe Leu Tyr Asp Leu Arg Glu Lys Lys Val Ser
 305 310 315

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Drosophila melanogaster

<400> 15
 Leu Val Ala Gly Val Ser Gly Gly Val Val Ser Thr Leu Ile Leu His
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Drosophila melanogaster

<400> 16
 Val Lys Tyr Glu His Leu Val Ala Gly Val Ser Gly Gly Val Val Ser
 1 5 10 15

WO 02/42455

16/30

PCT/EP01/13663

Thr Leu Ile Leu His Pro Leu Asp Leu Ile Lys Ile
20 25

<210> 17
<211> 23
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 17
Gly Val Thr Pro Asn Val Trp Gly Ser Gly Ser Ser Trp Gly Leu Tyr
1 5 10 15

Phe Met Phe Tyr Asn Thr Ile
20

<210> 18
<211> 31
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 18
Gly Leu Tyr Lys Gly Val Thr Pro Asn Val Trp Gly Ser Gly Ser Ser
1 5 10 15

Trp Gly Leu Tyr Phe Met Phe Tyr Asn Thr Ile Lys Thr Phe Ile
20 25 30

<210> 19
<211> 23
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 19
Met Asn Met Leu Ala Ala Ala Glu Ser Gly Ile Leu Thr Leu Leu Leu
1 5 10 15

Thr Asn Pro Ile Trp Val Val
20

<210> 20
<211> 27
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 20
Gly Pro Thr Met Asn Met Leu Ala Ala Ala Glu Ser Gly Ile Leu Thr
1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Asn Pro Ile Trp Val Val Lys
20 25

<210> 21
<211> 23
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 21
Gly Leu Tyr Arg Gly Phe Val Pro Gly Met Leu Gly Val Ser His Gly

WO 02/42455 17/30 PCT/EP01/13663

1 5 10 15

Ala Ile Gln Phe Met Thr Tyr
20

<210> 22
<211> 25
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 22
Arg Gly Leu Tyr Arg Gly Phe Val Pro Gly Met Leu Gly Val Ser His
1 5 10 15

Gly Ala Ile Gln Phe Met Thr Tyr Glu
20 25

<210> 23
<211> 21
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 23
Glu Tyr Leu Ala Phe Ala Ala Val Ser Lys Leu Ile Ala Ala Ala
1 5 10 15

Thr Tyr Pro Tyr Gln
20

<210> 24
<211> 28
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 24
Leu Ala Thr Thr Glu Tyr Leu Ala Phe Ala Ala Val Ser Lys Leu Ile
1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Thr Tyr Pro Tyr Gln Val Val Arg
20 25

<210> 25
<211> 22
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 25
Phe Tyr Lys Gly Leu Val Pro Tyr Leu Val His Val Thr Pro Asn Ile
1 5 10 15

Cys Met Val Met Leu Ile
20

<210> 26
<211> 24
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

WO 02/42455

18/30

PCT/EP01/13663

<400> 26
Gly Phe Tyr Lys Gly Leu Val Pro Tyr Leu Val His Val Thr Pro Asn
1 5 10 15

Ile Cys Met Val Met Leu Ile Trp
20

<210> 27
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Leu Ile Ala Gly Val Ser Gly Gly Val Leu Ser Asn Leu Ala Leu His
1 5 10 15

<210> 28
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Tyr Glu Asn Leu Ile Ala Gly Val Ser Gly Gly Val Leu Ser Asn Leu
1 5 10 15

Ala Leu His Pro Leu Asp Leu Val Lys Ile
20 25

<210> 29
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Leu Tyr Gln Gly Val Thr Pro Asn Ile Trp Gly Ala Gly Leu Ser Trp
1 5 10 15

Gly Leu Tyr Phe Phe Phe Tyr Asn
20

<210> 30
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Gly Leu Tyr Gln Gly Val Thr Pro Asn Ile Trp Gly Ala Gly Leu Ser
1 5 10 15

Trp Gly Leu Tyr Phe Phe Phe Tyr Asn Ala Ile
20 25

<210> 31
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

WO 02/42455

19/30

PCT/EP01/13663

Tyr Leu Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ala Met Thr Leu Cys Ile Thr
1 5 10 15

Asn Pro Leu Trp Val
20

<210> 32
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Glu Tyr Leu Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ala Met Thr Leu Cys Ile
1 5 10 15

Thr Asn Pro Leu Trp Val Thr
20

<210> 33
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Gly Leu Tyr Lys Gly Phe Val Pro Gly Leu Phe Gly Thr Ser His Gly
1 5 10 15

Ala Leu Gln Phe Met Ala Tyr
20

<210> 34
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Arg Gly Leu Tyr Lys Gly Phe Val Pro Gly Leu Phe Gly Thr Ser His
1 5 10 15

Gly Ala Leu Gln Phe Met Ala Tyr Glu Leu Leu
20 25

<210> 35
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Val Glu Tyr Ile Ser Val Ala Ala Leu Ser Lys Ile Phe Ala Val Ala
1 5 10 15

Ala Thr Tyr Pro Tyr Gln
20

<210> 36
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

WO 02/42455

20/30

PCT/EP01/13663

<400> 36

Gln Leu Ser Thr Val Glu Tyr Ile Ser Val Ala Ala Leu Ser Lys Ile
1 5 10 15Phe Ala Val Ala Ala Thr Tyr Pro Tyr Gln Val Val Arg
20 25

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Gly Ile Ala Pro Asn Leu Ile Arg Val Thr Pro Ala Cys Cys Ile Thr
1 5 10 15

Phe Val Val

<210> 38

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Gly Phe Tyr Lys Gly Ile Ala Pro Asn Leu Ile Arg Val Thr Pro Ala
1 5 10 15Cys Cys Ile Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Val
20 25

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

Leu Val Ala Gly Val Ser Gly Gly Val Leu Ser Asn Leu Ala Leu His
1 5 10 15

<210> 40

<211> 26

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Tyr Glu Asn Leu Val Ala Gly Val Ser Gly Gly Val Leu Ser Asn Leu
1 5 10 15Ala Leu His Pro Leu Asp Leu Val Lys Ile
20 25

<210> 41

<211> 24

<212> PRT

<213> Mus musculus

WO 02/42455

21/30

PCT/EP01/13663

<400> 41

Leu Tyr Gln Gly Val Thr Pro Asn Val Trp Gly Ala Gly Leu Ser Trp
1 5 10 15Gly Leu Tyr Phe Phe Phe Tyr Asn
20

<210> 42

<211> 27

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Gly Leu Tyr Gln Gly Val Thr Pro Asn Val Trp Gly Ala Gly Leu Ser
1 5 10 15Trp Gly Leu Tyr Phe Phe Phe Tyr Asn Ala Ile
20 25

<210> 43

<211> 21

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

Tyr Leu Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ala Met Thr Leu Cys Ile Thr
1 5 10 15Asn Pro Leu Trp Val
20

<210> 44

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Glu Tyr Leu Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ala Met Thr Leu Cys Ile
1 5 10 15Thr Asn Pro Leu Trp Val Thr
20

<210> 45

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Gly Leu Tyr Lys Gly Phe Val Pro Gly Leu Phe Gly Thr Ser His Gly
1 5 10 15Ala Leu Gln Phe Met Ala Tyr
20

<210> 46

<211> 27

<212> PRT

WO 02/42455

22/30

PCT/EP01/13663

<213> Mus musculus

<400> 46

Arg Gly Leu Tyr Lys Gly Phe Val Pro Gly Leu Phe Gly Thr Ser His
1 5 10 15Gly Ala Leu Gln Phe Met Ala Tyr Glu Leu Leu
20 25

<210> 47

<211> 22

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

Ala Glu Tyr Ile Ser Val Ala Ala Leu Ser Lys Ile Phe Ala Val Ala
1 5 10 15Ala Thr Tyr Pro Tyr Gln
20

<210> 48

<211> 29

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Gln Leu Ser Thr Ala Glu Tyr Ile Ser Val Ala Ala Leu Ser Lys Ile
1 5 10 15Phe Ala Val Ala Ala Thr Tyr Pro Tyr Gln Val Val Arg
20 25

<210> 49

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

Gly Ile Ala Pro Asn Leu Ile Arg Val Thr Pro Ala Cys Cys Ile Thr
1 5 10 15

Phe Val Val

<210> 50

<211> 27

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Gly Phe Tyr Lys Gly Ile Ala Pro Asn Leu Ile Arg Val Thr Pro Ala
1 5 10 15Cys Cys Ile Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Val
20 25

<210> 51

WO 02/42455

23/30

PCT/EP01/13663

<211> 975
 <212> DNA
 <213> Danio rerio

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(972)

<400> 51
 atg acc gct acc att tcc agg cag agg cac gcc gca gtc gct gca gac 48
 Met Thr Ala Thr Ile Ser Arg Gln Arg His Ala Ala Val Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 tct tct ggc tct tct ttt tcc att aca gca aac ctc ctg caa ctt tca 96
 Ser Ser Gly Ser Ser Phe Ser Ile Thr Ala Asn Leu Leu Gln Leu Ser
 20 25 30
 aaa cac atc aaa tat gag aat ctt gca gcc gga ctc gct ggt ggt gtt 144
 Lys His Ile Lys Tyr Glu Asn Leu Ala Ala Gly Leu Ala Gly Gly Val
 35 40 45
 att tcc aca atg gtg cta cat cca ttg gat ttg atc aaa atc agg ttt 192
 Ile Ser Thr Met Val Leu His Pro Leu Asp Leu Ile Lys Ile Arg Phe
 50 55 60
 gca gta agt gat ggt ctg aaa atg agg ccc caa tac gat ggc atg tta 240
 Ala Val Ser Asp Gly Leu Lys Met Arg Pro Gln Tyr Asp Gly Met Leu
 65 70 75 80
 gac tgc atg aag acc atc tgg aag ctg gaa gcc att aga ggt ctc tat 288
 Asp Cys Met Lys Thr Ile Trp Lys Leu Glu Gly Ile Arg Gly Leu Tyr
 85 90 95
 cag gga gtg acg ccc aac atc tgg ggg gcc gga tca tca tgg ggc ctc 336
 Gln Gly Val Thr Pro Asn Ile Trp Gly Ala Gly Ser Ser Trp Gly Leu
 100 105 110
 tac ttc ctc ttt tat aat gct att aaa gca tac aca cag gag gga cgg 384
 Tyr Phe Leu Phe Tyr Asn Ala Ile Lys Ala Tyr Thr Gln Glu Gly Arg
 115 120 125
 caa aca gag ctg agt gca tgt gaa cac ctg gtg tcc gca gcg gag gca 432
 Gln Thr Glu Leu Ser Ala Cys Glu His Leu Val Ser Ala Ala Glu Ala
 130 135 140
 ggc att ctg acg ctt tgc ctc acc aat cca gtc tgg gtg aca aag acc 480
 Gly Ile Leu Thr Leu Cys Leu Thr Asn Pro Val Trp Val Thr Lys Thr
 145 150 155 160
 cgg ctg gtg ctg cag tac aat gca gac cct tca cgg aag cag tac aag 528
 Arg Leu Val Leu Gln Tyr Asn Ala Asp Pro Ser Arg Lys Gln Tyr Lys
 165 170 175
 gga atg atg gac gcc ctc gtg aaa ata tac cgt cac gag ggt atc cca 576
 Gly Met Met Asp Ala Leu Val Lys Ile Tyr Arg His Glu Gly Ile Pro
 180 185 190
 gga cta tac agg ggt ttt gtg cct ggg ctg gtc ggg act tcc cat gct 624
 Gly Leu Tyr Arg Gly Phe Val Pro Gly Leu Val Gly Thr Ser His Ala
 195 200 205
 gca ctg cag ttc atg acc tat gaa ggg cta aaa aga gag cag aac aaa 672
 Ala Leu Gln Phe Met Thr Tyr Glu Gly Leu Lys Arg Glu Gln Asn Lys

WO 02/42455 24/30 PCT/EP01/13663

210 215 220

tgc aag aag atg ccc tct gaa tcc ctg ctg tcc cca ttg gaa tac atc 720
 Cys Lys Lys Met Pro Ser Glu Ser Leu Leu Ser Pro Leu Glu Tyr Ile
 225 230 235 240

gcc ata gca gcc ata tcc aaa ata ttc gct gta gca gta aca tac ccc 768
 Ala Ile Ala Ala Ile Ser Lys Ile Phe Ala Val Ala Val Thr Tyr Pro
 245 250 255

tat cag gtg gtc cgc gct cgc ctg cag gac cag cac aac aac tac agt 816
 Tyr Gln Val Val Arg Ala Arg Leu Gln Asp Gln His Asn Asn Tyr Ser
 260 265 270

gga ata gtg gat gtc atg aga agg acc tgg agc aac gaa ggg gtg gag 864
 Gly Ile Val Asp Val Met Arg Arg Thr Trp Ser Asn Glu Gly Val Glu
 275 280 285

ggc ttt tac aaa ggg atg gtg cca aac ctg gtc cga gtc att cct gcg 912
 Gly Phe Tyr Lys Gly Met Val Pro Asn Leu Val Arg Val Ile Pro Ala
 290 295 300

tgc tgc atc acc ttc ctg gtg ttc gaa aat gtg tca cgc ttg ctt ttg 960
 Cys Cys Ile Thr Phe Leu Val Phe Glu Asn Val Ser Arg Leu Leu Leu
 305 310 315 320

ggc gag tat cac taa 975
 Gly Glu Tyr His

<210> 52
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Danio rerio

<400> 52
 Met Thr Ala Thr Ile Ser Arg Gln Arg His Ala Ala Val Ala Ala Asp
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Ser Ser Phe Ser Ile Thr Ala Asn Leu Leu Gln Leu Ser
 20 25 30

Lys His Ile Lys Tyr Glu Asn Leu Ala Ala Gly Leu Ala Gly Gly Val
 35 40 45

Ile Ser Thr Met Val Leu His Pro Leu Asp Leu Ile Lys Ile Arg Phe
 50 55 60

Ala Val Ser Asp Gly Leu Lys Met Arg Pro Gln Tyr Asp Gly Met Leu
 65 70 75 80

Asp Cys Met Lys Thr Ile Trp Lys Leu Glu Gly Ile Arg Gly Leu Tyr
 85 90 95

Gln Gly Val Thr Pro Asn Ile Trp Gly Ala Gly Ser Ser Trp Gly Leu
 100 105 110

Tyr Phe Leu Phe Tyr Asn Ala Ile Lys Ala Tyr Thr Gln Glu Gly Arg
 115 120 125

Gln Thr Glu Leu Ser Ala Cys Glu His Leu Val Ser Ala Ala Glu Ala
 130 135 140

WO 02/42455

25/30

PCT/EP01/13663

Gly Ile Leu Thr Leu Cys Leu Thr Asn Pro Val Trp Val Thr Lys Thr
 145 150 155 160

Arg Leu Val Leu Gln Tyr Asn Ala Asp Pro Ser Arg Lys Gln Tyr Lys
 165 170 175

Gly Met Met Asp Ala Leu Val Lys Ile Tyr Arg His Glu Gly Ile Pro
 180 185 190

Gly Leu Tyr Arg Gly Phe Val Pro Gly Leu Val Gly Thr Ser His Ala
 195 200 205

Ala Leu Gln Phe Met Thr Tyr Glu Gly Leu Lys Arg Glu Gln Asn Lys
 210 215 220

Cys Lys Lys Met Pro Ser Glu Ser Leu Leu Ser Pro Leu Glu Tyr Ile
 225 230 235 240

Ala Ile Ala Ala Ile Ser Lys Ile Phe Ala Val Ala Val Thr Tyr Pro
 245 250 255

Tyr Gln Val Val Arg Ala Arg Leu Gln Asp Gln His Asn Asn Tyr Ser
 260 265 270

Gly Ile Val Asp Val Met Arg Arg Thr Trp Ser Asn Glu Gly Val Glu
 275 280 285

Gly Phe Tyr Lys Gly Met Val Pro Asn Leu Val Arg Val Ile Pro Ala
 290 295 300

Cys Cys Ile Thr Phe Leu Val Phe Glu Asn Val Ser Arg Leu Leu Leu
 305 310 315 320

Gly Glu Tyr His

<210> 53
 <211> 969
 <212> DNA
 <213> Drosophila melanogaster

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(969)

<400> 53
 atg aat ccg atc aag gca cag tca acg ggc agt ccc aag aaa ttc aac 48
 Met Asn Pro Ile Lys Ala Gln Ser Thr Gly Ser Pro Lys Lys Phe Asn
 1 5 10 15

gta ttc gca cac gtc aag tac gag cat ttg gtt gcc gga gta tcc ggc 96
 Val Phe Ala His Val Lys Tyr Glu His Leu Val Ala Gly Val Ser Gly
 20 25 30

gga gtg gtg tcc aca ctc att cta cat ccc ctg gat ttg atc aag att 144
 Gly Val Val Ser Thr Leu Ile Leu His Pro Leu Asp Leu Ile Lys Ile
 35 40 45

cga ttc gca gtt aac gat ggc cgg aca got acg gtg ccg caa tac cgg 192
 Arg Phe Ala Val Asn Asp Gly Arg Thr Ala Thr Val Pro Gln Tyr Arg
 50 55 60

WO 02/42455	26/30	PCT/EP01/13663
gga ctg agc agc gcc ttc acc acg att ttc cgg caa gag ggc ttc cgc Gly Leu Ser Ser Ala Phe Thr Thr Ile Phe Arg Gln Glu Gly Phe Arg 65 70 75 80		240
gga ctc tac aaa ggc gtc acc ccc aat gtc tgg gga tcg ggc tcc tct Gly Leu Tyr Lys Gly Val Thr Pro Asn Val Trp Gly Ser Gly Ser Ser 85 90 95		288
tgg ggc ctg tac ttc atg ttc tac aac acc att aag aca ttt atc caa Trp Gly Leu Tyr Phe Met Phe Tyr Asn Thr Ile Lys Thr Phe Ile Gln 100 105 110		336
gga gga aac acg acc atg cca ttg ggc ccc aca atg aac atg ctt gca Gly Gly Asn Thr Thr Met Pro Leu Gly Pro Thr Met Asn Met Leu Ala 115 120 125		384
gct gct gag tcg gga att ctc acc ctg ctg ctg acc aac ccc atc tgg Ala Ala Glu Ser Gly Ile Leu Thr Leu Leu Leu Thr Asn Pro Ile Trp 130 135 140		432
gtg gtg aag acg cgt ctc tgc ctg cag tgc gat gcc gcg agt agt gcc Val Val Lys Thr Arg Leu Cys Leu Gln Cys Asp Ala Ala Ser Ser Ala 145 150 155 160		480
gag tac agg ggc atg atc cac gcc ttg ggc cag ata tac aag gag gag Glu Tyr Arg Gly Met Ile His Ala Leu Gly Gln Ile Tyr Lys Glu Glu 165 170 175		528
gga atc cgt ggc ctg tac cgc gcc ttt gtt ccc gcc atg ttg ggc gtc Gly Ile Arg Gly Leu Tyr Arg Gly Phe Val Pro Gly Met Leu Gly Val 180 185 190		576
tcc cac gga gcc atc cag ttc atg acc tac gag gag ctg aag aac gcc Ser His Gly Ala Ile Gln Phe Met Thr Tyr Glu Glu Leu Lys Asn Ala 195 200 205		624
tac aac gaa tat cgc aaa ctg ccc atc gac acg aag ctg gcc acc acc Tyr Asn Glu Tyr Arg Lys Leu Pro Ile Asp Thr Lys Leu Ala Thr Thr 210 215 220		672
gag tac ttg gcc ttc gcg gct gtc tcc aag ctg atc gca gcg gcg gcc Glu Tyr Leu Ala Phe Ala Ala Val Ser Lys Leu Ile Ala Ala Ala Ala 225 230 235 240		720
acc tac ccg tac cag gtg gtc cgg gca cgg ctg cag gac cac cat cac Thr Tyr Pro Tyr Gln Val Val Arg Ala Arg Leu Gln Asp His His His 245 250 255		768
cga tac aac ggc acc tgg gac tgc atc aaa cag act tgg agg ttt gag Arg Tyr Asn Gly Thr Trp Asp Cys Ile Lys Gln Thr Trp Arg Phe Glu 260 265 270		816
ggc tac aga ggc ttc tac aag ggg ctg aag gcg agt tta acc cga gta Gly Tyr Arg Gly Phe Tyr Lys Gly Leu Lys Ala Ser Leu Thr Arg Val 275 280 285		864
gtg cct gcc tgc atg gtc acc ttt ctg gtg tac gag aac gtc tcg cat Val Pro Ala Cys Met Val Thr Phe Leu Val Tyr Glu Asn Val Ser His 290 295 300		912
ttc ctg ctc gcc agg cgg aag cga att gag act aaa gag gat gcg tcg Phe Leu Leu Ala Arg Arg Lys Arg Ile Glu Thr Lys Glu Asp Ala Ser 305 310 315 320		960

WO 02/42455 27/30 PCT/EP01/13663

305 310 315 320

gac gtg tga 969
Asp Val

<210> 54
<211> 322
<212> PRT
<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 54
Met Asn Pro Ile Lys Ala Gln Ser Thr Gly Ser Pro Lys Lys Phe Asn
1 5 10 15
Val Phe Ala His Val Lys Tyr Glu His Leu Val Ala Gly Val Ser Gly
20 25 30
Gly Val Val Ser Thr Leu Ile Leu His Pro Leu Asp Leu Ile Lys Ile
35 40 45
Arg Phe Ala Val Asn Asp Gly Arg Thr Ala Thr Val Pro Gln Tyr Arg
50 55 60
Gly Leu Ser Ser Ala Phe Thr Thr Ile Phe Arg Gln Glu Gly Phe Arg
65 70 75 80
Gly Leu Tyr Lys Gly Val Thr Pro Asn Val Trp Gly Ser Gly Ser Ser
85 90 95
Trp Gly Leu Tyr Phe Met Phe Tyr Asn Thr Ile Lys Thr Phe Ile Gln
100 105 110
Gly Gly Asn Thr Thr Met Pro Leu Gly Pro Thr Met Asn Met Leu Ala
115 120 125
Ala Ala Glu Ser Gly Ile Leu Thr Leu Leu Thr Asn Pro Ile Trp
130 135 140
Val Val Lys Thr Arg Leu Cys Leu Gln Cys Asp Ala Ala Ser Ser Ala
145 150 155 160
Glu Tyr Arg Gly Met Ile His Ala Leu Gly Gln Ile Tyr Lys Glu Glu
165 170 175
Gly Ile Arg Gly Leu Tyr Arg Gly Phe Val Pro Gly Met Leu Gly Val
180 185 190
Ser His Gly Ala Ile Gln Phe Met Thr Tyr Glu Glu Leu Lys Asn Ala
195 200 205
Tyr Asn Glu Tyr Arg Lys Leu Pro Ile Asp Thr Lys Leu Ala Thr Thr
210 215 220
Glu Tyr Leu Ala Phe Ala Ala Val Ser Lys Leu Ile Ala Ala Ala Ala
225 230 235 240
Thr Tyr Pro Tyr Gln Val Val Arg Ala Arg Leu Gln Asp His His His
245 250 255
Arg Tyr Asn Gly Thr Trp Asp Cys Ile Lys Gln Thr Trp Arg Phe Glu
260 265 270
Gly Tyr Arg Gly Phe Tyr Lys Gly Leu Lys Ala Ser Leu Thr Arg Val
275 280 285
Val Pro Ala Cys Met Val Thr Phe Leu Val Tyr Glu Asn Val Ser His
290 295 300
Phe Leu Leu Ala Arg Arg Lys Arg Ile Glu Thr Lys Glu Asp Ala Ser
305 310 315 320
Asp Val

<210> 55
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primers

WO 02/42455	28/30	PCT/EP01/13663
<400> 55 atggactacg gggactttat caa		23
<210> 56 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: PCR primers		
<400> 56 accgagcct tctttccaac t		21
<210> 57 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: PCR primers		
<400> 57 ggcggccact acatcacg		18
<210> 58 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: PCR primers		
<400> 58 tgctcaaga acatagactg		20
<210> 59 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: PCR primers		
<400> 59 atgaccgcta ccatttcag gcagaggcac		30
<210> 60 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: PCR primers		
<400> 60 ttagtgatac tcgccccaaa gcaagcgtga		30

WO 02/42455

29/30

PCT/EP01/13663

<210> 61
<211> 22
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 61
Phe Tyr Lys Gly Leu Lys Ala Ser Leu Thr Arg Val Val Pro Ala Cys
1 5 10 15

Met Val Thr Phe Leu Val
20

<210> 62
<211> 24
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 62
Gly Phe Tyr Lys Gly Leu Lys Ala Ser Leu Thr Arg Val Val Pro Ala
1 5 10 15

Cys Met Val Thr Phe Leu Val Tyr
20

<210> 63
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mSOUP gene
specific primer

<400> 63
ggcggccact acatcacg 18

<210> 64
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mSOUP gene
specific primer

<400> 64
ctacttgta tcatcgctct ttagtcgct cactttcttt ttctt 45

<210> 65
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mSOUP gene
specific primer

WO 02/42455	30/30	PCT/EP01/13663
<400> 65 ctctgtcgca ggcgtatcc		19
<210> 66 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: mSOUP gene specific primer		
<400> 66 gaaggcgggc tctcacaac		19
<210> 67 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: mSOUP gene specific primer		
<400> 67 aatatttgcc gtagcagcaa catacccg		29
<210> 68 <211> 18 <212> PRT <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide		
<400> 68 Cys Tyr Glu Asn Val Ser His Phe Leu Tyr Asp Leu Arg Glu Lys Lys 1 5 10 15		
Val Ser		

【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
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/042455 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/47, 14/46, 14/435, C12N 5/10, 15/62, C07K 16/18, C12Q 1/68, A61K 38/00, 39/00, A01K 67/027, 67/033, G01N 33/50, 33/53
- (21) International Application Number: PCT/EP01/13663
- (22) International Filing Date: 23 November 2001 (23.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00125693.2 23 November 2000 (23.11.2000) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): DEVELOGEN AG FÜR ENTWICKLUNGSBIOLOGISCHE FORSCHUNG [DE/DE]; Rudolf-Wissell-Strasse 28, 37079 Göttingen (DE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): STEUERNAGEL, Arnd [DE/DE]; Am Kirschberge 4, 37085 Göttingen (DE). BRÖNNER, Günter [DE/DE]; Springstr. 54, 37077 Göttingen (DE). DOHRMANN, Cord [DE/DE]; Am Menzelberg 8, 37077 Göttingen (DE). CLOSSEK, Thomas [DE/DE]; Kieseestrasse 49a, 37083 Göttingen (DE). WEHR, Roland [DE/DE]; Ludwig-Beck-Strasse 17, 37075 Göttingen (DE). RUDOLPH, Bettina [DE/DE]; Bodekerstrasse 29, 30161 Hannover (DE). RUDOLPH,
- (74) Agents: WEICKMANN & WEICKMANN et al.; Postfach 860 820, 81635 München (DE).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 31 October 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MODIFIER OF ORGANELLAR METABOLISM

(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid molecule encoding a polypeptide contributing to membrane stability and/or function of organelles, wherein said nucleic acid molecule (a) hybridizes under herein defined conditions to the complementary strand of a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence disclosed herein; (b) hybridizes under herein defined conditions to the complementary strand of a nucleic acid molecule as depicted herein; (c) it is degenerate with respect to the nucleic acid molecule of (a); (d) encodes a polypeptide which comprises at least one, preferably at least two, more preferably at least three, more preferably at least four, more preferably at least five and most preferably six amino acid sequences being part of the polypeptide contributing to membrane stability and/or function of organelles and comprising putative transmembrane region; (e) encodes a polypeptide which is at least 85%, preferably at least 90%, more preferably at least 95%, more preferably at least 98% and up to 99.6% identical to an amino acid sequence representing the above described polypeptide; (g) encodes a polypeptide which is at least 35%, preferably at least 50%, more preferably at least 60%, more preferably at least 70% more preferably at least 80%, more preferably at least 90%, most preferably at least 95% and most preferably at least 99% identical to the amino acid sequence as disclosed herein; (h) differs from the nucleic acid molecule of (a) to (g) by mutation and wherein said mutation causes an alteration, deletion, duplication or premature stop in the encoded polypeptide; or (i) has a sequence as disclosed herein.

WO 02/042455 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No. PCT/EP 01/13663	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K14/435 C12N5/10 C12N15/62 C07K16/18 C12Q1/68 A61K38/00 A61K39/00 A01K67/027 A01K67/033 G01N33/50 G01N33/53					
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A01K					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBL					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] Preliminary: PRT; 360 AA, 1 May 2000 (2000-05-01) ADAMS M. ET AL.: "CG8026 protein" Database accession no. Q9V551 XP002205574 the whole document				1,2, 10-13
X	DATABASE EMBL [Online] standard: DNA; HTG; 51430 bp, 14 December 1999 (1999-12-14) ADAMS M. ET AL.: "Drosophila melanogaster, WORKING DRAFT SEQUENCE, in ordered pieces." Database accession no. AC017981 XP002205575 the whole document				1,2,10, 11
--- ~/--					
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☐ 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 claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search 1 August 2002			Date of mailing of the international search report 12. 08. 2002		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Kools, P		

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/13663

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] standard; RNA; EST; 731 bp, 17 November 1999 (1999-11-17) SUGANO ET AL.: "fi40c12.y1 Sugano Kawakami zebrafish DRA Danio rerio cDNA clone 2640118 5' similar to WP:K01C8.7 CE02268 MITOCHONDRIAL CARRIER PROTEINS; mRNA sequence" Database accession no. AW174196 XP002205576 the whole document	1-5, 10-13
X	--- TITUS S. AND MORAN R.: "Retrovirally Mediated Complementation of the glyB Phenotype" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, PAPERS IN PRESS, vol. 275, no. 47, 7 September 2000 (2000-09-07), pages 36811-36817, XP002205572 USA DOI 10.1074/jbc.M005163200, 7-9-2000 the whole document -& DATABASE EMBL [Online] standard; RNA; HUM; 2534 bp, TITUS S. AND MORAN R.: "Homo sapiens folate transporter/carrier mRNA, complete cds; nuclear gene for mitochondrial product" XP002174537 the whole document	1-5, 10-13
X	--- DATABASE EMBL [Online] standard; cDNA; 2676 bp, RUBEN S.M ET AL.: "Human uncoupling protein cDNA#8" Database accession no. AAC90459 XP002205577 the whole document -& WO 00 61614 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;NI JIAN (US); ROSEN CRAIG A (US); RUBEN) 19 October 2000 (2000-10-19) claim 1	1-5, 10-13
A	--- RICQUIER DANIEL ET AL.: "The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP" BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 345, no. 2, 15 January 2000 (2000-01-15), pages 161-179, XP002180562 ISSN: 0264-6021 cited in the application the whole document	1-67
	--- -/--	

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/13663

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROQUES B P.: "PEPTIDOMIMETICS AS RECEPTORS AGONISTS OR PEPTIDASE INHIBITORS: A STRUCTURAL APPROACH IN THE FIELD OF ENKELPHALINS, ANP AND CCK" BIOPOLYMERS, NEW YORK, NY, US, vol. 32, no. 4, April 1992 (1992-04), pages 407-410, XP001041605 ISSN: 0006-3525 the whole document	53-55
P,X	--- DATABASE EMBL [Online] standard; cDNA; 2357 bp, OTA T. ET AL.: "Human cDNA sequence SEQ ID NO: 14686" Database accession no. AAH16028 XP002205578 the whole document -& EP 1 074 617 A (HELIX RES INST.) 7 February 2001 (2001-02-07) Seq ID No 14686 claim 8	1-5, 10-13
P,X	--- DATABASE EMBL [Online] standard; Protein; 315 AA, OTA T. ET AL.: "Human protein sequence SEQ ID NO:14687" Database accession no. AAB94269 XP002205579 the whole document -& EP 1 074 617 A (HELIX RES INST.) 7 February 2001 (2001-02-07) Seq ID No 14687 claim 8	1-5, 10-13
P,X	--- DATABASE EMBL [Online] standard DNA; HUM; 3599 bp, YUE ET AL.: "Sequence 14 from Patent WO0162923" Database accession no. AX230560 XP002205580 the whole document -& WO 01 62923 A (HERNANDEZ ROBERTO ;INCYTE GENOMICS INC (US); PATTERSON CHANDRA (US) 30 August 2001 (2001-08-30) Seq ID No 14 claim 11	1-5, 10-13
T	--- HANAK P. AND JEZEK P.: "Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis - UCP4 as the ancestral uncoupling protein" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE B.V., vol. 495, 28 March 2001 (2001-03-28), pages 137-141, XP002205573 Amsterdam the whole document -----	1-67

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/13663
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☒	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.	☒	Claims Nos.: partial: 16, 21-33, 52-63, 67 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
1.	☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/EP 01/13663

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 28, 30, 31 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 29-31 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: partial: 16, 21-33, 52-63, 67

Present claims 16, 21-33, and 67 relate to "another receptor" defined by reference to a desirable characteristic or property, namely recognizing the polypeptide and/or polynucleotide of the invention.

Present claims 52-57 and 63 relate to agents defined by reference to a desirable characteristic or property, namely having an effect on the binding of other agents to the polypeptide of the invention or have an influence on the expression of the polynucleotide or activity of the polypeptide of the invention.

Present claims 58-62 relate to an inhibitor and/or stimulator defined by reference to a desirable characteristic or property, namely having an effect on the polypeptide or expression of the gene, encoding said polypeptide of the present invention.

The claims cover all "another receptor", agents, inhibitors and stimulators having said characteristics or properties, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for just a limited number of such "another receptor", agents, inhibitors and stimulators. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the "another receptor", agents, inhibitors and stimulators by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the methods of obtaining said "another receptor", agents, inhibitors and stimulators. In addition, claims have been searched for specific binding antibodies, anti-sense oligonucleotides, hybridization probes and amplification primers.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a

International Application No. PCT/EP 01/13663

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/13663

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0061614	A	19-10-2000	AU 4073600 A	14-11-2000
			AU 4081000 A	14-11-2000
			AU 4451300 A	14-11-2000
			EP 1198474 A1	24-04-2002
			EP 1175440 A1	30-01-2002
			WO 0061625 A1	19-10-2000
			WO 0061774 A2	19-10-2000
			WO 0061614 A2	19-10-2000

EP 1074617	A	07-02-2001	AU 6180800 A	19-02-2001
			AU 6180900 A	19-02-2001
			AU 6181000 A	19-02-2001
			AU 6181100 A	19-02-2001
			AU 6181200 A	19-02-2001
			AU 6181300 A	19-02-2001
			AU 6181400 A	19-02-2001
			AU 6181500 A	19-02-2001
			AU 6181600 A	19-02-2001
			AU 6315800 A	19-02-2001
			EP 1074617 A2	07-02-2001
			EP 1205549 A1	15-05-2002
			WO 0109315 A1	08-02-2001
			WO 0109345 A1	08-02-2001
			WO 0109316 A1	08-02-2001
			WO 0109349 A1	08-02-2001
			WO 0109317 A1	08-02-2001
			WO 0109318 A1	08-02-2001
			WO 0109319 A1	08-02-2001
			WO 0109346 A1	08-02-2001
			WO 0109320 A1	08-02-2001
			WO 0109321 A1	08-02-2001
			WO 0109322 A1	08-02-2001
			WO 0109323 A1	08-02-2001
			JP 2002171977 A	18-06-2002

WO 0162923	A	30-08-2001	AU 3986001 A	03-09-2001
			WO 0162923 A2	30-08-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D 4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N 4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
C 0 7 K 14/435	C 0 7 K 14/435	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 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 5/06	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 30/08	L
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 30/48	G
G 0 1 N 30/08	G 0 1 N 30/48	R
G 0 1 N 30/48	G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 30/88	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 N 5/00	E
	A 6 1 K 37/02	

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

(74)代理人 230100044

弁護士 ラインハルト・アインゼル

(72)発明者 アルント シュトイヤーナーゲル

ドイツ連邦共和国 ゲッティンゲン アム キルシュベルゲ 4

(72)発明者 ギュンター プレンナー

ドイツ連邦共和国 ゲッティンゲン シュプリングシュトラッセ 5 4

(72)発明者 コルト ドールマン

ドイツ連邦共和国 ゲッティンゲン アム メンツェルベルク 8

(72)発明者 トーマス チオゼック

ドイツ連邦共和国 ゲッティンゲン キースゼーシュトラッセ 49アー

(72)発明者 ローラント ヴェーア

ドイツ連邦共和国 ゲッティンゲン ルートヴィヒ - ベック - シュトラッセ 17

(72)発明者 ベッティナー ルドルフ

ドイツ連邦共和国 ハノーファー ベデッカーシュトラッセ 29

(72)発明者 ドロテア ルドルフ

ドイツ連邦共和国 ゲッティンゲン シラーシュトラッセ 40

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13 DA14
 DA36 DA77 FB02 FB03 FB06 GC07
 4B024 AA01 AA11 AA20 BA80 CA04 CA07 CA09 CA12 CA20 DA02
 GA11 HA11 HA13 HA14 HA17 HA20
 4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ61 QQ79 QQ89
 QR08 QR32 QR35 QR38 QR40 QR42 QR48 QR55 QR62 QR74
 QR80 QR84 QS16 QS25 QS31 QS33 QS34 QS36 QX01 QX02
 4B064 AG01 CA01 CA19 CC01 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA58X AA72X AA90X AA90Y AA91X AA91Y AB01 AC14 BA02
 BA30 CA24 CA43 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA44 CA53 NA14 ZA012 ZA662 ZA702
 ZC022 ZC332
 4C085 AA13 AA14 BB11 BB23 CC21 EE01
 4C086 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA66 ZA70 ZC02
 ZC33
 4C087 AA02 BC11 BC30 BC83 NA14 ZA01 ZA66 ZA70 ZC02 ZC33
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 CA51 DA50 DA75
 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004514435A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002545160	申请日	2001-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	德根的Vero毛皮股份公司进入维克Rungu扫描比奥低GI“外壳文件夹格哈德环		
申请(专利权)人(译)	Deverogen股份公司进入毛皮维克Rungu扫描比奥低GI“切斯Forushungu		
[标]发明人	アルントシュトイヤーナーゲル ギュンターブレナー コルトドールマン トーマスチオゼック ローラントヴェーア ベッティナルドルフ ドロテアルドルフ		
发明人	アルント シュトイヤーナーゲル ギュンター ブレナー コルト ドールマン トーマス チオゼック ローラント ヴェーア ベッティナ ルドルフ ドロテア ルドルフ		
IPC分类号	A01K67/027 A01K67/033 A61K31/7088 A61K35/66 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/18 A61P3/04 A61P3/06 A61P25/00 B01J20/281 C07K14/435 C07K14/ /46 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/ /10 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/62 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N30/08 G01N30/88 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N30/48		
CPC分类号	A01K67/0275 A01K67/0339 A01K2217/05 A01K2227/105 A01K2227/706 A01K2267/03 A61P1/18 A61P25/00 C07K14/43581 C07K14/461 C07K14/705 C07K2319/00 C07K2319/43 C12N2830/008		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A01K67/033.501 A61K31/7088 A61K35/66 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P1/18 A61P3/04 A61P3/06 A61P25/00 C07K14/435 C07K14/ /47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N30/08.L G01N30/48.G G01N30/48.R G01N30/88.J G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N5/00.A C12N5/00.B C12N5/00.E A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/ /DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/GC07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/ /CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/ /QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR38 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/ /QR80 4B063/QR84 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS31 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/ /DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/ /AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA30 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/ /CA53 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA662 4C084/ZA702 4C084/ZC022 4C084/ZC332 4C085/ /AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB23 4C085/CC21 4C085/EE01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA66 4C086/ZA70 4C086		

	/ZC02 4C086/ZC33 4C087/AA02 4C087/BC11 4C087/BC30 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA66 4C087/ZA70 4C087/ZC02 4C087/ZC33 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/CA51 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74
代理人(译)	矢野俊夫
优先权	2000125693 2000-11-23 EP
其他公开文献	JP4375960B2 JP2004514435A

摘要(译)

本发明提供了编码参与细胞器膜稳定性和/或功能的多肽的核酸分子，其中该核酸分子是 (a) 在限定条件下与编码本发明公开的氨基酸序列的核酸分子的互补链杂交； (b) 在本发明限定条件下的本发明限定的核酸分子的互补链 在以下条件下杂交； (c) 相对于 (a) 的核酸分子是简并的； (d) 是涉及膜稳定性和/或细胞器功能的多肽的一部分，并推测 至少一个，优选至少2个，更优选至少3个，特别优选至少4个，非常优选至少5个，最优选至少包含一个跨膜结构域区域。(E) 至少85%，优选至少90%，更优选至少95%，特别优选至少98%的氨基酸序列代表具有6个氨基酸序列的多肽。和 编码与本发明公开的氨基酸序列同源的多肽，其与99.6%； (g) 至少35%，优选至少50%，更优选至少60%，特别优选至少70%， 优选至少80%，特别优选至少90%，更优选至少95%，最优选至少99%同源多肽； (h) 通过突变的 (a) - (g) 的核酸。与分子不同的是，该突变导致编码的多肽发生变化，缺失，重复或过早终止；或 (i) 以具有本发明公开的序列为特征， 编码参与细胞器膜稳定性和/或功能的多肽的核酸分子。