

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 527831

(P2003 - 527831A)

(43)公表日 平成15年9月24日(2003.9.24)

| (51) Int.Cl <sup>7</sup> | 識別記号 | F I             | テ-マコード ( 参考 ) |
|--------------------------|------|-----------------|---------------|
| C 1 2 N 15/09            | ZNA  | A 6 1 K 31/7088 | 4 B 0 2 4     |
| A 6 1 K 31/7088          |      | 39/395          | D 4 B 0 6 3   |
| 38/00                    |      | 48/00           | 4 B 0 6 4     |
| 39/395                   |      | A 6 1 P 3/04    | 4 B 0 6 5     |
| 48/00                    |      | 3/06            | 4 C 0 8 4     |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全191数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 528588(P2001 - 528588)

(86)(22)出願日 平成12年10月5日(2000.10.5)

(85)翻訳文提出日 平成14年4月4日(2002.4.4)

(86)国際出願番号 PCT/US00/41077

(87)国際公開番号 W001/025436

(87)国際公開日 平成13年4月12日(2001.4.12)

(31)優先権主張番号 60/157,786

(32)優先日 平成11年10月5日(1999.10.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/164,164

(32)優先日 平成11年11月9日(1999.11.9)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 キュラジェン コーポレイション  
アメリカ合衆国 コネチカット州 06511  
ニュー ハイブン ロング ウォーフ ド  
ライブ 555

(72)発明者 ブラヤーガ, スーディルダス ケイ.  
アメリカ合衆国 コネチカット 06512,  
イースト ハイブン, ミル ストリート  
140, アパートメント 18 - 136

(72)発明者 シムケッツ, リチャード エイ.  
アメリカ合衆国 コネチカット 06516,  
ウエスト ハイブン, リート ストリート  
191

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

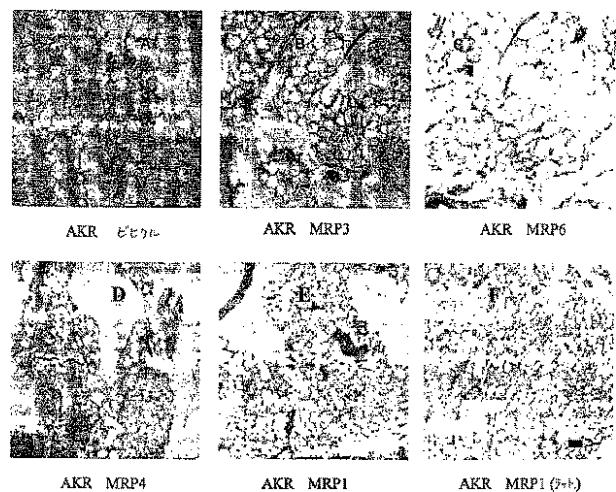
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エンドゼピン様ポリペプチドおよびエンドゼピン様ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(57)【要約】

エンドゼピン様ポリペプチドをコードする新規のヒト核酸配列が、本明細書中で開示される。これらの核酸配列によってコードされるポリペプチド、およびこのポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体、ならびに上述のポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体の誘導体、改変体、変異体、またはフラグメントもまた開示される。本発明はさらに、この新規のヒトエンドゼピン様核酸およびタンパク質を含む、障害の診断、処置、および予防のための、治療学的方法、診断的方法、および研究方法をさらに開示する。

腸間膜脂肪



**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** 単離されたポリペプチドであって、以下：

- (a) 配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49からなる群から選択される、アミノ酸配列の成熟形態；
- (b) 配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49からなる群から選択されるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、該改変体が該成熟形態のアミノ酸配列と15%以下のアミノ酸残基で異なる条件で、該改変体における1つ以上のアミノ酸残基が、該成熟形態のアミノ酸配列と異なる、アミノ酸配列の成熟形態の改変体；
- (c) 配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49からなる群から選択されるアミノ酸配列；ならびに
- (d) 配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49からなる群から選択されるアミノ酸配列の改変体であって、該改変体が該アミノ酸配列とアミノ酸残基の15%以下で異なる条件で、該改変体における1つ以上のアミノ酸残基が該成熟形態のアミノ酸配列と異なる、アミノ酸配列の改変体、
- からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

**【請求項2】** 請求項1に記載のポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49からなる群から選択されるアミノ酸配列の天然に存在する対立遺伝子改変体のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

**【請求項3】** 請求項2に記載のポリペプチドであって、前記対立遺伝子改変体が、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46、および48からなる群から選択される核酸配列と単一ヌクレオチドが異なる核酸

配列の翻訳であるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項4】 前記改変体のアミノ酸配列が保存的なアミノ酸置換を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項5】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49からなる群から選択される、アミノ酸配列の成熟形態；

(b) 配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49からなる群から選択されるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、該改変体が該成熟形態のアミノ酸配列とアミノ酸残基の15%以下で異なる条件で、該改変体における1つ以上のアミノ酸残基が、該成熟形態のアミノ酸配列と異なる、アミノ酸配列の成熟形態の改変体；

(c) 配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49からなる群から選択されるアミノ酸配列；

(d) 配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49からなる群から選択されるアミノ酸配列の改変体であって、該改変体が該アミノ酸配列とアミノ酸残基の15%以下で異なる条件で、該改変体における1つ以上のアミノ酸残基が、該成熟形態のアミノ酸配列と異なる、アミノ酸配列の改変体、

(e) 配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの少なくとも一部または該ポリペプチドの改変体をコードする核酸フラグメント、であって、該改変体が該アミノ酸配列とアミノ酸残基の15%以下で異なる条件で、該改変体における1つ以上のアミノ酸残基が、該成熟形態のアミノ酸配列と異なる、核酸フラグメント、

(f)(a)、(b)、(c)、(d)または(e)の相補体を含む核酸分子、からなる群から選択される、アミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項6】 前記核酸分子が天然に存在する対立遺伝子核酸改変体のヌクレオチド配列を含む、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項7】 前記核酸分子が天然に存在するポリペプチド改変体のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項8】 請求項5に記載の核酸分子であって、前記核酸分子が配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46、および48からなる群から選択される核酸配列と単一のヌクレオチドが異なる、核酸分子。

【請求項9】 請求項5に記載の核酸分子であって、前記核酸分子が、以下：

(a) 配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46、および48からなる群から選択される、ヌクレオチド配列、

(b) ヌクレオチド配列であって、ヌクレオチドの20%以下が配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46、および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列と異なる条件で、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46、および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列と1つ以上のヌクレオチドが異なる、ヌクレオチド配列、

(c) (a)の核酸フラグメント；および

(d) (b)の核酸フラグメント

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項10】 請求項5に記載の核酸分子であって、前記核酸分子が、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46、および48からなる群から選択されるヌクレオチド配列、または該ヌクレオチド配列の相補体にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、核酸分子。

【請求項11】 請求項5に記載の核酸分子であって、前記核酸分子が、以下：

(a) 第1のヌクレオチド配列であって、該第1のヌクレオチド配列におけるコ

ード配列のヌクレオチドの20%以下が該コード配列と異なる条件で、該第1のヌクレオチド配列が、前記アミノ酸配列をコードするコード配列と1つ以上のヌクレオチド配列が異なるコード配列を含む、第1のヌクレオチド配列；

(b) 該第1のポリヌクレオチドの相補体である単離された第2のポリヌクレオチド；ならびに

(c) (a) または (b) の核酸フラグメント

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項12】 請求項11に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項13】 前記核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項12に記載のベクター。

【請求項14】 請求項12に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項15】 請求項1に記載のポリペプチドに免疫特異的に結合する、抗体。

【請求項16】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項15に記載の抗体。

【請求項17】 前記抗体がヒト化抗体である、請求項15に記載の抗体。

【請求項18】 サンプル中の請求項1に記載のポリペプチドの存在または量を決定するための方法であって、該方法が、以下：

(a) 該サンプルを提供する工程；

(b) 前記ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体とサンプルを接触させる工程；および

(c) 前記ポリペプチドに結合された抗体の存在または量を決定する工程であって、それにより、該サンプル中のポリペプチドの存在または量を決定する、工程を包含する、方法。

【請求項19】 サンプル中の請求項5に記載の核酸分子の存在または量を決定するための方法であって、該方法が、以下：

(a) 該サンプルを提供する、工程；

(b) 該核酸分子に結合するプローブと該サンプルを接触させる工程；および

(c) 該核酸分子に結合されたプローブの存在または量を決定する工程であって

、それにより、該サンプル中の核酸分子の存在または量を決定する、工程を包含する、方法。

【請求項20】 前記核酸分子の存在または量が細胞または組織型のマーカーとして使用される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記細胞または組織型が癌性である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 請求項1に記載のポリペプチドに結合する因子を同定するための方法であって、該方法が、以下：

(a) 該因子を該ポリペプチドと接触させる工程；および

(b) 該因子が該ポリペプチドに結合するか否かを決定する、工程、を包含する、方法。

【請求項23】 前記因子が細胞性レセプターまたは下流エフェクターである、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 請求項1に記載のポリペプチドの発現または活性を調節する因子を同定するための方法であって、該方法が、以下：

(a) 該ポリペプチドを発現する細胞を提供する工程；

(b) 該因子と該細胞を接触させる工程；および

(c) 該因子が該ポリペプチドの発現または活性を調節するか否かを決定する工程であって、それにより、該ペプチドの発現または活性における変更が、該ポリペプチドの発現または活性を調節する該因子を示す、工程を包含する、方法。

【請求項25】 請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節するための方法であって、該方法が、該ポリペプチドの活性を調節するに十分な量で、該ポリペプチドに結合する化合物と、請求項1に記載のポリペプチドを発現する細胞サンプルとを接触させる工程を包含する、方法。

【請求項26】 E N D O X 関連障害を処置または予防するための方法であって、該方法が、被験体における該 E N D O X 関連障害を処置または予防するために十分な量で、請求項1に記載のポリペプチドを、このような処置または予防が所望される該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項27】 請求項26に記載の方法であって、前記障害が、糖尿病、肥満に関連した代謝障害、代謝性症候群X、節食障害、慢性疾患に関連した消耗性疾患、癌、癌関連悪液質、および異脂肪血症からなる群から選択される、方法。

【請求項28】 請求項26に記載の方法であって、前記障害が、脂肪の貯蔵、筋肉質量、インスリン分泌、グルコース利用およびトリグリセリドおよびコレステロールを含む血清脂質レベルをもたらす生物体エネルギー代謝に関連する、方法。

【請求項29】 前記被験体がヒトである、請求項26に記載の方法。

【請求項30】 ENDOX関連障害を処置または予防するための方法であって、該方法が、被験体における該ENDOX関連障害を処置または予防するために十分な量で、請求項5に記載の核酸を、このような処置または予防が所望される該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項31】 請求項30に記載の方法であって、前記障害が、糖尿病、肥満に関連した代謝障害、代謝性症候群X、節食障害、慢性疾患に関連した消耗性疾患、癌、癌関連悪液質、および異脂肪血症からなる群から選択される、方法。

【請求項32】 請求項30に記載の方法であって、前記障害が、脂肪の貯蔵、筋肉質量、インスリン分泌、グルコース利用およびトリグリセリドおよびコレステロールを含む血清脂質レベルをもたらす生物体エネルギー代謝に関連する、方法。

【請求項33】 前記被験体がヒトである、請求項30に記載の方法。

【請求項34】 ENDOX関連障害を処置または予防するための方法であって、該方法が、被験体における該ENDOX関連障害を処置または予防するために十分な量で、請求項15に記載の抗体を、このような処置または予防が所望される該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項35】 請求項34に記載の方法であって、前記障害が、糖尿病、肥満に関連した代謝障害、代謝性症候群X、節食障害、慢性疾患に関連した消耗性疾患、癌、癌関連悪液質、および異脂肪血症からなる群から選択される、方法。

。

【請求項36】 請求項34に記載の方法であって、前記障害が、脂肪の貯蔵、筋肉質量、インスリン分泌、グルコース利用およびトリグリセリドおよびコレステロールを含む血清脂質レベルをもたらす生物体エネルギー代謝に関連する、方法。

【請求項37】 前記被験体がヒトである、請求項34に記載の方法。

【請求項38】 請求項1に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項39】 請求項5に記載の核酸分子および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項40】 請求項15に記載の抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項41】 請求項38に記載の薬学的組成物を、1つ以上のコンテナに含む、キット。

【請求項42】 請求項39に記載の薬学的組成物を、1つ以上のコンテナに含む、キット。

【請求項43】 請求項40に記載の薬学的組成物を、1つ以上のコンテナに含む、キット。

【請求項44】 第1の哺乳動物被験体において、請求項1に記載のポリペプチドの変更されたレベルに関連した疾患の存在または疾患に対する素因を決定するための方法であって、該方法が、以下：

(a) 該第1の哺乳動物被験体由来のサンプル中のポリペプチドの発現のレベルを測定する工程；および

(b) 工程(a)の該サンプル中の該ポリペプチドの量を、該疾患を有していないか、または該疾患の素因を有していないことが公知の第2の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該ポリペプチドの量と比較する工程；を包含し、ここで、該コントロールサンプルと比較した該第1の被験体における該ポリペプチドの発現レベルにおける変更が、該疾患の存在または該疾患に対する素因の存在を示す、方法。

【請求項45】 前記素因が癌に対する素因である、請求項44に記載の方法。

【請求項46】 第1の哺乳動物被験体において、請求項5に記載の核酸分子の変更されたレベルに関連した疾患の存在または疾患に対する素因を決定するための方法であって、該方法が、以下：

(a) 該第1の哺乳動物被験体由来のサンプル中の該核酸の量を測定する工程；  
および

(b) 工程(a)の該サンプル中の該核酸の量を、該疾患を有していないか、または該疾患の素因を有していないことが公知の第2の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該核酸の量と比較する工程；

を包含し、ここで、該コントロールサンプルと比較した該第1の被験体における該核酸のレベルにおける変更が、該疾患の存在または該疾患に対する素因の存在を示す、方法。

【請求項47】 前記素因が癌に対する素因である、請求項46に記載の方法。

【請求項48】 哺乳動物における病理学的状態を処置するための方法であって、該方法が、病理学的状態を軽減するために十分な量で、ポリペプチドを哺乳動物に投与する工程を包含し、該ポリペプチドが、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはその生物学的に活性なフラグメントに対して、少なくとも95%同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドである、方法。

【請求項49】 哺乳動物における病理学的状態を処置するための方法であって、該方法が、該病理学的状態を低減するのに十分な量で、請求項15に記載の抗体を哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明は、概して核酸およびそれらにコードされるポリペプチドに関する。より詳細には、本発明は、エンドゼピン様 (endozepine-like) ポリペプチドをコードする核酸、ならびにこれらの核酸およびポリペプチドを産生するためのベクター、宿主細胞、抗体、および組換え方法に関する。

**【0002】****(発明の背景)**

先進諸国では、栄養過剰に関連する障害に罹患する2億5千万人を超える個体が存在している。肥満、II型糖尿病、および代謝症候群Xは、流行性の割合に達した。これらの障害に関連する問題(例えば、高脂血症、高血圧、血管疾患、発作および末端器官損傷)は、甚大な財政的負担を、罹患した個体および大きな社会に強いる。従って、エネルギー代謝を調節する新しい薬理学的アプローチは、医療における重要な利益となる。本発明は、エンドゼピンポリペプチドの新規なファミリーを含み、これは、そのインシュリン分泌、インスリン感受性、グルコースおよび脂肪酸利用および他の内分泌機能の調節により、代謝を調整する新しい治療的機会を提供する。

**【0003】**

エンドゼピンは、メンバーが種々の生物学的効果を有することが報告されているタンパク質のファミリーである。これらの効果としては、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) レセプターの調節、インスリンホメオスタシス、およびミトコンドリアステロイド生成の調整が挙げられ得る。GABAレセプター(これは脳に存在する)の調節は、病理学的不安を調節すると考えられている。

**【0004】**

エンドゼピンファミリーのメンバーとしては、ジアゼパム結合インヒビター (DBI) が挙げられる。DBIまたはDBIの誘導体は、GABAの効果を下方向調節すると考えられる。DBIはまた、早期および後期の両方の単離された灌流ラット脾臓からのグルコース誘導インスリン放出を阻害することが報告されてい

る。

【0005】

いくつかの哺乳動物DBIポリペプチドが記載されている。哺乳動物DBIは、そのカルボキシ末端において高度に保存される傾向がある。約11キログルトンのヒトDBIポリペプチドが記載されている。このポリペプチドは、インビトロで脳膜画分に結合した -カルボリンおよびベンゾジアゼピンを置き換えることが示された。

【0006】

DBIポリペプチドは、脳および非脳組織（腸を含む）の両方に存在することが報告されている。DBIは、ホルモン機構、ニューロクリン（*neurocrine*）機構、または両方によりグルコース媒介インスリン放出を阻害する、腸ポリペプチドの新規なファミリー - に属し得ることが提案されてきた。

【0007】

（発明の要旨）

本発明は、部分的に公知のエンドゼピンに関連するポリペプチドをコードする新規な核酸配列の発見に基づく。エンドゼピン様ポリペプチドならびにその誘導体およびフラグメントをコードする核酸は、本明細書中以下で集約的に「ENDOX」と称される。

【0008】

1つの局面において、本発明は、ENDOXポリペプチドをコードする単離されたENDOX核酸分子を提供し、この核酸分子は、ヒトエンドゼピンmRNAの核酸配列に対して同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ENDOX核酸分子は、ストリンジェントな条件下でエンドゼピン核酸配列のタンパク質コード配列を含む核酸分子に相補的な核酸配列にハイブリダイズし得る。本発明はまた、ENDOXポリペプチド、またはそのフラグメント、ホモログ、アナログもしくは誘導体をコードする単離された核酸を含む。例えば、この核酸は、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35~45、47、および49のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも85%同一のポ

リペプチドをコードし得る。この核酸は、例えば、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46、および48のいずれかの核酸配列を含むゲノムDNAフラグメントまたはcDNA分子であり得る。

【0009】

オリゴヌクレオチド、例えば、ENDOX核酸（例えば、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46、および48）の少なくとも6つの連続的ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドまたはこのオリゴヌクレオチドの相補体を含むオリゴヌクレオチドもまた本発明に包含される。

【0010】

実質的に精製されたENDOXポリペプチド（配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49）もまた本発明に含まれる。いくつかの実施形態において、ENDOXポリペプチドは、ヒトエンドゼピンポリペプチドのアミノ酸配列に実質的に同一のアミノ酸配列を含む。

【0011】

本発明はまた、ENDOXポリペプチドに免疫選択的に結合する抗体を特徴とする。

【0012】

別の局面において、本発明は、治療的有効量または予防的有効量の治療剤および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物を含む。この治療剤は、例えば、ENDOX核酸、ENDOXポリペプチド、またはENDOXポリペプチドに特異的な抗体であり得る。さらなる局面において、本発明は、1つ以上のコンテナに、治療的有効量または予防的有効量のこの薬学的組成物を含む。

【0013】

さらなる局面において、本発明は、このDNAによりコードされるENDOXポリペプチドの発現を可能にする条件下で、ENDOX核酸を含む細胞を培養することによりポリペプチドを産生する方法を含む。所望の場合、ENDOXポリペプチドは、次いで回収され得る。

【0014】

別の局面において、本発明は、サンプル中のENDOXポリペプチドの存在を検出する方法を含む。この方法において、サンプルは、ポリペプチドと化合物との間の複合体の形成を可能にする条件下でこのポリペプチドに選択的に結合する化合物と接触される。この複合体は、存在する場合検出され、それによりサンプル内のENDOXのポリペプチドを同定する。

【0015】

本発明はまた、特定の細胞型または組織型を、そのENDOXの発現に基づいて同定する方法を含む。

【0016】

サンプルをENDOX核酸プローブまたはプライマーと接触させること、およびこの核酸プローブまたはプライマーが、このサンプル中のENDOX核酸分子に結合したか否かを検出することにより、このサンプル中のENDOX核酸分子の存在を検出する方法もまた含まれる。

【0017】

さらなる局面において、本発明は、ENDOXポリペプチドを含む細胞サンプルを、このポリペプチドの活性を調節するのに十分な量でENDOXポリペプチドに結合する化合物と接触させることにより、ENDOXポリペプチドの活性を調節するための方法を提供する。この化合物は、さらに本明細書中に記載されるような、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチドミメティック、炭水化物、脂質または他の有機分子（炭素含有）または無機分子のような低分子であり得る。

【0018】

障害または症候群を処置または予防するための医薬の製造における治療剤の使用もまた本発明の範囲内であり、これらの障害または症候群としては、例えば、代謝障害、糖尿病、肥満症、感染性疾患、節食障害、癌関連悪液質、および種々の異脂肪血症が挙げられる。治療剤は、例えば、ENDOX核酸、ENDOXポリペプチド、またはENDOX特異的抗体、またはその生物学的に活性な誘導体またはフラグメントであり得る。

【0019】

本発明はさらに、障害または症候群の調節因子についてスクリーニングするた

めの方法を含み、この障害または症候群としては、例えば、代謝障害、糖尿病、肥満症、感染性疾患、節食障害、癌関連悪液質、および種々の異脂肪血症が挙げられる。この方法は、試験化合物をENDOXポリペプチドと接触する工程および試験化合物がこのENDOXポリペプチドに結合するか否かを決定する工程を包含する。試験化合物のENDOXポリペプチドへの結合は、この試験化合物が活性の調節因子、または上述の障害または症候群に対する潜時または素因の調節因子であることを示す。

#### 【0020】

試験化合物を、上述の障害または症候群の危険性が増大した試験動物に投与することにより、活性の調節因子、またはこの障害または症候群に対する潜時または素因についてスクリーニングするための方法もまた本発明の範囲内である：代謝障害、糖尿病、肥満症、感染性疾患、節食障害、癌関連悪液質、および種々の異脂肪血症。この試験動物は、ENDOX核酸によりコードされる組換えポリペプチドを発現する。次いでENDOXポリペプチドの発現または活性は、この試験動物において測定され、ENDOXポリペプチドを組換え的に発現しかつこの障害または症候群に関する増加した危険性のないコントロール動物におけるタンパク質の発現または活性も同様に測定される。次に、試験動物およびコントロール動物の両方におけるENDOXポリペプチドの発現が比較される。コントロール動物に対する試験動物におけるENDOXポリペプチドの活性の変化は、この試験化合物が障害または症候群の潜時の調節因子であるということを示す。

#### 【0021】

なお別の局面において、本発明は、被験体（例えば、ヒト被験体）におけるENDOXポリペプチド、ENDOX核酸または両方の変更したレベルに関連する疾患の存在または疾患に対する素因を決定するための方法を含む。この方法は、この被験体由来の試験サンプル中のENDOXポリペプチドの量を測定する工程、および試験サンプル中のこのポリペプチドの量を、コントロールサンプル中に存在するENDOXポリペプチドの量と比較する工程を包含する。コントロールサンプルと比較した場合の、試験サンプル中のENDOXポリペプチドのレベルの変更は、被験体における疾患の存在または疾患に対する素因を示す。好ましく

は、この素因は、例えば、代謝障害、糖尿病、肥満症、感染性疾患、節食障害、癌関連悪液質、および種々の異脂肪血症を含む。また、本発明の新規なエンドゼピンの発現レベルは、種々の癌についてスクリーニングするための方法において使用され得る。

【0022】

さらなる局面において、本発明は、被験体（例えば、ヒト被験体）に、ENDOXポリペプチド、ENDOX核酸またはENDOX特異的抗体を、病理学的状態を低減するかまたは予防するのに十分な量で投与することにより、哺乳動物における障害と関連する病理学的状態を処置または予防する方法を含む。好ましい実施形態において、障害は、例えば、代謝障害、糖尿病、肥満症、感染性疾患、節食障害、癌関連悪液質、および種々の異脂肪血症を含む。

【0023】

さらなる局面において、本発明は、血清コレステロール、脂質、グルコースおよびインスリンを変更することによって、総体エネルギー代謝または体重損失を変更する方法を含む。

【0024】

なお別の局面において、本発明は、特定の脂肪貯蔵減少、いくつかの医療処置に関連する筋肉質量増加、または一部の脂肪細胞における脂質容積の調節に起因する体重損失を調節する方法を含む。

【0025】

なおさらなる局面において、本発明は、ポジティブ様式およびネガティブ様式の両方で食欲、栄養の吸収および代謝物質の蓄積に影響を及ぼす方法において使用され得る。本発明はまた、代謝を調節することによる、糖尿病、肥満に関連した代謝障害、代謝性症候群X、ならびに節食障害、慢性疾患に関連した消耗性疾患および種々の癌の処置において使用され得る。

【0026】

なお別の局面において、本発明は、当該分野で一般的に使用される多数の技術の何れか1つにより、本発明の細胞レセプターおよび下流エフェクターを同定する方法において使用され得る。これらとしては、ツーハイブリッド系、アフィニ

ティ精製、抗体または他の特異的相互作用分子との共沈降が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0027】

他に規定しなければ、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似かまたは等価な方法および材料が本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料は、いかに記載される。本明細書中で記述される全ての刊行物、特許、および他の参考文献は、その全体が参考として援用される。対立する場合は、定義を含む本願明細書に従う。さらに、材料、方法、および実施例は、例示の目的のみであり、いずれの様式にも限定されることを意図されない。本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかとなる。

#### 【0028】

(発明の詳細な説明)

本発明は、部分的に、以前に記載したエンドゼピタンパク質ファミリーのポリペプチドに関するポリペプチドをコードする新規な核酸配列の発見に基づく。発見された配列に基づくエンドゼピン様ポリペプチドをコードする核酸は、それぞれ、ENDO1、ENDO2、ENDO3、ENDO4、ENDO5、ENDO6、ENDO7、ENDO8、ENDO9およびENDO10といわれる。核酸およびそのコードされるポリペプチドは、包括的に本明細書において「ENDOX」と称する。

#### 【0029】

(ENDO1)

本発明のENDO1核酸は、配列番号1、11、13、14、46、および48に示される拡散配列を含む。配列番号11、13、および14は、組み合わされて配列番号1のヌクレオチド配列を提供する。配列番号1は、開始メチオニンを有さず、そして終止コドンを有していないので、完全なコード配列でなくてもよい。配列番号46および48の両方は、配列番号1にもコードされるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。これらのヌクレオチド配列およびこ

れらがコードするアミノ酸の各々は、以下に詳細に記載される。

【0030】

本発明のENDO1核酸は、表1に示される核酸配列を含む(配列番号11)。この配列は、データベースアクセス番号AA877351を有する、以前に記載されたヒトcDNAクローン由来の発現配列タグ(EST)に関する。AA877351ESTは、「ジアゼパム結合インヒビター-様5」をコードする核酸と類似であると報告される。

【0031】

(表1)

【0032】

【表1】

```

ACCGCCTCCACCACCCCATGTGCCAAGTGGAGTTCGAGCTGCGCGGCCCTCAAGCAGCTGAAG
GGTCCCCTGAGCGATCAGGAGAAGCTGCTGGTCTACGGCTTGTACAAACAGGCCACCCAGGGC
GACTGCGACATCCCCGGCCCTCCGGCCTCAGACGTGAGAGCCAGGGCCAAAGTGGGAGGCTTGG
AGCGCGAACAAAGGGCGTCCAAGATGGACGCCATGAGGGGCTACGCGGCCAAAGTGGAGGAG
CTGACGAAGAAGGAA

```

(配列番号11)。

【0033】

表1に開示される核酸配列は、位置1から開始するオープンリーディングフレーム(「ORF」)を含む。このORFは、89アミノ酸残基のポリペプチド配列をコードする。このコードされるポリペプチドの配列は、表2に示される(配列番号12)。翻訳タンパク質が、マウス由来のジアゼパム結合インヒビター様5(SWISSPROT-ACC:009035)に関連している(同一性62/81;76%およびポジティブ=70/81;86%)。さらに、翻訳タンパク質は、2型ヒトエンドゼピン(endozepine)様タンパク質変異体(GENBANK-ID:AF229804|acc:AF229804)に関連している(同一性=89/89(100%)、ポジティブ=89/89(100%))。

【0034】

(表2)

【0035】

【表2】

TASTTFCAKWSSSCAALKQLKGPVSDQEKLLVYGLYKQATQGDCDIPGPPASDVRARAKWEAW  
SANKGASKMDAMRGYAAKVEELTKKE

(配列番号12)。

【0036】

配列番号11に示されるORFによってコードされるポリペプチドは、アミノ末端メチオニン残基を含まない。従って、この開示された核酸配列は、より大きな遺伝子産物をコードするオープンリーディングフレームの一部であり得る。より大きな遺伝子産物としては、例えば、タンパク質プロセッシングの間に切断される少なくとも1つのシグナルペプチドが挙げられ得る。

【0037】

ENDO1核酸をコードするさらなる配列を同定するために、開示されたENDO1配列(配列番号11)は、表2に示されるENDO1ポリペプチドをコードするさらなる配列を単離するためのPCR反応における使用のためのプライマーを設計するために使用された。増幅された配列は、クローン化されそして配列決定された。2つの産物の配列は、18517852-2(配列番号13)および118517852-3(配列番号14)と命名された。これらの配列は、それぞれ、表3および表4に示される。

【0038】

(表3)

【0039】

【表3】

TCTTCTTCGTGAGCTCCCTCCACTTTGGCCGCGTAGCCCTCATGGCGTCCATCTTGGACGCCCTTTGTTGCGCT  
 CCAAGCCTCCCACTTGGCCCTGGCTCTCAGCTCTGAGGCCGAGGGCCGGGATGTCGCAGTCGCCCTGGGTGGCC  
 TGTGTTGTACAAGCCGTAGACCAGCAGCTTCTCCTGATCGCTCACGGGACCCCTTCAGCTGCTTGAGGGCCGCAAAGC  
 TCGAAGTCCACTTGGCACATGGGGTGGTGGAGGCCGCTCCCTGGTGTAGAACCTGGAGGTGGAGAGTTGGAGTGGC  
 TGTACTACTCGATCTCAGGGGGAGGAGACAGGCAGCGATGTTTGTGTTTTGTCAAGCACAGATTGCAAGCTCGG  
 GGTCCAGCGTAAACCCACCATGTTTGGGCTCACACGGCGCATTTTCTGGGGAGGACCAGCCGTCAAAAAGCGTCT  
 AGGATCCGGAACGCTGCTGTCTGGA

(配列番号13)。

【0040】

(表4)

【0041】

【表4】

GCGTCCATCTTGGACGCCCTTTGTTGCGGCTCCAAGCCTCCCACTTGGCCCTGGCTCTCAGCTCTGAGGCCGGAG  
 GGCCGGGGATGTCGCAGTCCGCCCTGGGTGGCTGTTGTACAAGCCGTAGACCAGCAGCTTCTCCTGATCGCTCAC  
 GGGACCCCTTCAGCTGCTTGAGGGCCGCGCAGCTCGAAGTCCCACTTGGCACATGGGGTGGTGGAGGCCGCTCCCTGGT  
 GCTAGAAGCTGGAGGTGGAGAGTTGGAGTGGCTGTTACTACTCGC

(配列番号14)。

【0042】

表1、3および4に示される配列は合わされて、表5に示されるヌクレオチド  
 配列(配列番号1)を提供し得る。

【0043】

(表5)

【0044】

【表5】

GAT CGA GTA GTR ACA GCC ACT CCA ACT CTC CAC CTC CAG CTT CTA GCA CCA GGG ACC GCC TCC  
 ACC ACC CCA TGT GCC AAG TGG AGT TCG AGC TXT GCG GCC CTC AAG CAG CTG AAG GGT CCC GTG  
 AGC GAT CAG GAG AAG CTG CTG GTC TAC GGC TTG TAC AAA CAG GCC ACC CAG GGC GAC TGC GAC  
 ATC CCC GGC CCT CCG GCC TCA GAC GTG AGA GCC AGG GCC AAG TGG GAG GCT TGG AGC GCG AAC  
 AAA GGG GCG TCC AAG ATG GAC GCC ATG AGG GGC TAC GCG GCC AAA GTG GAG GAG CTG ACG AAG  
 AAG

(配列番号1)。

## 【0045】

「X」によって示されるヌクレオチド残基は、TまたはGであり得、すなわち、種々の実施形態において、本発明のENDO1核酸は、この核酸配列のXによって示される位置にTを含む。他の実施形態において、本発明のENDO1核酸配列は、この開示されるヌクレオチド配列中のXによって示される位置にGを含む。

## 【0046】

配列番号1中のORFによってコードされるポリペプチドは、アミノ末端メチオニン残基を含まない。従って、この開示された核酸配列は、より大きな遺伝子産物をコードするオープンリーディングフレームの一部であり得る。ENDO1核酸をコードするさらなる配列を同定するために、核酸データベース検索が実行された。2つの新規ENDO1配列が、ここで同定され、そして表5Aに示される。配列番号46は、GenBank登録番号AL121672(配列番号46)を有する以前に記載されたヒトクローンから編集された。配列番号48は、GenBankクローンAC025743(配列番号48)を有する以前に記載されたヒトクローンから編集された。

## 【0047】

(表5A)

## 【0048】

【表6】

>AL121672\_GENSCAN\_predicted\_CDS\_5\_687\_bp  
 ATGGGAGACGCAGGAGCCACGGGGCGCGCTTAGGCCTGCTCACAACTCCGCGGGCCCCGCCACAG  
 CCTCCGCGCGCACGCCAGTCTCAGCAACGAGCGCGCAAGCGCACAGCGCGCTTCCGGCAGAGCC  
 CTCCACCAGCCCTCAGCACCAGGGACCGCTCCACCACCCCATGTGCCAAGTGGAGTTCGAGCTGCGCG  
 GCCCTCAAGCAGCTGAAGGGTCCCGTGAGCGATCAGGAGAAGCTGCTGGTCTACGGCTTGTACAAACAG  
 CCACCAGGGCGACTGCGACATCCCGGCCCTCCGGCTCAGACGTGAGAGCCAGGGCCAAGTGGGAGGC  
 TTGGAGCGCGAACAAGGGGGCTCCAAGATGGACGCCATGAGGGGCTACGCGGCCAAAGTGGAGGAGCTG  
 ACGAAGAAGGAAGTGGGGGGCTGGAGCGCAACAAGGGGGCTGCAAGATGGACGCCATGAGGGGCTAC  
 GCGGCCAAAGTGGAGGAGCTGACGAAGAAGGAAGGGGGCTCCAAGATGGACGCCATGAGGGGCTACGCGGC  
 CAAAGTGGAGGAGCTGACGAAGAAGGAAGTGGGGGGCTGGAGCGCAACAAGGGGGCTCCAAGATGGA  
 CGCCATGAGGGGCTACGCGGCAGAGTGGAGATGAGGAAGAAGGAGGCTGGCTGA (配列番号46)

>AC025743\_GENSCAN\_predicted\_CDS\_7\_576\_bp  
 ATGGGAGACGCAGGAGCCACGGGGCGCGCTTAGGCCTGCTCACAACTCCGCGGGCCCCGCCACAG  
 CCTCCGCGCGCACGCCAGTCTCAGCAACGAGCGCGCAAGCAAGCGCGCTTCCGGCAGAGCCCTCC  
 CACCAGCCCTCAGCTTCTAGCACCAGGGACCGCTCCACCACCCCATGTGCCAAGTGGAGTTCGAGCTGC  
 GCGGCCCTCAAGCAGCTGAAGGGTCCCGTGAGCGATCAGGAGAAGCTGCTGGTCTACGGCTTGTACAAAC  
 AGGCCACCAGGGCGACTGCGACATCCCGGCCCTCCGGCTCAGACGTGAGAGCCAGGGCCAAGTGGGA  
 GGCTTGGAGCGCGAAAAAGGGGGCTCCAAGATGGACGCCATGAGGGGCTACGCGGCCAAAGTGGAGGAG  
 CTGACGAAGAAGGAAGTGGGGGGCTGGAGCGCAACAAGGGGGCTGCAAGATGGACGCCATGAGGGGCT  
 TACGCGGCCAAAGTGGAGGAGCTGACGAAGAAGGAAGTGGGGGGCTGGAGCGCAACAAGGGGGCTCC  
 AAGATGGACGCCATGA (配列番号48)

表5に示される核酸(配列番号1)は、表6に示されるアミノ酸配列(配列番号2)を有するポリペプチドをコードする。

【0049】

(表6)

【0050】

【表7】

DRVVTATPTLHLQLLAPGTASTTTPCAKWSSSXAALKQLKGPVSDQEKLLVYGLYKQATQGDCD  
 IPGPPASDVRARAKWEAWSANKGASKMDAMRGYAAKVEELTKKE

(配列番号2)。

【0051】

表5Aに示される核酸(配列番号46および配列番号48)は、表6Aに示されるアミノ酸配列(それぞれ、配列番号47および配列番号49)を有するポリペプチドをコードする。

【0052】

(表6A)

【0053】

【表8】

>AL121672\_GENSCAN\_predicted\_peptide\_5\_228\_aa  
 MGDAGATAAALRPAHNLRPAPTASAAHAQSSRTSAPSAQRRLPAEPSHQPSAPGTASTTPCAKWSSSCA  
 ALKQLKGPVSDQEKLLVYGLYKQATQGDCDIPGPPASDVRRARAKWEAWSANKGASKMDAMRGYAAKVEEL  
 TKKEVGGVEREQRGVQDGRHEGLRGQSGGADEEGRASKMDAMRGYAAKVEELTKKEVGGVEREQRGVQDG

RHEGLRGQSEEMRKEAG (配列番号47)

>AC025743\_GENSCAN\_predicted\_peptide\_7\_191\_aa  
 MGDAGATAAALRPAHNLRPAPTASAAHAS PHERARQASRAFRQSPPTSPQLLAPGTASTTPCAKWSSSC  
 AALKQLKGPVSDQEKLLVYGLYKQATQGDCDIPGPPASDVRRARAKWEAWSAKKGASKMDAMRGYAAKVEE  
 LTKKEVGGVEREQRGVQDGRHEGLRGQSGGADEEGSGGRGARTKGRPRWTF (配列番号49)

「X」によって示されるアミノ酸残基は、CまたはFであり得、すなわち、種々の実施形態において、本発明のポリペプチドは、このアミノ酸配列中のXによって示される位置にCを含む。他の実施形態において、本発明のENDO1ポリペプチドは、この列挙されるアミノ酸配列中のXによって示される位置にFを含む。

【0054】

本発明のENDO1核酸は、配列番号2、12、47、または49のポリペプチドをコードする核酸を含み得、例えば、ENDO1核酸は、配列番号1、11、46、または48の核酸配列を含み得る。本発明はまた、そのいずれかの塩基が表1または表5に示される対応する塩基から変更され得る、変異体核酸または改変体核酸を含む。いくつかの実施形態において、ENDO1核酸は、そのエンドゼピン様活性および生理学的機能を維持するタンパク質をコードするか、またはそのような核酸のフラグメントである。本発明はさらに、その配列がまさに記載されたものに対して相補的である核酸(まさに記載された任意の核酸に対して相補的である核酸フラグメントを含む)を含む。本発明はさらに、その構造が化学改変を含む、核酸もしくは核酸フラグメントまたはこれらに対する相補鎖を含む。

む。このような改変としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：改変塩基およびその糖リン酸骨格が改変されるかまたは誘導体化されている核酸。これらの改変は、改変核酸の化学安定性を少なくともある部分増強するために実行され、その結果、これらは、例えば、被験体における治療適用におけるアンチセンス結合核酸として使用され得る。

【0055】

本発明のENDO1ポリペプチドは、配列番号2、12、47または49のアミノ酸配列を含み得る。本発明はまた、そのいずれかの残基が配列番号2、12、47または49に示される対応する残基から変更され得るがなおそのエンドゼピン様活性および生理学的機能を維持するタンパク質をコードする、変異体タンパク質または改変体タンパク質、あるいはこれらの機能的フラグメント（例えば、以下の活性ペプチド（配列番号15））を含む。

【0056】

代謝調節ペプチド#6（MRP-6）配列は、以下：  
QATQGDCDIPGPPASDVRRAR（配列番号15）  
である。

【0057】

ENDO1ポリペプチドの種々の実施形態の複数配列整列（表6B）は、これらの互いの関係を示す。

【0058】

（表6B）

【0059】

【表9】

```

ALI21672_GENSCAN_predicted_pep 1 MGDAGAFAAALPAAHLEPPPTASAAHQ-SSQTSAPSAQRFLPAPPH H PPSKPGTAST 59
MRP-d .....TAST 4
AC025743_GENSCAN_predicted_pep 1 MGDAGAFAAALPAAHLEPPPTASAAHSPHEARQAARAFQSPFTT P LLLAFGTAST 60

ALI21672_GENSCAN_predicted_pep 60 TPCARWSSSCAAALRQLKQPPSDQEKLLVYGLVKQATQDQDIPGPPASD V RARAKWEAWS 119
MRP-d 5 TPCARWSSSCAAALRQLKQPPSDQEKLLVYGLVKQATQDQDIPGPPASD V RARAKWEAWS 64
AC025743_GENSCAN_predicted_pep 61 TPCARWSSSCAAALRQLKQPPSDQEKLLVYGLVKQATQDQDIPGPPASD V RARAKWEAWS 120

ALI21672_GENSCAN_predicted_pep 120 AIKGA SKMDAMRQYAAKVEELTKKEVGOVEREQRQVQDORHEOLRQSEEMRKKIAG 179
MRP-d 65 AIKGA SKMDAMRQYAAKVEELTKKE ..... 89
AC025743_GENSCAN_predicted_pep 121 AIKGA SKMDAMRQYAAKVEELTKKEVGOVEREQRQVQDORHEOLRQSEEMRKKIAG 180

ALI21672_GENSCAN_predicted_pep 180 DAMRYAAKVEELTKKEVGOVEREQRQVQDORHEOLRQSEEMRKKIAG 228
MRP-d *** ..... 191
AC025743_GENSCAN_predicted_pep 181 ARTKRRPRWTF ..... 191

```

本発明はさらに、ENDO 1 ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント（例えば、 $F_{ab}$  または  $(F_{ab})_2$ ）、ならびにこれらの誘導体およびフラグメントを含む。

#### 【0060】

ENDO 1 配列は、組織の特定の型を検出するのに有用である。例えば、組織パネルが発現に関してアッセイされる場合、ENDO 1 は、肝臓および内皮細胞に高度に発現される。また、ENDO 1 の高度な発現は、複数の型の癌のためのマーカーである。

#### 【0061】

ENDO 1 配列はまた、血清グルコースまたは脂肪レベルを変化させることによって全体的なエネルギー代謝または体重を調節することに有用である。

#### 【0062】

ENDO 1 配列はまた、当該分野で一般的に使用される多数の技術のうちの任意の1つによって本発明の細胞レセプターおよび下流の因子を決定するための方法に有用である。

#### 【0063】

ENDO 1 配列は、糖尿病、肥満と関連する代謝障害、代謝症候群 X ならびに食欲不振および慢性疾患と関連する消耗障害および代謝を調節することによる種々の癌の処置に有用である。

#### 【0064】

#### (ENDO 2)

本発明の ENDO 2 核酸は、表 7（配列番号 3）に示される核酸配列を含む。

ORFならびにORFの開始コドンから上流の推定非翻訳領域およびORFの終止コドンから下流の推定非翻訳領域は、表7に開示されるヌクレオチド配列に存在する。非翻訳ヌクレオチドは、下線で示される。ORFの開始コドンおよび終止コドンは、太字で示される。

【0065】

(表7)

【0066】

【表10】

GTATAAGACATACAGAAGGAATGCCTGGAGAGCAGCAACAGCCCAGCTGCGGCCACCATGTCC  
 CTGCAGGCTGATTTTGACATGGTCACAGAAGATGTGAGGAAGCTGAAAACAAGACCAGATGAT  
 GAAGAACTGAAAGAACTTTATGGGCTTTACAAACAAGCTGTAATTGAAACATTAATATTGAG  
 TGTTTCAGAAATGCTAGAATTTAAAGGCAAGGCCAAATGGGAAGCACAGAACCCCCAAAAGGA  
 TTGTCAGAGGAAGATATGATGCGTGCCTTTATTTCTAAAGCCGAAGAGCTGATAGAAAAATAT  
 GGAATTTTAGAATAAAGCATATGATAAATTTTCCTTT

(配列番号3)。

【0067】

表7の核酸配列は、470ヌクレオチドの*Rana ridibunda* ジアゼパム結合インヒビター (DBI) mRNA (GENBANK - ID: RRU09205 | acc: U09205) に対して同一かつポジティブな294塩基のうちの218塩基 (74%) を有する。*Rana ridibunda* DPI mRNA に対して表7に開示された配列領域を比較するBLASTN同一性検索は、表8に示される。開示された配列の領域は、「Query」配列と示され、そして*Rana ridibunda* DPI mRNA (配列番号11) 配列は、「Subject配列」と示される。

【0068】

(表8)

【0069】

【表11】

```

Query: 46 GCTGCGGCCACCATGTCCTGCGAGGCTGATTTTGACATGGTCA-CAGAAGATGTGAGGAA
104
      |||  | ||||| | ||| ||||| | || | ||| | |||
Sbjct: 1 GCTGAATCAACCATGTCACCCAGGCAGATTTTGACAAAG-CAGCAGGGGATGTAAGAA 59

Query: 105 GCTGAAAACAAGACCAGATGATGAAGAAGTGAAGAAGCTTTATGGGCTTTACAACAAGC
164
      ||||| ||| | | ||||| |||| | | | |||| |
Sbjct: 60 ATTGAAAACAAAACCAACTGACGATGAACTGAAGGAACTGTACGGACTCTACAAGCAGTC
119

Query: 165 TGTAATTGGAAACATTAATATTGAGTGTTCAGAAATGCTAGAATAAAAGGCAAGGCCAA
224

      |||  ||| ||| | ||| | | ||||| | || |||||
Sbjct: 120 CACTGTTGGGGACATAAATATAGAGTGCCTGGCATGCTAGATCTGAAGGGCAAGGCCAA
179

Query: 225 ATGGGAAGCACAGAACCCCAAAAAGGATTGTCAGAGGAAGATATGATGCGTGCCTTTAT
284
      |||| ||| ||| | ||| | ||| ||||| ||| | | |
Sbjct: 180 GTGGGACGCATGGAACCTAAAGAAAGGCTTGTCATAGGAAGATGCGATGAGCGCTTATGT
239

Query: 285 TTCTAAAGCCGAAGAGCTGATAGAAAAATATGGAATTTAGAATAAAG-CATATGAT 339
||||||| | ||||| ||||| |||| | | | | | |||
Sbjct: 240 TTCTAAAGCCCATGAGCTGATAGAAAAATATGGCCTGTA-AC-AAGGTCCGATGAT 293

```

ORFは、85アミノ酸のポリペプチドをコードする（配列番号4）。このポリペプチドのアミノ酸配列は、表9に示される（配列番号4）。

【0070】

（表9）

【0071】

【表12】

```

MSLQADFDMVTEDEVRLKTRPDDEELKELYGLYKQAVIGNINIECSEMLELKGKAKWEAQNPO
KGLSEEDMMRAFISKAEELIEKYGI

```

（配列番号4）。

【0072】

表9に開示されるポリペプチド配列は、以前に記載されたアヒルジアゼパム結合インヒビターポリペプチドに関連する。この関係は、表10に示される。表9に示されるアミノ酸配列（配列番号4）は、*Anas platyrhynchos*（イエアヒル）（ptnr: SWISSPROT-ACC: P45882）

由来の103アミノ酸残基のアシル-c o A結合タンパク質(ACBP)(ジアゼパム結合インヒビター)(DBI)(エンドゼピン)(EP)と、同一である85アミノ酸残基のうちの60アミノ酸残基(70%)、およびこれに対してポジティブである85アミノ酸残基のうちの72アミノ酸残基(84%)を有する。表9に示されるポリペプチド配列の領域は、「Query」配列と示される。アシルポリペプチド配列の領域は、「S b c t」配列と示される。

【0073】

(表10)

【0074】

【表13】

```

Query:   67 QADFDMVTEDVRKCLKTRPDDEELKELYGLYKQAVIGNINIECSEMLELKGKAKWEAQNPK
246
          |||||  |++|++++| |||++++| ||| ++|++++|  ||+||||++++| | +
Sbjct:   19 QADFDEAAEEVKCLKTRPTDEELKELYGFYKQATVGDINIECPGMLDLKGKAKWEAWNPK 78

Query:   247 KGLSEEDMMRAFISKAEEELIEKYGI 321
          ||+|+|| | |+||||+ ++|||||
Sbjct:   79 KGISKEDAMNAYISKAKTMVEKYGI 103

```

配列番号4のアミノ酸と種々のアシルc o A結合ポリペプチドとの間の複数配列整列が、表11に示される。表7のアミノ酸配列(「ACBP\_\_新規」)、ブタアシル-c o A結合タンパク質(SWISSPROT座ACBP\_\_PIG、登録番号PI2026)(「ACBP\_\_ブタ」)、ウシアシル-c o A結合タンパク質(SWISSPROT座ACBP\_\_BOVIN、登録番号P07107)(「ACBP\_\_ウシ」)、およびヒトアシル-c o A結合タンパク質(SWISSPROT座ACBP\_\_HUMAN、登録番号P07108)(「ACBP\_\_ヒト」)との間の整列が示される。完全な相同性領域は、黒で示される。保存的アミノ酸置換を有する領域は、灰色で示される。非保存的アミノ酸置換は、陰影をつけずに示される。

【0075】

(表11)

【0076】

【表14】

|                      |    |       |        |      |        |       |                  |       |         |       |    |         |   |
|----------------------|----|-------|--------|------|--------|-------|------------------|-------|---------|-------|----|---------|---|
| ACBP <sub>-</sub> グタ | -- | SOAEF | KAAEEV | NL   | KTKPAD | EMLFI | SHYKQATVGDINTERP | GL    | KGKAKWD |       |    |         |   |
| ACBP <sub>-</sub> ウシ | -- | SOAEF | KAAEEV | NL   | KTKPAD | EMLFI | SHYKQATVGDINTERP | GL    | KGKAKWD |       |    |         |   |
| ACBP <sub>-</sub> ヒト | -- | SOAEF | KAAEEV | NL   | KTKPAD | EMLFI | SHYKQATVGDINTERP | GL    | KGKAKWD |       |    |         |   |
| ACBP <sub>-</sub> 新規 | MS | LDA   | QMYTE  | NK   | LKTR   | PDDEE | KEL              | GLYKQ | MEGNI   | TECSE | ML | KGKAKWD | Q |
| ACBP <sub>-</sub> グタ |    | N     | GL     | KGTS | KEDAM  | KAY   | I                | NK    | VEEL    | KKKY  | GI |         |   |
| ACBP <sub>-</sub> ウシ |    | N     | EL     | KGTS | KEDAM  | KAY   | I                | NK    | VEEL    | KKKY  | GI |         |   |
| ACBP <sub>-</sub> ヒト |    | N     | EL     | KGTS | KEDAM  | KAY   | I                | NK    | VEEL    | KKKY  | GI |         |   |
| ACBP <sub>-</sub> 新規 |    | N     | PKGL   | SE   | EDM    | RA    | I                | S     | AAEL    | TE    | KY | GI      |   |

エンドゼピン様タンパク質をコードする本発明のENDO2核酸は、配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸（例えば、その配列が配列番号3に提供される核酸）を含む。本発明はまた、配列番号3のフラグメント、またはその塩基のいずれかが配列番号3に示される対応する塩基から変更され得る変異体核酸もしくは改変体核酸を含む。いくつかの実施形態において、変異体核酸または改変体核酸は、そのエンドゼピン様活性および生理学的機能を維持するタンパク質をコードするか、そのような核酸のフラグメントである。本発明はさらに、その配列がまさに記載されたものに対して相補的である核酸（まさに記載された任意の核酸に対して相補的である核酸フラグメントを含む）を含む。本発明はさらに、その構造が化学改変を含む、核酸もしくは核酸フラグメントまたはこれらに対する相補鎖を含む。このような改変としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：改変塩基およびその糖リン酸骨格が改変されるかまたは誘導体化されている核酸。これらの改変は、改変核酸の化学安定性を少なくともある部分増強するために実行され、その結果、これらは、例えば、被験体における治療適用におけるアンチセンス結合核酸として使用され得る。

## 【0077】

本発明に従うENDO2ポリペプチドは、表9（配列番号4）に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。本発明はまた、変異体または改変体タンパク質（これら残基のいずれかは、表8に示される対応する残基から変化され得るが、エンドゼピン（endozepine）様活性および生理学的機能を維持するタンパク質を依然としてコードする）、またはそれらの機能的フラグメント（例えば、以下の活性ペプチド（配列番号16））を含む。

## 【0078】

代謝調節ペプチド#5 (MRP-5) 配列:

QAVIGNINIECSEMLELK GK (配列番号16)。

## 【0079】

本発明はさらに、抗体および抗体フラグメント(例えば、 $F_{ab}$ または $(F_{ab})_2$ )を含み、これらはENDO2ポリペプチド、ならびにそれらの誘導体およびフラグメントに免疫特異的に結合する。

## 【0080】

ENDO2配列は、組織の特定の型の検出に有用である。例えば、組織のパネルが発現についてアッセイされる場合、ENDO2は脳細胞および脾臓細胞において高度に発現される。また、ENDO2の高い発現は、結腸および肺の癌についてのマーカーである。

## 【0081】

ENDO2配列はまた、血清グルコースまたは脂肪のレベルの変更による全体的なエネルギー代謝または体重の調節に有用である。

## 【0082】

ENDO2配列はまた、当該分野で一般に利用される多くの技術のいずれか1つによって、本発明の細胞レセプターおよび下流エフェクターを同定する方法において有用である。

## 【0083】

ENDO2配列は、代謝の調節による、糖尿病、肥満に付随する代謝障害、代謝症候群X、ならびに慢性疾患および種々の癌に付随する食欲不振および消耗障害の処置において有用である。

## 【0084】

(ENDO3)

本発明のENDO3核酸は、表12(配列番号5)に示される核酸配列を含む。ORF、ならびにこのORFの開始コドンから上流および終止コドンから下流の推定非翻訳領域は、表12に下線によって示される。このORFの開始コドンおよび終止コドンは、太字の文字で示される。このORFは、ヌクレオチド86

～88のatg開始コドンで始まり、そしてヌクレオチド403～405のtgaコドンで終わる。開始コドンから上流および終止コドンから下流の推定非翻訳領域は、表12において下線によって示され、一方、開始コドンおよび終止コドンは太字の文字で示される。

【0085】

(表12)

【0086】

【表15】

GCTCACACCTGTAATCCCAGCATTGGGGAGGCCAAGGCAGGCAGATTATGTGAGGTCAAGAGT  
TCCAGACCAGCTGTCCAACATGGCAAAACCCATCTCCACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGCA  
 TGGGTGGCATGCAGCTGTAATCACAGCTGCTCGGGAGGCTGAGGCGGAGAATCAGTTGAGCTG  
 GGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATGTGCAGGTATTAAGCACTTTAAGACCAAGCCAGCAGA  
 TGATGAGATGCGGTTCCCTTACGGCCACTACAAACGAGCGACTGTAGGCAACATAAAGACAGA  
 ACGGCCAGGGATGGTGGACTTCAAGGGCAAAGCCAAGTGGGATCCCTGGAATTTAGTGAAAGG  
 GGCTGCCAGGGAAGATCCCATGAAAGCTAAAGCTTACGTCAAAAAGTAGAAGAGTTAAAGAA  
 AAAATTCAGAATACGAGAGACTGGAATTGTTGCCAGCCATGCCTTTGTCCTAAACTGAGACAA  
TGCCTTGTTTTTTCTACACTGTGGATGGTGGGAAGTATGGAAAGAATCAGCTAACCCATC

(: 配列番号 :5)

この開示されるENDO3核酸配列(配列番号5)は、細菌の人工染色体462G18(LANL)(GENBANK-ID:AC005736|acc:AC005736)に組みこまれるヒト染色体16上の配列に同一の199塩基のうち168個(84%)を有する。

【0087】

表12で同定されるORFは、83残基のポリペプチド配列(配列番号6)をコードし、これは表13に示される。

【0088】

(表13)

【0089】

【表16】

MAKPISTKNTKISRHWHAHAVITAAREAEAEENHLSWEEKKKKKRCAGIKHFKTKPADDEMRF  
 YGHYKRATVGNIKTERPGMVDFKGGKAKWDPWNLVKGAAEDPMKAKAYVKKVEELKKKFRIRE  
 TGIVASHAFVLN (配列番号 6)

表13において開示されるポリペプチド配列のアミノ酸配列(配列番号6)は、86アミノ酸残基のウシアシル-c o A -結合タンパク質(ACBP)(ジアゼパム結合インヒビター)(DBI)(エンドゼピン)(EP)(ptnr:SWISSPROT-ACC:P07107)と同一の82アミノ酸残基のうち55個(67%)を有し、そしてこのアミノ酸残基とポジティブな82残基のうち66個(80%)を有する。これらの配列の比較は、表14に示される。表13のポリペプチドの領域は、「Query」配列として示され、そしてウシACBP配列の領域は「Sbjct」配列として示される。

【0090】

(表14)

【0091】

【表17】

```

Query: 209 KRCAGIKHFKTKPADDEMRFYGHYKRATVGNIKTERPGMVDFKGGKAKWDPWNLVKGAAAR
388
      |  +|| |||||+|| |+| |||+|||+| |||||+||||||| || +|| ++
Sbjct: 7  KAEEVKHLKTKPADEEMLFIYSHYKQATVGDINTERPGMLDFKGGKAKWDANLKGTSK 66

Query: 389 EDPMKAKAYVKKVEELKKKFR 454
      || ||| |+ |||||+ |
Sbjct: 67 EDAMKA--YIDKVEELKKKYGI 86
  
```

表13に開示されるポリペプチド配列のアミノ酸配列(配列番号6)は、ヒトジアゼパム結合インヒビター(DBI)の91アミノ酸残基(gb:GENBAN-K-ID:HUMDBI|acc:M14200)と同一の91アミノ酸残基のうち57個(62%)を有し、そしてこのアミノ酸残基とポジティブな91残基のうち72個(79%)を有する。

【0092】

これらの配列の比較は、表14Aに表される。表13のポリペプチドの領域は「Query」配列として示され、そしてヒトジアゼパム結合インヒビター(D

B I ) 配列の領域は「S b j c t」配列として示される。

【0093】

(表14A)

【0094】

【表18】

```
>gb:GENBANK-ID:HUMDBI|acc:M14200 Human diazepam binding inhibitor (DBI)
mRNA, complete cds - Homo sapiens, 556 bp.
Length = 556

Plus Strand HSPs:

Score = 310 (109.1 bits), Expect = 3.4e-26, P = 3.4e-26
Identities = 57/91 (62%), Positives = 72/91 (79%), Frame = +2

Query:    38 EKKKKKRCAGIKHFKTKPADDEMRFYGHYKRATVGNIKTERPGMVDFKGGKAKWDFWNLV
          97
          | + +|   ++| |||+|+|| |+|||+|||+| |||+|| ||| || +

Sbjct:    77 EAEFKAAEEVRLKTKPSDEEMLFYGHYKQATVGDINTERPGMLDFTGKAKWDANL
          256

Query:    98 KGAAREDFMKAKAYVKKVEELKKKFRIRETG 128
          || ++|| ||| |+ |||+|||+ | |||

Sbjct:    257 KGTSKEDAMKA--YINKVEELKKKYGI*ETG 343
```

表13に開示されるポリペプチドの、ウシおよびヒトのアシルc o - A結合タンパク質に対する関連性を示す複数の配列整列は、ClustalW分析として表15に示される。比較は、表12のポリペプチド(「DBI\_novel」)、ウシのアシルc o A - 結合タンパク質(SWISSPROT遺伝子座ACBP\_BOVIN, 登録P07107)(「ACBP\_bovin」)、ならびにACBP\_\_ヒトSWISSPROT遺伝子座ACBP\_\_HUMAN, 登録\_\_P07108(「ACBP\_\_Human」)である。完全な相同性の領域は、黒で示される。保存的アミノ酸置換を有する領域は、灰色で示される。非保存的アミノ酸置換は、陰影なしで示される。

【0095】

(表15)

【0096】

【表19】

```

DBI_novel  MAKPISTKNTKISRHWHAAYITAAREAEENHLSWEEKKKKKRCAGLKHFKTKPADDEW
ACBP_BOVIN -----SQAEEFKAAEE-----VHLLKTKPADDEW
ACBP_HUMAN -----SQAEEFKAAEE-----VRLKTKFSDEEW

DBI_novel  RLEIGHYKRAIVGNLKTTERPGMLDFKQKAKVDFWNLKCAAREDPMKAKATMKVEELKK
ACBP_BOVIN LFIYSHYKQATVGDINTTERPGMLDFKQKAKVDAWNELKGTSKED--ANKAYIDKVEELKK
ACBP_HUMAN LFIYGHYKQATVGDINTTERPGMLDFKQKAKVDAWNELKGTSKED--ANKAYINIKVEELKK

DBI_novel  MRRIRRETGIVASHAFVLN
ACBP_BOVIN KQD-----
ACBP_HUMAN KYD-----

```

本発明のENDO3核酸は、配列番号6を含むポリペプチドをコードする核酸（例えば、配列番号5に配列が示される核酸）を含む。本発明はまた、配列番号5の核酸のフラグメント、ならびに変異体または改変体核酸（これらの塩基のうちいずれかは、表12に示される対応する塩基から変化され得るが、エンドゼピン様活性および生理学的機能を維持するタンパク質を依然としてコードする）、またはこのような核酸のフラグメントを含む。本発明はさらに、ちょうど今記載された配列に相補的な配列の核酸（ちょうど今記載された核酸のうちいずれかに相補的な核酸フラグメントを含む）を含む。本発明はさらに、核酸または核酸フラグメント、あるいはそれらの相補体（これらの構造は、化学的改変を含む）を含む。このような改変としては、改変された塩基、および核酸（この糖リン酸骨格は、改変されるかまたは誘導体化される）が挙げられるがこれらに限定されない。これらの改変は、被験体における治療用途において、例えばこれらがアンチセンス結合核酸として使用され得るように、この改変された核酸の化学的安定性を少なくとも部分的に増大するために行われる。

#### 【0097】

本発明のENDO3タンパク質は、表13（配列番号6）に示されるアミノ酸配列を含む。本発明はまた、変異体または改変体タンパク質（これらの残基のうちいずれかは、表13に示される対応する残基から変化され得るが、エンドゼピン様活性および生理学的な機能を維持するタンパク質を依然としてコードする）、またはその機能的フラグメント（例えば、以下の活性ペプチド）を含む。

#### 【0098】

代謝調節ペプチド#3（MRP-3, 3s）配列（配列番号17）および：（

配列番号18)

RATVGNIKTERPGMVDFK GK (配列番号17)

RATVGNIKTERPGMVDFK - - (配列番号18)。

【0099】

本発明はさらに、ENDO3ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント(例えば、 $F_{ab}$ または $(F_{ab})_2$ )、ならびにそれらの誘導体およびフラグメントを含む。

【0100】

ENDO3配列は、特定の型の組織の検出に有用である。例えば、組織のパネルが発現についてアッセイされる場合、ENDO3は脂肪および骨格筋において高度に発現される。また、ENDO3の高い発現は、乳癌のマーカである。

【0101】

ENDO3配列はまた、血清インスリンまたは脂肪のレベルの変更による全体的なエネルギー代謝または体重の調節に有用である。

【0102】

ENDO3配列はまた、当該分野で一般に利用される多くの技術のいずれか1つによって、本発明の細胞レセプターおよび下流エフェクターを同定する方法において有用である。

【0103】

ENDO3配列は、代謝の調節による、糖尿病、肥満に付随する代謝障害、代謝症候群X、ならびに慢性疾患および種々の癌に付随する食欲不振および消耗障害の処置において有用である。

【0104】

(ENDO4)

本発明のENDO4核酸は、表16(配列番号7)に示される核酸配列を含む。表16に示される配列は、ORF、ならびにこのORFから上流および下流の推定非翻訳領域を含む。このORFは、ヌクレオチド11~13のatg開始コドンで始まり、そしてヌクレオチド299~301のtgaコドンで終わる。推定の上流および下流の非翻訳領域は、表16において下線によって示される。

【0105】

(表16)

【0106】

【表20】

TTGGTGGTAAATGCTCCTTTTGTGGTTTGTGGTTTCTTCCTTAAGGCTGATTTTGACAGGGC  
 TGCAGAAGATGTGAGGAAGCTGAAAGCAAGACCAGATGATGGAGAAGCTGAAAGAAGCTCTATGG  
 GCTTTACAAACAAGCAATAGTTGGAGACATTAATATTGCGTGTCCAGGAATGCTAGATTTAAA  
 AGGCAAAGCCAAATGGGAAGCATGGAACCTCAAAAAAGGGTTGTCGACGGAAGATGCGACGAG  
 TGCCTATATTTCTAAAGCAAAGGAGCTGATAGAAAAATACGGAATTTAGAAATACAGCA (配列)

:番号 7)

この開示される核酸配列(配列番号7)は、*Rana ridibunda* エンドゼピンmRNA (GENBANK - ID: RRU09205 | acc: U09205) と同一な256塩基のうち200個(78%)を有する。表16の配列と*Rana ridibunda*配列との間の関連性は、表17に示される。表16に示される配列の領域は、「Query」配列として列挙される。*Rana ridibunda* エンドゼピンmRNA配列の領域は、「Subject」配列として示される。

【0107】

(表17)

【0108】

【表21】

```

Query:   45 AGGCTGATTTTGACAGGGCTGCAGAAGATGTGAGGAAGCTGAAAGCAAGACCAGATGATG
104
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:  23 AGGCAGATTTTGACAAAGCAGCAGGGGATGTAAAGAAATTGAAAACAAAACCAACTGACG
82

Query:  105 GAGAACTGAAAGAAGCTCTATGGGCTTTACAAACAAGCAATAGTTGGAGACATTAATATTG
164
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:   83 ATGAACTGAAGGAAGCTGTACGGACTCTACAAGCAGTCCACTGTTGGGGACATAAATATAG
142

Query:  165 CGTGTCCAGGAATGCTAGATTTAAAAGGCAAAGCCAAATGGGAAGCATGGAACCTCAAAA
224
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:  143 AGTGTCCCTGGCATGCTAGATCTGAAGGGCAAAGCCAAATGGGACGCATGGAACCTAAAGA
202

Query:  225 AAGGTTTGTGACGGAAGATGCGACGAGTGCCTATATTTCTAAAGCAAAGGAGCTGATAG
284
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:  203 AAGGCTTGTCTAAGGAAGATGCGATGAGCGCTTATGTTTCTAAAGCCCATGAGCTGATAG
262

Query:  285 AAAAATACGGAATTTA 300
      ||||| ||||| |||||
Sbjct:  263 AAAAATATGGCCTGTA 278

```

この開示される核酸配列（配列番号7）はまた、ヒトジアゼパム結合インヒビターmRNA（GENBANK - ID: HUMDBI | acc: M14200）と関連する。この開示される配列は、ヒトジアゼパムインヒビターmRNAに対して259残基のうち179個（69%）が同一である。この開示される配列とヒト配列との間の関連性は、表18に示される。表16に示される配列の領域は、「Query」配列として列挙される。ヒトmRNA配列の領域は、「Subject」配列として示される。

【0109】

（表18）

【0110】

【表22】



rogram P S O R T は、E N D O 4 タンパク質についての細胞外分泌の、中程度の可能性を予想する。

【0113】

表19に示されるポリペプチドは、以前に記載されたアシル-c o A 結合タンパク質およびジアゼパム結合インヒビタータンパク質に関連する。表20は、表19のアミノ酸配列が、*Anas platyrhynchos*由来の103アミノ酸残基のタンパク質 ( p t n r : S W I S S P R O T - A C C : P 4 5 8 8 2 ) と同一の89アミノ酸残基のうち71個 ( 7 9 % ) を有し、そしてこのアミノ酸残基とポジティブな89残基のうち78個 ( 8 7 % ) を有することを示す。表19に示されるポリペプチド配列の領域は、「Q u e r y 」配列として示される。*Anas platyrhynchos*配列の領域は、「S b j c t 」配列として示される。

【0114】

(表20)

【0115】

【表24】

```

Query:   35 FFL-KADFDRAAEDVRKLRPDDGELKELYGLYKQAIVGDINIECPGMLDLKGGKAKWEA
211
      ||| +[||| |||+|+||| || | ||||| |||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:   15 FFLHQADFDEAAEEVKLKRPTDEELKELYGFYKQATVGDINIECPGMLDLKGGKAKWEA
74
.
Query:   212 WNLKKGLSTEDATSAYISKAKELIEKYGI 298
      |||||+| ||| +||||| ||| ++|||
Sbjct:   75 WNLKKGISKEDAMNAYISKAKTMVEKYGI 103

```

表20Aは、表19のアミノ酸配列が、*Rana ridibunda*ジアゼパム結合インヒビター ( D B I ) に対して相同性を有することを示す。表19に示されるポリペプチド配列の領域は、「Q u e r y 」配列として示される。*Rana ridibunda*ジアゼパム結合インヒビター ( D B I ) 配列の領域は、「S b j c t 」配列として示される。

【0116】

(表20A)

【0117】

【表25】

```

>gb:GENBANK-ID:RRU09205|acc:U09205 Rana ridibunda diazepam-binding
inhibitor (DBI) mRNA, complete cds - Rana ridibunda, 470 bp.
Length = 470

Plus Strand HSPs:

Score = 365 (128.5 bits), Expect = 6.0e-32, P = 6.0e-32
Identities = 68/85 (80%), Positives = 76/85 (89%), Frame = +1

Query:   12 KADFDRAAEDVRKLRKRPDDGELKELYGLYKQAIVGDINIACPGMLDLKGGKAKWEANLKK
71
      +ADFD+AA DV+KLK +P D ELKELYGLYKQ+ VGDINI CPGMLDLKGGKAKW+ANLKK
Sbjct:   22 QADFDKAAGDVKKLKTPTDDELKELYGLYKQSTVGDINIECPGMLDLKGGKAKWDANLKK
201

Query:   72 KGLSTEDATSAYISKAKELIEKYGI 96
      KGLS EDA SAY+SKA ELIEKYG+
Sbjct:   202 KGLSKEDAMSAYVSKAHELIEKYGL 276

```

表18に示されるポリペプチド配列と先に記述されたジアゼパム結合インヒビターまたはアシル-c o A結合ポリペプチドとの間の整列が、表21に示される。表19に示されるアミノ酸配列は、「ba271m1\_\_A」と表現される。88アミノ酸カエルアシルc o - A結合タンパク質アミノ酸配列(PIR-ID:A57711)が、「A57711\_\_ACBP\_\_Frog」によって示される: 88アミノ酸ヒトアシルc o - A結合ポリペプチド(PIR-ID:NZHU)配列は、「NZHU\_\_ACBP\_\_Human」によって示される。103アミノ酸アヒルエンドゼピンアミノ酸配列(SWISSPROT-ACC:\_\_45882)は、「P45882\_\_endozepine\_\_Duck」によって示される。保存的アミノ酸置換を含む領域が、灰色で示される。非保存的アミノ酸置換は、影付きがなく表されている。

【0118】

【表26】

表 21

|                        |   |
|------------------------|---|
| ba271ml_A              | -----MLLI F K C L F L K A D F E R A A E D W R K L K A F D D G E L K E L Y G L Y K O A I V G D I N I A F   |
| AS7711_ACBP_Frog       | -----M S P Q A D F E K A A G D W R K L K T P T D E E L K E L Y G L Y K Q S T U G D A I E C                |
| P45882_Endozopins_Duck | MFQAHLRGT L T S F F E H Q A D F E D A A E E W R K L K T P T D E E L K E L Y G F Y K Q A T V G E I N I E E |
| NZHU_ACBP_Human        | -----M S D A F E K A A E E W R H L K T P T D E E L F F Y G H K Q A T V G N I T E R                        |
|                        |   |
| ba271ml_A              | P G M L D I E G K A K W E A W N L K K G L S T E D A T S A Y I S K A K E L I E K V G I                     |
| AS7711_ACBP_Frog       | P G M L D I K G K A K W E A W N L K K G L S K E D A M S A Y I S K A H E L I E K Y G I                     |
| P45882_Endozopins_Duck | P G M L D I E G K A K W E A W N L K K G L S K E D A M N A Y I S K A K I E E K V G I                       |
| NZHU_ACBP_Human        | P G M L F T E K A K W E A W H E L K G T S K E D A M K A Y I N K Y E E L K R Y G I                         |

本発明の E N D O 4 核酸は、配列番号 8 のアミノ酸を含むポリペプチドをコードする核酸を含む。例えば、E N D O 4 核酸は、表 1 6 に開示される配列（配列番号 7 ）を含む得る。本発明はまた、配列番号 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸のフラグメントを含む。本発明はまた、変異体核酸または改変体核酸またはこのような核酸のフラグメントを含み、これらの変異体核酸または改変体核酸の塩基のいずれかは、表 1 6 に示される対応する塩基から変化され得るが、この変異体または改変体核酸は、そのエンドゼピン様活性およびおよび生理学的機能を維持するタンパク質をコードする。本発明はさらに、それらの配列が、ちょうど記載された核酸のいずれかに相補的な核酸を含み、ちょうど記載された核酸のいずれかに相補的な核酸フラグメントを含む。本発明はさらに、核酸または核酸フラグメント、あるいはその相補体を含み、それらの構造は、化学改変を含む。このような改変としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：改変塩基、および核酸であって、それらの糖ホスフェート骨格が改変または誘導体化された、核酸。これらの改変は、少なくとも部分的に、改変された核酸の化学的安定性を増強するために実施され、その結果、それらは、例えば、被験体における治療適用でのアンチセンス結合核酸として使用され得る。

【 0 1 1 9 】

本発明の E N D O 4 タンパク質は、そのアミノ酸配列が表 1 9 （配列番号 8 ）に示されるタンパク質を含む。本発明はまた、変異体タンパク質または改変体タンパク質または以下のような活性ペプチドのような機能的フラグメントを含み、これらの変異体タンパク質または改変体タンパク質の残基のいずれかは、表 1 6

に示される対応する塩基から変化され得るが、この変異体タンパク質または改変体タンパク質は、そのエンドゼピン様活性およびおよび生理学的機能を維持するタンパク質をなおもコードする：

代謝調節ペプチド# 4 (MRP - 4 , 4 s ) 配列：

【0120】

【化1】

QAIVGDINIACPGMLDLK GK ( 配列番号 :19)

QAIVGDINIACPGMLDLK-( 配列番号 :20)

本発明はさらに、ENDO 4 ポリペプチド、ならびにその誘導体およびフラグメントに免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント（例えば、 $F_{ab}$ または $(F_{ab})_2$ など）を包含する。

【0121】

ENDO 4 配列は、組織の特定の型を検出するための有用である。例えば、組織のパネルが、発現についてアッセイされる場合、ENDO 4 は、造血組織において高度に発現される。

【0122】

ENDO 4 配列はまた、血清インスリンおよびグルコースを変化させることによって全体的なエネルギー代謝または重量を調節するために有用である。

【0123】

ENDO 4 配列はまた、当該分野で一般に使用される多くの技術のいずれか1つによって、本発明の細胞レセプターおよび下流エフェクターを同定するための方法において有用である。

【0124】

ENDO 4 配列は、糖尿病、肥満に関連する代謝障害、代謝症候群Xならびに慢性疾患に関連する食欲不振および消耗病および種々の癌の、代謝を調節することによる処置において有用である。

## 【0125】

## (ENDO5)

本発明に従うENDO5核酸は、表25に示される核酸配列(配列番号9)を含む。ORF、ならびにORFの上流および下流の推定非翻訳領域が、開示された配列に存在する。このORFは、ヌクレオチド7~9のatg開始コドンで始まり、そしてヌクレオチド265~267のtagコドンで終わる。この推定上流および下流の非翻訳領域が、表22の下線によって示される。

## 【0126】

## 【表27】

表 22

ACCACCATGGCACTGCAGGCTGAATTCGACAAGGCTGCAGAAGACGTGAGGAAGCTGCCAACA  
 AGACCAGCAGATAATAAAGAACTGAAAAACTCGATGGACTTTACAAACAAGCTATAATTGGA  
 GACATTAATATTGAGTATCTGGGAATGCTGGACTTTAAGGGCAAGGCCAAATGCCGAGCATGG  
 ACCCTCCAAAAAAGGTTGTCAAAGGAAGATGCAACGAGTGTCTCTATTTCTAAGGCCAAAAGAG  
 CCGATAGAAAAATAGGACATTTAGAATA (配列番号 9)

ENDO5核酸配列(配列番号9)は、Rana ridibundaエンドゼピンmRNA(GENBANK-ID:RRU09205 acc:U09205)と同一の、274ヌクレオチドのうち199(72%)を有する。これらのヌクレオチド配列の比較を表23に示す。表22に開示される配列は、「Query」配列として表され、そしてRana ridibundaエンドゼピンmRNA配列は、「Subject」配列として表される。

## 【0127】

## 【表28】

## 表 23

```

Query:   2 CCACCATGGCACTGCAGGCTGAATTCGACAAGGCTGCAGAAGACCTGAGGAAGCTGCCAA 61
          | ||||| ||| ||||| || || ||||| || ||||| || || || ||| || ||
Sbjct:   8 CAACCATGTCACCCAGGCAGATTTGACAAAGCAGCAGGGGATGTAAGAAATTGAAA 67

Query:   62 CAAGACCAGCAGATAATAAAGAACTGAAAAAACTCGATGGACTTTACAAACAAGCTATAA 121
          ||| ||||| || || ||||| |||| || ||||| ||||| || || |
Sbjct:   68 CAAACCAACTGACGAT---GAACTGAAGGAACGTACGGACTCTACAAGCAGTCCACTG 124

Query:   122 TTGGAGACATTAATATTGAGTATCTCGGAATGCTGGACTTTAAGGGCAAGGCCAAATGCG 181
          ||||| ||||| ||||| ||||| || || ||||| || || ||||| ||||| || ||
Sbjct:   125 TTGGGGACATAAATATAGAGTGTCTCGGCATGCTAGATCTGAAGGGCAAGGCCAAGTGGG 184

Query:   182 CAGCATGGACCCTCCAAAAAGG-TTGTCAAAGGAAGATGCAACGAGTGTCTCTATTCT 240
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:   185 ACGCATGGAACCTA-AAGAAAGGCTTGCTAAGGAAGATGCGATGAGCGCTTATGTTCT 243

Query:   241 AAGGCAAAGAGCCGATAGAAAAATAGGACATTTA 275
          || || | ||||| ||||| ||||| || || ||
Sbjct:   244 AAAGCCCATGAGCTGATAGAAAAATATGGCCTGTA 278

```

ENDO5 核酸配列 ( 配列番号 9 ) はまた、Homo sapiens エンドゼピン mRNA ( GENBANK - ID : HUMEDZ acc : M15887 ) と同一の、262ヌクレオチドのうち173 ( 66% ) を有する。これらのヌクレオチド配列の比較を表24に示す。表22に開示される配列は、「Query」配列として表され、そしてヒトエンドゼピン mRNA 配列は、「Sbjct」配列として表される。

【0128】

【表29】

表 24

```

Query:  16 CAGGCTGAATTCGACAAGGCTGCAGAAGACGTGAGGAAGCTGCCAAC-AAGACCAGCAGA 74
         ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:  64 CAGGCTGAGTTTGAGAAAGCTGCAGAGGAGTTAGGCACCTTAAGACCAAG-CCATCGGA 122

Query:  75 TAATAAAGAA-CTGAAAAAAGCTCGACTGGACTTTACAAACAAGCTATAATTGGAGACATTA 130
         ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 123 TGAGGA-GATGCTGTTTCAT-CT--ATGGCCACTACAAACAAGCAACTGTGGGGACATAA 178

Query: 134 ATATTGAGTATCTGGGAATGCTGGACTTTAAGGGCAAGGCCAAATGCGCAGCATGGACCC 192
         ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 179 ATACAGAACGGCCCGGGATGTTGGACTTCACGGGCAAGGCCAAGTGGGATGCCTGGAATG 238

Query: 194 TCCAAAAAAGGTTGTCAAAGGAAGATGCAACGAGTGTCTCTATTTCTAAGGCCAAAAGAGC 253
         ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 239 AGCTGAAAGGGACTTCCAAGGAAGATGCCATGAAAGCTTACATCAACAAAGTAGAAGAGC 298

Query: 254 CGATAGAAAAA-TAGGACATTI-AGA 277
         ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 299 TAA-AGAAAAAATACGGGATATGAGA 323

```

表 2 2 に同定される O R F は、 8 6 アミノ酸残基のポリペプチド ( 配列番号 1 0 ) をコードする。コードされたポリペプチドのアミノ酸配列が、表 2 5 に示される。

【 0 1 2 9 】

【表 3 0 】

表 25

MALQAEFDKAAEDVVRKLPTRPADNKELKKLDGLYKQAIIGDINIEYLGMLDFKGGKAKCAAATL  
 QKRLSKEDATSVSISKAKEPIEK ( 配列番号 10 )

表 2 5 に示されるコードされたポリペプチド ( 配列番号 1 0 ) は、 *Rana ridibunda* ( p t n r : P I R - I D : A 5 7 7 1 1 ) 由来の 8 8 アミノ酸ジアゼパン結合インヒビタータンパク質と、同一の、 8 6 アミノ酸残基の 5 7 ( 6 6 % )、および 8 8 アミノ酸ジアゼパン結合インヒビタータンパク質とポジティブの 8 6 残基の 6 7 ( 7 7 % ) を有する。これらの配列の整列を表 2 6 に示す。これらのアミノ酸配列の比較を表 2 6 に示す。表 2 5 に開示される配列は、「 Q u e r y 」配列として表され、そして *Rana ridibunda* エンドゼピンポリペプチド配列は、「 S b j c t 」配列として表される。

【0130】

【表31】

表 26

|        |     |  |     |
|--------|-----|--|-----|
| Query: | 7   | MALQAEFDKAAEDVRKLPTRPADNKELKIKLDGLYKQAIIGDINIEYLGMLDFKGGKAKCAA | 186 |
|        |     | +   +        +    +    +   +        + +                        |     |
| Sbjct: | 1   | MSPQADFKAAGDVKKLKTPTD-ELKELYGLYKQSTVGDINIECPGMLDLKGGKAKWA      | 59  |
| Query: | 187 | WTLQKRLSKEDATSVSISKAKEPIEK                                     | 264 |
|        |     | +          +   |     |
| Sbjct: | 60  | WNLKKGLSKEDAMSAYVSKAHELIEK                                     | 85  |

先に記載したエンドゼピン配列に対する表25に示されるポリペプチド配列の関連性を示す整列を表27に示す。表25の86アミノ酸ポリペプチドは「c i t b \_ e l \_ 2 5 4 0 m 1 0 \_ A」として示される。表に存在する他のエンドゼピンポリペプチド配列は、カエルジアゼピン結合インヒビターDBI (PIR-ID: A57711 (「A57711」)) のアミノ酸配列、103アミノ酸配列アヒルポリペプチド (SWISSPROT-ACC: P45882) (P45882\_\_Duck\_\_DB1)、および87アミノ酸ヒトポリペプチド (NZHU\_\_Human\_\_DBI) を含む。保存的アミノ酸置換を有する領域が、灰色で示される。非保存的アミノ酸置換が影付きがなく表されている。

【0131】

【表32】

表 27

|                   |   |
|-------------------|---|
| A57711_Frog_DBI   | .....MSPQADFKAAGDVKKLKTPTD-ELKELYGLYKQSTVGDINIE           |
| P45882_Duck_DBI   | MFQAHLRGTLTLSFFSHDADFDEPAEIVKLLKTPD-EEELKELYGFKQATVGDINIE |
| NZHU_Human_DBI    | .....MSQAEFDKAAEDVRKLPTRPADNKELKIKLDGLYKQAIIGDINIE        |
| citb_s1_2540m10_A | .....MALQAEFDKAAEDVRKLPTRPADNKELKIKLDGLYKQAIIGDINIE       |
| A57711_Frog_DBI   | CPGMLDLKGGKAKWAANNLKKGLSKEDAMSAYVSKAHELIEKYG              |
| P45882_Duck_DBI   | CPGMLDLKGGKAKWAANNLKKGLSKEDAMNAYVSKAHELIEKYG              |
| NZHU_Human_DBI    | RPGMLDFTGGKAKWAANNLKKGLSKEDAMKAYVSKAHELIEKYG              |
| citb_s1_2540m10_A | YLGMLDFKGGKAKCAAANNLQKRLSKEDATSVSISKAKEPIEK---            |

PSORTプログラムを使用して、開示されたENDO5タンパク質は、0.6500の確実さで細胞質に局在化することが期待される。SIGNALPプロ

グラムを使用する分析において、ENDO5タンパク質は、シグナルペプチドを有さないことが予測される。

#### 【0132】

本発明は、配列番号10のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするENDO5核酸(例えば、配列番号9のヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含む核酸)を含む。本発明はまた、変異体核酸または改変体核酸またはこのような核酸のフラグメントを含み、これらの変異体核酸または改変体核酸の塩基のいずれかは、表22に示される対応する塩基から変化され得るが、この変異体または改変体核酸は、そのエンドゼピン様活性およびおよび生理学的機能を維持するタンパク質をコードする。本発明はさらに、それらの配列が、先に記載された核酸に相補的な核酸を含み、先に記載された核酸のいずれかに相補的な核酸フラグメントを含む。本発明はさらに、核酸または核酸フラグメント、あるいはその相補体を含み、それらの構造は、化学改変を含む。このような改変としては、非限定的な例として、以下が挙げられる：改変塩基、および核酸であって、それらの糖ホスフェート骨格が改変または誘導体化された、核酸。これらの改変は、少なくとも部分的に、改変された核酸の化学的安定性を増強するために実施され、その結果、それらは、例えば、治療適用でのアンチセンス結合核酸として使用され得る。

#### 【0133】

本発明のENDO5タンパク質は、その配列が表25に示されるポリペプチド(配列番号10)を含む。本発明はまた、変異体タンパク質または改変体タンパク質、または以下の活性ペプチドのような機能的フラグメントを含み、これらの変異体タンパク質または改変体タンパク質の塩基のいずれかは、表25に示される対応する残基から変化され得るが、これらは、そのエンドゼピン様活性およびおよび生理学的機能を維持するタンパク質をなおもコードする：

代謝調節ペプチド#7(MRP-7)配列：

#### 【0134】

【化2】

## 1 QAIIGDINIEYLGMLDFKGG (配列番号 21)

本発明はさらに、ENDO5ポリペプチド、ならびにその誘導体およびフラグメントに免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント（例えば、 $F_{ab}$ または $(F_{ab})_2$ など）を包含する。

## 【0135】

ENDO5配列は、組織の特定の型を検出するための有用である。例えば、組織のパネルが、発現についてアッセイされる場合、ENDO5は、脂肪組織および造血組織において高度に発現される。

## 【0136】

ENDO5配列はまた、血清コレステロールおよびグルコースを変化させることによって全体的なエネルギー代謝または重量を調節するために有用である。

## 【0137】

ENDO5配列はまた、当該分野で一般に使用される多くの技術のいずれか1つによって、本発明の細胞レセプターおよび下流エフェクターを同定するための方法において有用である。

## 【0138】

ENDO5配列は、糖尿病、肥満に関連する代謝障害、代謝症候群Xならびに慢性疾患に関連する食欲不振および消耗病および種々の癌の、代謝を調節することによる処置において有用である。

## 【0139】

## (ENDO6)

本発明のENDO6核酸は、表27Aに示される核酸配列（配列番号22）を含む。

## 【0140】

## 【表33】

表 27A

1  
 GGG ATGTTCCAGTTTCATGCAGGCTCTTGGGAAAGCTGGTGCCTGCTGCTGCCCTGATTCCC GCCGACAGACCTTGGGACCG  
 81  
 AGA CCAACACTGGCAGCTGGAGATGGCGGACACGAGATCCGTGCACGAGACTAGGTTTGAGGCGGCCGTGAAGGTGATCC  
 161  
 GAA GTTTGCCGAGAATGGTTTATTCCAGCCAACAATGAAATGATGCTTAAATTTTATAGCTTCTATAAGCAGGCAACT  
 241  
 TGA GGACCCTGTAAACTTTCAAGGCCTGGATTTGGGATCCTATTGGAAGATATAAATGGGATGCTTGGAGTTCACTGGG  
 321  
 AAG TATGACCAAAGAGGAAGCCATGATGTCATATGTTGAAGAAATGAAAAAGATTATGAAACTATGCCAATGACTGAGA  
 401  
 ACC TTGAAGAATTGCTGCGTGTATAGTCCATTTTATGAAATGTCGAGGACAAAAGAGTGGCAGGAGTTCTGATATA  
 481  
 CGT TCAGTCCGACTGGAGAAAATCTCTAAATGTTAGAAGATCTTGGTAATGTTCTCACTTCTACTCCAACGCCAAAAC  
 561  
 AAC TAATGGTAAAGCTGAAAGCAGTGACAGTGGAGCGGAGTCTGAGGAAGAAGAGGCCCAAGAAGAAGTGAAACGAGCAG  
 641  
 GAT ACAGTGATAATGATAAGAAAATGATGAAGAAGTCAGCAGACCATAAGAATTTGGAAGTCATTGTCACTAATGGCTAT  
 721  
 AAA AAAGATGGCTTTGTTTCAGGATATACAGAATGACATTTCATGCCAGTCTTCCCTGAATGCCAGAAGCACTGAAGAAGT  
 801  
 AAG GCCCATTTGATGAAAACCTGGGGCAAACCTGGAAAATCTGCTGTTTGCATTACCAAGGTATTAATGATGATCATGTTG  
 881  
 GAA ATGTTACAGGAATTCAGCATTGACAAGCGATTCAGACAGTGAAGTTTACTGTGATTCTATGGAACAATTTGGACAA  
 961  
 AAA GAGTCTTTAGACAGCTTTACGTCCAACAATGGACCATTTCAGTATTACTTGGGTTGGTTCATCCAGTCAACCCATGGA  
 1041  
 GAA TTCTGGATTTGCTGAAGATATTCAGTACCTCCTGGAATGGCAACATTGGGAATATGCAGGTGGTTGCAGTTGAAG  
 1121  
 ACT AAGGTGAAGTCAAGCATGGAGGAGAAGATGGCAGGAATAACAGCGGAGCACCACCCGGGAGAAGCGAGGCGGAGAA  
 1201  
 GGG GACGAATTCCTAATGTTAGAAGAGGAAGAGTTCATAGGATGCAACACTTGAGCGAAGGAACCAAGGGCCGGCAGGT  
 1281  
 TGA AAGTGGAGGTGATGGGGAGCGCTGGGGCTCCGACAGAGGGTCCCGAGGCAGCCTCAATGAGCAGATCGCCCTCGTGC  
 1361  
 ACA TGAGACTGCAGGAGGACATGCAGAATGTCCTTCAGAGACTGCAGAACTGGAAACGCTGACTGCTGCAAAATCATCA  
 1441  
 GCT TCAACATTGCAGACTGCTCCTCAGCCACCTCATCTCAGAGACCATCTTGGTGGCCCTTCGAGATGTCCTCGGTGT  
 1521 AACGTTTGCCATCATATGGCCTTTTATGACAGTGGTGGTGTATTTATACTATCAAAGAAGGAGAAGGTTA

(西研番号 22)

表 27A に示される核酸配列は、太字で示される開始コドンおよび終止コドン  
を有する位置 1 で始まるオープンリーディングフレーム (「ORF」) を含む。

このORDは、530アミノ酸残基のポリペプチド配列をコードする。このコードされたポリペプチドの配列（配列番号23）を表27Bに示す。翻訳されたタンパク質とウシエンドゼピン（ベンゾジアゼピンレセプターの推定リガンド）関連タンパク質（gb: GENBANK - ID: BOVEDZR acc: M15888）との間の相同性を表27に示す。

【0141】

【表34】

表 27B

|            |   |
|------------|---|
| 1          | MFQFHAGSWESWCCCLIPADRPWDRGQHWQLEMADTRSVHETRFEA AVKVIQSLPKNGSFQPTNEMMLKFYSFYKQ           |
| <u>ATE</u> |   |
| 81         | <u>GFCKLSRPGFWQPIGRYKWDAMSSLGDMTKKEAMIA YVEEMKKI IETMPMTEKVEERLLRVIGFFYEIVEDKKSGRSS</u> |
| DIT        |   |
| 161        | SVRLEKISKCLEDLGNVLTSTPNAKT VNGKAESSDSGAESZEEEAQE EVKGAEHSDNDKKMMKKSADHIQNLVIVTN         |
| GYD        |   |
| 241        | KDGFVQDIQNDIHASSLN GRSTEEVKPIDENLGQTGKSAVCTHQGINDDHVEDVTGIQH LTSDDSEVYCDOSMEQF          |
| GQE        |   |
| 321        | ESLDSFTSNNGPFQYYLGGHSSQPMENSGFREDIQVPPGNIGNMQVVAVEGKGEVKHGGEDGRNNSGAPHREKRG             |
| GET        |   |
| 401        | DEFSNVRRGRGHRMQHLS EGTKGRQVGGGGERWGS DRGSRGSLNEQIALVLMRLQEDMQNVLQRLQKLETLTAAK           |
| SST        |   |
| 481        | STLQTAPOPTSSQRPSWPFEMSPGVLTFALIWP FIAQWLVLVLYYQRRR (配列番号23)                             |

翻訳されたタンパク質 - フレーム：1 - ヌクレオチド1 ~ 1590

【0142】

【表35】

表 27C

>gb:GENBANK-ID:BOVEDZR|acc:M15888 Bovine endozepine (putative ligand of benzodiazepine receptor) related protein mRNA, complete cds - Bos taurus, 1750 bp.  
 Length = 1750

Plus Strand HSPs:

Score = 2401 (845.2 bits), Expect = 2.9e-248, P = 2.9e-248  
 Identities = 448/530 (84%), Positives = 481/530 (90%), Frame = +2

```

Query:      1 MFQFHAGSWESWCCCC-LIPADRPWDRGQHMQLEMADTRSVHETRFEAAVKVIQSLPKNG
  59
      |||
Sbjct:     68 MFQFHAGSWESWCCCCCLIPGDRPWDRGRRWLEMRHTRSVHETRFEAAVKVIQSLPKNG
 247

Query:     60 SFQPTNEMMLKFYSFYKQATEGPKLSRPGFWDPIGRYKWDAWSLQDMTKREAMIAYVE
 119
      |||
Sbjct:    248 SFQPTNEMMLKFYSFYKQATEGPKLSKPGFWDVPGRYKWDAWSLQDMTKREAMIAYVE
 427

Query:    120 EMKKIETMPMTEKVEELLRVIGPFYVEIVEDKKSGRSSDITSVRLEKISKCLEDLGNVLT
 179
      |||
Sbjct:    428 EMKKIETMPMTEKVEELLRVIGPFYVEIVEDKKSGRSSDLTSVRLEKISKCLEDLGNVLA
 607

Query:    180 STPNAKTVNGKAESSDSGAESEEEEAQEEVKGAEHSNDKMMKKSADHKNLRIIVTNGY
 239
      |||
Sbjct:    608 STPNAKTVNGKAESSDSGAESEEEEAQEDPKRPEPRDSKMMKKSADHKNLRIIVTNGY
 787

Query:    240 DKDGFVQDIQNDIHASSSLNGRSTEEVKPIDEMLGGQTGKSAVCINQGINDDHVEDVTGIQ
 299
      |||
Sbjct:    788 DKDSFVQGVQNSIHTSFLNGRCTREVKSVDENLEQTKTVVVFVQDQVNSDHDVEDISGIIQ
 967

Query:    300 HLTSDSSEVYCDSEMQFGQEESLDSFTSNNGPFQYYLGGHSSQPMENSGFRIDIQVPPG
 359
      |||
Sbjct:    968 HLTSDSSEVYCDSEMQFGQEESLDGFI SNNGPFSYYLGGNPSQPLRSSGFPEAVQGLPG
 1147

Query:    360 NGNIGNMQVAVVEGKGEVKHGGEGRNNSGAPHREKRGGEIPEFSNVRRGRGRMQHLSLSE
 419
      |||
Sbjct:   1148 NGSPEDMQGAVVEGKGEVKHGGEEDGGSNSGAPHREKRAGESEEFNSNIRRGGRGRMQHLSLSE
 1327

Query:    420 GIKGRQVSGSGDGERWSDRGRGSLNEQIALVLMRLQEDMQNVLQRLQKLETLTAAKSS
 479
      |||
Sbjct:   1328 GSKGRQVSGSGDGERWSDRGRGSLNEQIALVLMRLQEDMQNVLQRLHKL EMLAASQAK
 1507

Query:    480 TSTLQTAPOPTSSQRPSWPFEMSPGVLTFAIWPFFIAQNLVLYYQRRRR 530
      |||
Sbjct:   1508 SSALQTSNQPTSP-RPSWPFEMSPGALTFAIWPFFIAQNLVHLYYQRRRR 1657
  
```

本発明の ENDO6 核酸は、配列番号 23 のポリペプチドをコードする核酸を含み得る（例えば、ENDO6 核酸は、配列番号 22 の核酸配列を含み得る）。本発明はまた、変異体または改変体の核酸を含み、それらの塩基のいずれかが、表 27A において示された対応する塩基から変化され得る。いくつかの実施形態において、ENDO6 核酸、またはそのような核酸のフラグメントは、そのエン

ドゼピン (endozepine) 様活性および生理学的機能を維持するタンパク質をコードする。本発明はさらに、配列が、ここで記載された核酸に対して相補的である核酸を含む (ここで記載された核酸のいずれかに対して相補的である核酸フラグメントを含む)。本発明はさらに、構造が化学的な変化を含む、核酸または核酸フラグメント、あるいはそれに対する相補鎖を含む。そのような変化は、糖リン酸骨格が変化または誘導される、塩基、および核酸の変化を含むが、これらに限定されない。これらの変化は、少なくとも部分的に変化した核酸の化学的な安定性を増強するために実施され、その結果、例えば、それらの核酸は、被験体における治療適用においてアンチセンス結合核酸として使用され得る。

#### 【0143】

本発明のENDO6ポリペプチドは、配列番号23のアミノ酸配列を含み得る。本発明はまた、変異体タンパク質または改変体タンパク質を含み、それらの残基のいずれかは、配列番号23において示された対応する残基から変化され得るが、一方、そのエンドゼピン様活性および生理学的機能を維持するタンパク質、あるいはその機能的フラグメント (例えば、活性ペプチド (配列番号24)) をなおコードしている。

#### 【0144】

代謝調節ペプチド番号8 (MRP-8) 配列:

Q A T E G P C K L S R P G F W D P (配列番号24)。

#### 【0145】

本発明はさらに、ENDO6ポリペプチド、ならびにその誘導體およびフラグメントに対して免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント (例えば、F<sub>a,b</sub>または(F<sub>a,b</sub>)<sub>2</sub>) を包含する。

#### 【0146】

ENDO6配列は、特定の型の組織の検出に有用である。例えば、組織の集団が発現についてアッセイされる場合、ENDO6は、骨格筋において高度に発現される。また、ENDO6の高発現は、多数の型の癌のためのマーカーである。

#### 【0147】

ENDO6配列はまた、血清コレステロールおよびインスリンを変更すること

によって全体的なエネルギー代謝または体重を調節するために有用である。

【0148】

ENDO 6 配列はまた、当該分野において一般的に使用される多くの技術のいずれか1つによって本発明の細胞レセプターおよび下流エフェクターを同定する方法において有用である。

【0149】

ENDO 6 配列は、代謝を調節することによる、糖尿病、肥満に関連する代謝障害、代謝症候群Xならびに慢性疾患に関連する食欲不振および消耗障害および種々の癌の処置において有用である。

【0150】

(ENDO 7)

本発明のENDO 7 核酸は、表27Dにおいて示された核酸配列(配列番号25)を含む。

【0151】

【表36】

表27D

```

1      CCAGTATGTCTCAGGCGTTTGAGAAAGCTGCCAAGGATATTAAGCACCTTGAGACCAAGCCAGCAGATGATGAGAGC
ATG
81     TTCATCTACAGCCGCTGCAAACAAGCGACTGTGCATGACTTAAATACAGAATGGCCCAGGATGTTAGACCTCAAAGG
CAA
161    GGCAAAGCAGGATGCTTGGGAATGAGCTGAAAGACACTGCCAAGGAAGATGCTGTGAAAGCTGATATCAACAAAGTAG
AAG
241    AGCGAAATAAAAAATACAGAATATAAGAGATTG
(配列番号25)

```

表27Dにおいて開示された核酸配列は、6位から開始されるオープンリーディングフレーム(「ORF」)(太字で示された開始コドンおよび終止コドンを有する)を含む。このORFは、86アミノ酸残基のポリペプチド配列をコードする。このコードされたポリペプチドの配列は、表27Eにおいて示される(配列番号26)。翻訳されたタンパク質とウシエンドゼピン(ベンゾジアゼピンレセプターの推定リガンド)(gb:GENBANK-ID:BOVEDZ|ac

c : M15886) との間の相同性は、表27Fに示される。

【0152】

【表37】

表27E

```

1      MSQAFEKAAKDIKHLETKPADDERMFIYSRCKQATVHDLNTEWPRMLDLKGGKAKQDAWNELKDTAKEDAVKADINKV
EER
81     NKKYRI (配列番号26)

```

【0153】

【表38】

表27F

```

>gb:GENBANK-ID:BOVEDZ|acc:M15886 Bovine endozepine (putative ligand of
benzodiazepine receptor) mRNA, complete cds - Bos taurus, 608 bp.
Length = 608

Plus Strand HSPs:

Score = 307 (108.1 bits), Expect = 6.5e-26, P = 6.5e-26
Identities = 62/87 (71%), Positives = 73/87 (83%), Frame = +2

Query:      1 MSQA-FEKAAKDIKHLETKPADDERMFIYSRCKQATVHDLNTEWPRMLDLKGGKAKQDAWN
59
           |||| |+|||+++|||+|||+| +||| ||||| |+||| | ||| ||||| ||||
Sbjct:     125 MSQAQFDKAAAEVVKHLKTKPADEEMLFIYSHYKQATVGDINTERPGMLDFKGGKAKWDAWN
304

Query:      60 ELKDTAKEDAVKADINKVEERNKKYRI 86
           ||| |+|||+|| |+||| ||| |
Sbjct:     305 ELKGTSKEDAMKAYIDKVEELKKYGI 385

```

本発明のENDO7核酸は、配列番号26のポリペプチドをコードする核酸を含み得る（例えば、ENDO7核酸は、配列番号25の核酸配列を含み得る）。本発明はまた、変異体または改変体の核酸を含み、それらの塩基のいずれかが、表27Dにおいて示された対応する塩基から変化され得る。いくつかの実施形態において、ENDO7核酸、またはそのような核酸のフラグメントは、そのエンドゼピン様活性および生理学的機能を維持するタンパク質をコードする。本発明はさらに、配列が、ここで記載された核酸に対して相補的である核酸を含む（こ

ここで記載された核酸のいずれかに対して相補的である核酸フラグメントを含む)。本発明はさらに、構造が化学的な変化を含む、核酸または核酸フラグメント、あるいはそれに対する相補鎖を含む。そのような変化は、糖リン酸骨格が変化または誘導される、塩基、および核酸の変化を含むが、これらに限定されない。これらの変化は、少なくとも部分的に変化した核酸の化学的な安定性を増強するために実施され、その結果、例えば、それらの核酸は、被験体における治療適用においてアンチセンス結合核酸として使用され得る。

#### 【0154】

本発明のENDO7ポリペプチドは、配列番号26のアミノ酸配列を含み得る。本発明はまた、変異体タンパク質または改変体タンパク質を含み、それらの残基のいずれかは、配列番号26において示された対応する残基から変化され得るが、一方、そのエンドゼピン様活性および生理学的機能を維持するタンパク質、あるいはその機能的フラグメント(例えば、以下の活性ペプチド(配列番号27))をなおコードしている。

#### 【0155】

代謝調節ペプチド番号9(MRP-9)配列:

QATVHDLNTEWPRMLDLK GK(配列番号27)。

#### 【0156】

本発明はさらに、ENDO7ポリペプチド、ならびにその誘導體およびフラグメントに対して免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント(例えば、F<sub>ab</sub>または(F<sub>ab</sub>)<sub>2</sub>)を包含する。

#### 【0157】

ENDO7配列は、特定の型の組織の検出に有用である。例えば、組織の集団が発現についてアッセイされる場合、ENDO7は、脂肪組織において高度に発現される。また、ENDO7の高発現は、肝臓癌のためのマーカーである。

#### 【0158】

ENDO7配列はまた、血清コレステロールを変更することによって全体的なエネルギー代謝または体重を調節するために有用である。

#### 【0159】

ENDO7配列はまた、当該分野において一般的に使用される多くの技術のいずれか1つによって本発明の細胞レセプターおよび下流エフェクターを同定する方法において有用である。

【0160】

ENDO7配列は、代謝を調節することによる、糖尿病、肥満に関連する代謝障害、代謝症候群Xならびに慢性疾患に関連する食欲不振および消耗障害および種々の癌の処置において有用である。

【0161】

(ENDO8)

本発明のENDO8核酸は、表27Gにおいて示された核酸配列(配列番号28)を含む。

【0162】

【表39】

表27G

```

1
TGC ATGTGGGGCGACCTCTGGCTCCTCCCGCCTGCCTCTGCCAATCCGGGCACTGGGACAGAGGCTGAGTTTGAGAAAGC
81
CTG AGAGGAGGTTAGGCACCTTAAGACCAAGCCATCGGATGAGGAGATGCTGTTTCATCTATGGCCACTACAAACAAGCAA
161
AAA TGGGCGACATAAATACAGAACGGCCCGGATGTTGGACTTCACGGGCAAGGCCAAGTGGGATGCCTGGAATGAGCTG
241
GGGACTTCCAAGGAAGATGCCATGAAAGCTTACATCAACAAAGTAGAAGAGCTAAAGAAAAAATACGGGATATGA
(配列番号28)

```

表27Gにおいて開示された核酸配列は、1位から開始されるオープンリーディングフレーム(「ORF」)(太字の開始コドンおよび終止コドンを有する)を含む。このORFは、104アミノ酸残基のポリペプチド配列をコードする。このコードされたポリペプチドの配列は、表27Hにおいて示される(配列番号29)。翻訳されたタンパク質とヒトジアゼパム結合インヒビター(DBI)(gb:GENBANK-ID:HUMDBI|acc:M14200)との間の相同性は、表27Iに示される。

【0163】

## 【表40】

## 表27H

```

1
  MWGDLWLLPPASANPGTGTEAEFEKAAEEVRLKTKPSDEEMLFIYGHYQATVGDINTERFGMLDFTGKAKWDAWN
ELK
81  GTSKEDAMKAYINKVEELKKKYGI
(配列番号29)

```

【0164】

## 【表41】

## 表27I

```

>gb:GENBANK-ID:HUMDBI|acc:M14200 Human diazepam binding inhibitor (DBI)
mRNA, complete cds - Homo sapiens, 556 bp.
Length = 556

```

Plus Strand HSPs:

```

Score = 562 (197.8 bits), Expect = 6.7e-53, P = 6.7e-53
Identities = 104/104 (100%), Positives = 104/104 (100%), Frame = +2

```

```

Query:      1 MWGDLWLLPPASANPGTGTEAEFEKAAEEVRLKTKPSDEEMLFIYGHYQATVGDINTE
60
          |||
Sbjct:     20 MWGDLWLLPPASANPGTGTEAEFEKAAEEVRLKTKPSDEEMLFIYGHYQATVGDINTE
199

Query:      61 RPGMLDFTGKAKWDAWNELKGTSKEDAMKAYINKVEELKKKYGI 104
          |||
Sbjct:     200 RPGMLDFTGKAKWDAWNELKGTSKEDAMKAYINKVEELKKKYGI 331

```

本発明のENDO8核酸は、配列番号29のポリペプチドをコードする核酸を含み得る（例えば、ENDO8核酸は、配列番号28の核酸配列を含み得る）。本発明はまた、変異体または改変体の核酸を含み、それらの塩基のいずれかが、表27Gにおいて示された対応する塩基から変化され得る。いくつかの実施形態において、ENDO8核酸、またはそのような核酸のフラグメントは、そのエンドゼピン（endozepine）様活性および生理学的機能を維持するタンパク質をコードする。本発明はさらに、配列が、ここで記載された核酸に対して相補的である核酸を含む（ここで記載された核酸のいずれかに対して相補的である核酸フラグメントを含む）。本発明はさらに、構造が化学的な変化を含む、核酸

または核酸フラグメント、あるいはそれに対する相補鎖を含む。そのような変化は、糖リン酸骨格が変化または誘導される、塩基、および核酸の変化を含むが、これらに限定されない。これらの変化は、少なくとも部分的に変化した核酸の化学的な安定性を増強するために実施され、その結果、例えば、それらの核酸は、被験体における治療適用においてアンチセンス結合核酸として使用され得る。

#### 【0165】

本発明のENDO8ポリペプチドは、配列番号29のアミノ酸配列を含み得る。本発明はまた、変異体タンパク質または改変体タンパク質を含み、それらの残基のいずれかは、配列番号29において示された対応する残基から変化され得るが、一方、そのエンドゼピン様活性および生理学的機能を維持するタンパク質、あるいはその機能的フラグメント（例えば、以下の活性ペプチド（配列番号30））をなおコードしている。

#### 【0166】

代謝調節ペプチド番号1（MRP-1）配列：

1 QATVGDINTERPGMLDFTGK（配列番号30）。

#### 【0167】

本発明はさらに、ENDO8ポリペプチド、ならびにその誘導體およびフラグメントに対して免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント（例えば、F<sub>ab</sub>または（F<sub>ab</sub>）<sub>2</sub>）を包含する。

#### 【0168】

ENDO8配列は、特定の型の組織の検出に有用である。例えば、組織の集団が発現についてアッセイされる場合、ENDO8は、心骨格筋、肝臓および内皮組織において高度に発現される。また、ENDO8の高発現は、乳癌および結腸癌ならびにメラノーマのためのマーカーである。

#### 【0169】

ENDO8配列はまた、血清コレステロール、インスリン、またはグルコースを変更することによって全体的なエネルギー代謝または体重を調節するために有用である。ENDO8配列はまた、筋肉質量または脂肪レベルを調節するのに有用である。

## 【0170】

ENDO8配列はまた、当該分野において一般的に使用される多くの技術のいずれか1つによって本発明の細胞レセプターおよび下流エフェクターを同定する方法において有用である。

## 【0171】

ENDO8配列は、代謝を調節することによる、糖尿病、肥満に関連する代謝障害、代謝症候群Xならびに慢性疾患に関連する食欲不振および消耗障害および種々の癌の処置において有用である。

## 【0172】

## (ENDO9)

本発明のENDO9核酸は、表27Jにおいて示された核酸配列(配列番号31)を含む。

## 【0173】

## 【表42】

表27J

1  
 GAA ATGAGAGCCAGTCAGAAGGACTTTGAAAATTC AATGAATCAAGTGAAACTCTTGAAAAGGATCCAGGAAACGAAGT  
 81  
 TCA GCTAAAACCTCTACGCGCTATATAAGCAGGCCACTGAAGGACCTTGTAACATGCCCAAACCAGGTGTATTTGACTTGA  
 161  
 GTG ACAAGGCCAAATGGGACGCATGGAATGCCCTTGGCAGCCTGCCCAAGGAAGCTGCCAGGCAGAACTATGTGGATTG  
 241  
 TCT TCCAGTTTGAGTCCTTCATTTGGAATCCTCTAGTCAGGTGGAGCCTGGAACGACAGGAAATCAACTGGGTTTGAAAC  
 321  
 TGT GGTGGTGACCTCCGAAGATGGCATCACAAGATCATGTTCACCCGGCCAAAAAGAAAAATGCCATAAACACTGAGA  
 401  
 TAT ATCATGAAATTATGCGTGCACTTAAAGCTGCCAGCAAGGATGACTCAATCATCACTGTTTTAACAGGAAATGGTGAC  
 481  
 CGT TACAGTAGTGGGAATGATCTGACTAACTTCACTGATATCCCCCTGGTGGAGTAGAGGAGAAAGCTAAAAATAATGC  
 561  
 GCA TTTACTGAGGGAATTTGTGGGCTGTTTTATAGATTTTCCTAAGCCTCTGATTGCAGTGGTCAATGGTCCAGCTGTGG  
 641  
 CTA TCTCCGTCACCCCTCCTTGGGCTATTCGATGCCGTGTATGCATCTGACAGGGCAACATTTTCATACACCATTAGTCAC  
 721  
 TTT GGCCAAAGTCCGGAAGGATGCTCCTCTTACACTTTTCCGAAGATAATGAGCCCAAGGCAACAGAGATGCTTAT  
 801  
 AAG TGGAAAGAAGTTAACAGCGGAGAGGCATGTGCTCAAGGACTTGTACTGAAGTTTTCCCTGATAGCACTTTTCAGA  
 881  
 AGA AAGTCTGGACCAGGCTGAAGGCATTTGCAAAGCTTCCCCCAAATGCCCTTGAGAATTTCAAAGAGGTAATCAGGAAA  
 961  
 AAA GAGAGAGAAAACTACACGCTGTTAATGCTGAAGAAATGCAATGTCTTTCAGGGAAGATGGCTATCAGATGAATGCAC  
 1041 TGCTGTGGTGAACCTTCTTATCCAGAAAATCAAACTGTGA

(配列番号31)

表27Jにおいて開示された核酸配列は、1位から開始されるオープンリーディングフレーム(「ORF」)(太字の開始コドンおよび終止コドンを有する)を含む。このORFは、359アミノ酸残基のポリペプチド配列をコードする。このコードされたポリペプチドの配列は、表27Kにおいて示される(配列番号32)。翻訳されたタンパク質とヒトペルオキシソームD3, D2-エノイル-CoAイソメラーゼ(PECI)(gb:GENBANK-ID:AF153612|acc:AF153612)は、表27Lに示される。

【0174】

【表43】

表27k

1  
 DLV MRASQKDFENSMNQVKLLKKDPGNEVKLKLIALYKQATEGPCNMPKPGVFDLINKAKNDANALGSLPKEAARQNYV  
 81  
 GDY SSSLSPSLESSSQVEPGTDRKSTGFETLVVTSDEGITKIMFNRPKKKNAINTEMYHEIMRALKAAASKDDSIITVLTGN  
 161  
 SHL YSSGNDLTNFTDIPPGGVEEKAKNNAVLLREFVGCFFIDFPKFLIAVVNGPAVGISVTLLGLEDAVYASDRATFHTPF  
 241  
 RKR GQSPPEGCCSSYTFPKIMSPAKATEMLIFGKKLTAGACAQGLVTEVFPDSTFQKEVWTRLKAPAKLPPNALRISKEVI  
 321 EREKLVAVNAEECNVLQGRWLSDECTNAVVNFLSRKSKL  
 (西己列番号32)

【0175】

【表44】

## 表27L

>gb:GENBANK-ID:AF153612|acc:AF153612 Homo sapiens peroxisomal  
D3,D2-enoyl-CoA isomerase (PECI) mRNA, complete cds - Homo  
sapiens, 1348 bp.

Length = 1348

Plus Strand HSPs:

Score = 1857 (653.7 bits), Expect = 1.6e-190, P = 1.6e-190

Identities = 359/359 (100%), Positives = 359/359 (100%), Frame = +1

Query: 1 MRASQKDFENSMNQVLLKKDPGNEVKLKYALYKQATEGPCNMPKPGVFDLINKAKWDA  
60

Sbjct: 103 MRASQKDFENSMNQVLLKKDPGNEVKLKYALYKQATEGPCNMPKPGVFDLINKAKWDA  
282

Query: 61 WNALGSLPKEAARQNYVDLVSSLSPSLESSSQVEPGTDRKSTGFETLVVTS EDGITKIMF  
120

Sbjct: 283 WNALGSLPKEAARQNYVDLVSSLSPSLESSSQVEPGTDRKSTGFETLVVTS EDGITKIMF  
462

Query: 121 NRPKKKNAINTEMVHEIMRALKAASKDDSIITVLTGNGDYSSGNDLTNFTDIPPGGVVEE  
180

Sbjct: 463 NRPKKKNAINTEMVHEIMRALKAASKDDSIITVLTGNGDYSSGNDLTNFTDIPPGGVVEE  
642

Query: 181 KAKNNAVLLREFVGCFFIDFPKPLIAVVNGPAVGISVTLGLGLFDVAVYASDRATFHTPFPSHL  
240

Sbjct: 643 KAKNNAVLLREFVGCFFIDFPKPLIAVVNGPAVGISVTLGLGLFDVAVYASDRATFHTPFPSHL  
822

Query: 241 GQSPEGCSSTYFPKIMSPAKATEMLIFGKCLTAGEACAQGLVTEVFPDSTPFQKEVWTRLK  
300

Sbjct: 823 GQSPEGCSSTYFPKIMSPAKATEMLIFGKCLTAGEACAQGLVTEVFPDSTPFQKEVWTRLK  
1002

Query: 301 AFAKLPPNALRISKEVIRKREREREKLVHVNNAECCNVLQGRWLSDECTNAVNVNFLSRKSKL  
359

Sbjct: 1003 AFAKLPPNALRISKEVIRKREREREKLVHVNNAECCNVLQGRWLSDECTNAVNVNFLSRKSKL  
1179

本発明のENDO9核酸は、配列番号32のポリペプチドをコードする核酸を含み得る（例えば、ENDO9核酸は、配列番号31の核酸配列を含み得る）。本発明はまた、変異体または改変体の核酸を含み、それらの塩基のいずれかが、表27Jにおいて示された対応する塩基から変化され得る。いくつかの実施形態において、ENDO9核酸、またはそのような核酸のフラグメントは、そのエンドゼピン様活性および生理学的機能を維持するタンパク質をコードする。本発明はさらに、配列が、ここで記載された核酸に対して相補的である核酸を含む（こ

ここで記載された核酸のいずれかに対して相補的である核酸フラグメントを含む)。本発明はさらに、構造が化学的な変化を含む、核酸または核酸フラグメント、あるいはそれに対する相補鎖を含む。そのような変化は、糖リン酸骨格が変化または誘導される、塩基、および核酸の変化を含むが、これらに限定されない。これらの変化は、少なくとも部分的に変化した核酸の化学的な安定性を増強するために実施され、その結果、例えば、それらの核酸は、被験体における治療適用においてアンチセンス結合核酸として使用され得る。

#### 【0176】

本発明のENDO9ポリペプチドは、配列番号32のアミノ酸配列を含み得る。本発明はまた、変異体タンパク質または改変体タンパク質を含み、それらの残基のいずれかは、配列番号32において示された対応する残基から変化され得るが、一方、そのエンドゼピン様活性および生理学的機能を維持するタンパク質、あるいはその機能的フラグメント(例えば、以下の活性ペプチド(配列番号33))をなおコードしている。

#### 【0177】

代謝調節ペプチド番号2(MRP-2)配列:

Q A T E G P C N M P K P G V F D L I N K (配列番号33)。

#### 【0178】

本発明は、ENDO9ポリペプチドに免疫特異的に結合する、 $F_{ab}$ または $(F_{ab})_2$ のような抗体および抗体フラグメント、ならびにその誘導體およびフラグメントをさらに包含する。

#### 【0179】

ENDO9配列はまた、血清コレステロール、インシュリン、またはグルコースを変更することによって全体的エネルギー代謝または体重を調節するために有用である。

#### 【0180】

ENDO9配列はまた、当該分野において一般に使用される多くの技術のいずれか1つによって、細胞性レセプターおよび下流の本発明のエフェクターを同定するための方法において有用である。

## 【0181】

ENDO9配列は、糖尿病、肥満に関連する代謝障害、代謝性症候群Xならびに慢性疾患および種々の癌に関連する食欲不振および消耗病の、代謝を調節することによる処置において有用である。

## 【0182】

(ENDO10)

本発明のENDO10核酸は、表27M(配列番号(SEQ ID NO:)  
34)に示される核酸配列を含む。

## 【0183】

(表27M)

## 【0184】

【表45】

1 TCCTTCCCCACCCCGGGGGCCCATCCCGGTGCGGGGCTCCGGAGCTCGGGACTGCTAATTCAGCGAAACGATTA  
AAA  
 81 GACGCCCTACAGCTGACGGCACTTCTCTCTCCGGCAGGANAGGACGTCCAGCGTACGTCNGCCCGCGCTTCCCC  
GCC  
 161 GGCCGAGAGCAGGCCTCACAGAATCGCACGCGCTGGCACGCACGCCGCCCGCCCCACGGCCGAGGCCAGCGCG  
CCC  
 241 CGCGTCGCACGCATCCCGGCTCACTGCCCCCTCGACTCCTGTTCGGTTGGAGGGGCTGAGGCGAGCCTGAGCGCGC  
TGT  
 321 TGGCCGGAGGAAGCCGGAGAGACCAGGTCGACTGGGCAGAGCGGCAGAGGGTCGRGGAGCCTGCTCTGCACGCCAG  
GGA  
 401 GTAGAAGTGGCAGGGAGCAGGTCACGTGAGGGAGCGCGCCGCGACTGAGCTTGGGTCCGACTGGAGCTCAGGCTC  
GCG  
 481 ACCCAGACTGGTGGGCCAGGCCTCAAGCCGCGCTTACACCCAATCCAAGGAGGACAGACCGGACACAGAGGGACGG  
AGC  
 561 GAGCAAGGAGACATGGCTTCATCATTCCTGCCCGGGGGCCATCACCGGCGACAGCGGTGGAGAGCTGAGCTCAGG  
GGA  
 641 CGACTCCGGGAGGTGGAGTTCGCCCATAGCCCTGAGATCGAGGAGACCAGTTGCCTGGCCGAGCTGTTTGAAGG  
CTG  
 721 CCGCGCACCTGCAAGGCTGATTGAGTGGCCAGCAGGGAGCAGCTCTGTACCTGTATGCCAGGTACAAACAGGTC  
AAA  
 801 GTTGGAAATGTAACTACTCCTAAACCAAGCTTCTTTGATTTTGAAGGAAAGCAAAAATGGGAAGCTTGGAAAGCACT  
TGG  
 881 TGATTCAAGCCCCAGCCAAGCAATGCAGGARTATATCGCAGTAGTTAAAAAACTAGATCCAGGTGGAAATCCTCAGA  
TAC  
 961 CAGAGAAGAAAGGAAAAGAAGCAATAACAGGTTTTGGTGGCCAGTTATTAGTTCTCTATATCATGAAGAAACCATC  
AGG  
 1041 GAAGAAGACAAAAATATATTTGATTACTGCAGGAAAACAACATTGACCATATAACCAAGCCATCAAAATCGAAAAA  
TGT  
 1121 GGATGTGAATGTGAAAGATGAAGAGGGTAGGGCTCTACTTCACTGGGCCTGTGATCGAGGACATAAGGAACTAGTCA  
CAG  
 1201 TGTTGCTGCAACATAGAGCTGACATTAAGTGTGAGGACAAATGAAGGCCAAACAGCTCTACATTATGCCTCTGCTGT  
GAG  
 1281 TTTCTGGATATTGTAGAGCTGCTGCTCCAGTCTGGTGTGACCCCACTCTCCGAGACCAGGATGGCTGCCTGCCAGA  
GGA  
 1361 GGTGACAGGCTGCAAAACAGTTTCTTTGGTGTGACAGCGCACACAACCTGGCAAGGCTTAATCAAAAGACTGGAAAA  
CTG  
 1441 CAGTCTGTAATAGCATAAGGCTTCCATTATGAAAGAAAACACAAAAATAACTTCTTTTCCACCCGCTTTGGTA  
TGT  
 1521 ATTGGCTAATAAAATCAGTTCTGTGGAAGTGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 (SEQ ID NO: 34)

表27Mに開示される核酸配列は、太字の開始コドンおよび終始コドンを有する、573位で始まるオープンリーディングフレーム(「ORF」)を含む。ORFは、282アミノ酸残基のポリペプチド配列をコードする。このコードされたポリペプチドの配列は、表27N(配列番号35)に示される。翻訳されたタ

ンパク質と(ヒトDBI/ACBP様タンパク質 米国特許第5734038号  
- A2 1998年3月31日)との間の相同性は、表270に示される。

【0185】

(表27N)

【0186】

【表46】

```

1      MASSFLPAGAITGDSGGELSSGDDSGEVEFFHSPEIETSCLAELEKAAAHLQGLIQVASREQLLYLYARYKQVKV
GNC
81     NTPKPSFFDFEGKQKWEAWKALGDSSPSQAMQEYLAVVKKLDPGWNPQIPEKKGKEANTGFGGPVISSLYHEETIRE
EDK
161    NIFDYCRENNIDHITKAIKSKNVDVNVKDEEGRALLHWACDRGHKELVTVLLQHRADINCQDNEGQTALHYASACEF
LDI
241    VELLQSGADPTLRDQDGLPEEVTGCKTVSLVLQRHTTGKA
      (SEQ ID NO:35)

```

(表270)

【0187】

【表47】

```

>gb:GENBANK-ID:I96163|acc:I96163 Sequence 2 from patent US 5734038 -
Unknown., 1123 bp.
Length = 1123
Plus Strand HSPs:

Score = 1340 (471.7 bits), Expect = 1.2e-135, P = 1.2e-135
Identities = 259/282 (91%), Positives = 262/282 (92%), Frame = +1

Query:      1 MASSFLPAGAITGDSGGELSSGDDSGEVEFPHSPEIEETSCLAELEFKAHAHLQGLIQVA
60
      |||
Sbjct:    121 MASSFLPAGAITGDSGGELSSGDDSGEVEFPHSPEIEETSCLAELEFKAHAHLQGLIQVA
300

Query:      61 SREQLLYLYARYKQVKVGNCNTPKPSFFDFEGKQKWEAWKALGDSSPSQAMQEYIAVVKK
120
      |||
Sbjct:    301 SREQLLYLYARYKQVKVGNCNTPKPSFFDFEGKQKWEAWKALGDSSPSQAMQEYIAVVKK
480

Query:      121 LDPGWNPQIPEKKGKEANTGFGGPVISSLYHEETIREEDKNIFDYCRENNIDHITKAIKS
180
      ||| +      | +      + |||
Sbjct:    481 LDPGWNPQIPEKKRKRKRSKYKVASYS*FISIS*RNH-QGRDKNIFDYCRENNIDHITKAIKS
657

Query:      181 KNVDVNVKDEEGRALLHWACDRGHKELVTVLLQHRADINCQDNEGQTALHYASACEFLDI
240
      |||
Sbjct:    658 KNVDVNVKDEEGRALLHWACDRGHKELVTVLLQHRADINCQDNEGQTALHYASACEFLDI
837

Query:      241 VELLQSGADPTLRDQDGCLPEEVTGCKTVSLVLRHTTGKA 282
      |||
Sbjct:    838 VELLQSGADPTLRDQDGCLPEEVTGCKTVSLVLRHTTGKA 963

```

本発明のENDO10核酸は、配列番号35のポリペプチドをコードする核酸を含み得る。例えば、ENDO10核酸は、配列番号34の核酸配列を含み得る。本発明はまた、変異体核酸または改変体核酸を含み、これらの塩基のいずれかが表27Mに示される、対応する塩基から変化され得る。いくつかの実施形態において、ENDO10核酸、またはそのような核酸のフラグメントは、そのエンドゼピン(endozepine)様活性および生理学的機能を維持するタンパク質をコードする。本発明はさらに、その配列がまさに記載された配列に相補的である核酸を含み、これは、まさに記載された核酸のいずれかに相補的な核酸フラグメントを含む。本発明は、核酸もしくは核酸フラグメント、またはその相補体をさらに含み、これらの構造は、化学的な改変を含む。このような改変は、以下を含むがこれらに限定されない：改変された塩基、および糖リン酸骨格が改変されたかもしくは誘導体化された核酸。これらの改変は、少なくとも一部で実施

され、改変された核酸の化学的安定性を増強する。その結果、これらは、例えば、被験体において治療的適用におけるアンチセンス結合核酸として使用され得る。

【0188】

本発明のENDO10ポリペプチドは、配列番号35のアミノ酸配列を含み得る。本発明はまた、変異体タンパク質または改変体タンパク質を含み、これらの残基のいずれかは、配列番号35に示された対応する残基から変化され得るが、そのエンドゼブシン様活性および生理学的機能、またはその機能的フラグメント（例えば、以下の活性ペプチド（配列番号36））を維持するタンパク質をなおコードする。

【0189】

代謝 - 調節ペプチド # 10 (MRP - 10) 配列：

【0190】

【化3】

1 QVKVGNCTPKPSFFDFEGK

(SEQ ID NO:36)

本発明は、ENDO10ポリペプチドに免疫特異的に結合する、 $F_{ab}$ または( $F_{ab}$ )<sub>2</sub>のような抗体および抗体フラグメント、ならびにその誘導体およびフラグメントをさらに包含する。

【0191】

ENDO10配列はまた、血清インシュリン、またはグルコースを変更することによって全体的エネルギー代謝または体重を調節するために有用である。ENDO10配列はまた、筋肉質量または脂肪レベルを調節するために有用である。

【0192】

ENDO10配列はまた、当該分野において一般に使用される多くの技術のいずれか1つによって、細胞性レセプターおよび下流の本発明のエフェクターを同

定するための方法において有用である。

【0193】

ENDO10配列は、糖尿病、肥満に関連する代謝障害、代謝性症候群Xならびに慢性疾患および種々の癌に関連する食欲不振および消耗病の、代謝を調節することによる処置において有用である。

【0194】

ENDOX核酸は、エンドゼピンファミリーの新規なメンバーであるポリペプチドをコードする。エンドゼピンは、生物学的に重要な多様な機能に関して報告された。関連エンドゼピンポリペプチド(例えば、ジアゼパム結合インヒビター)は、GABAレセプターを結合する。さらに、新たなENDOXポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体は、例えば、GABAレセプターに対する新たなアゴニストまたはアンタゴニストを同定するためのスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。新たなENDOXポリペプチドはまた、GABAレセプター活性を調節するために使用され得る。

【0195】

本発明に従うENDOXポリペプチド、核酸、抗体および他の組成物はまた、エンドゼピンファミリーメンバーの他の既知の機能に基づく有用性を有する。例えば、ジアゼパム結合インヒビターはまた、アシル-CoA結合タンパク質(ACBP)として公知である。アシル-CoA結合タンパク質は、中鎖アシル-CoAエステルおよび長鎖アシル-CoAエステルに高親和性で結合し、そしてアシル-CoAエステルの細胞内キャリアとして働き得る。

【0196】

ACBP遺伝子はまた、酵母においてクローニングされた。この酵母同族を、アシル-CoA結合(ACB)と名付けた(Roseら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11287-11291)。この酵母遺伝子は、ヒト遺伝子産物と同一の長さである87アミノ酸残基(開始メチオニンを含む)のポリペプチドをコードする。酵母ポリペプチドは、ヒトアミノ酸残基と48%保存される。最も高く保存された酵母ドメインは、酵母、トリおよび哺乳動物由来の公知のタンパク質種すべてにおいて同一である、合計7連続するアミノ

酸残基を含むことが見出された。このドメインは、アシル - C o A エステルについての疎水結合部位を構築し、そして分子の第二のヘリックス領域内に位置される。下等生物（例えば、酵母）におけるこのように高度に保存された遺伝子の存在は、アシル - C o A 結合タンパク質としてのその基本的な生物学的役割を支持し、そしてまた高等生物においてそこに帰する多くの生物学的機能は、アシル - C o A と相互作用するその能力から生じ得る。

#### 【0197】

種々のエンドゼピンファミリーメンバー、またはこれらのポリペプチドの誘導体はまた、抗細菌性ペプチドとして同定された。例としては、セクロピン ( c e c r o p i n ) P 1 および P R - 3 9 が挙げられる。P R - 3 9 は、ブタ小腸の上部から単離された 3 9 アミノ酸残基のプロリンおよびアルギニンのリッチなポリペプチドである。質量分析法と組合わせたアミノ酸配列分析は、以前に同定された因子由来の胃阻害性ポリペプチド ( 7 - 4 2 ) ( G I P ( 7 - 4 2 ) ) およびジアゼパム結合インヒビター ( 3 2 - 8 6 ) ( D B I ( 3 2 - 8 6 ) ) として 2 または 3 のポリペプチドを同定した。第 3 のポリペプチドは、以前には公知ではなかった構造を構築し、その分子量と関連してペプチド 3 9 1 0 と称された。3 つのポリペプチド全ては、B a c i l l u s m e g a t e r i u m に対する抗細菌性活性を示す。G I P ( 7 - 4 2 ) はまた、S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s および外膜を欠損する E s c h e r i c h i a c o l i 変異体に対するいくつかの活性を示す。

#### 【0198】

E N D O X 核酸配列、コードされる E N D O X ポリペプチド、ならびに種々の開示された配列およびこれらの核酸を含むクローンに対応する配列同定番号 ( 配列番号 ) の要約を、以下の表 2 8 に示す。

#### 【0199】

( 表 2 8 : E N D O X ポリペプチドの開示された配列および対応する配列番号 )

#### 【0200】

【表 4 8】

| ENDOX  | 開示された核酸配列の配列同定番号                             | 対応する核酸からのORF開始コドンおよび終始コドン | コードされるポリペプチド配列の配列同定番号                       | 活性ペプチドの配列同定番号   |
|--------|--|---------------------------|---|-----------------|
| ENDO1  | SEQ ID NO:1<br>SEQ ID NO: 46<br>SEQ ID NO:48 | 1-267<br>1-687<br>1-576   | SEQ ID NO:2<br>SEQ ID NO:47<br>SEQ ID NO:49 | SEQ ID NO:15    |
| ENDO2  | SEQ ID NO:3                                  | 58-321                    | SEQ ID NO:4                                 | SEQ ID NO:16    |
| ENDO3  | SEQ ID NO:5                                  | 83-496                    | SEQ ID NO:6                                 | SEQ ID NO:17,18 |
| ENDO4  | SEQ ID NO:7                                  | 11-298                    | SEQ ID NO:8                                 | SEQ ID NO:19,20 |
| ENDO5  | SEQ ID NO:9                                  | 7-264                     | SEQ ID NO:10                                | SEQ ID NO:21    |
| ENDO6  | SEQ ID NO:22                                 | 1-1590                    | SEQ ID NO:23                                | SEQ ID NO:24    |
| ENDO7  | SEQ ID NO:25                                 | 6-263                     | SEQ ID NO:26                                | SEQ ID NO:27    |
| ENDO8  | SEQ ID NO:28                                 | 1-312                     | SEQ ID NO:29                                | SEQ ID NO:30    |
| ENDO9  | SEQ ID NO:31                                 | 1-1077                    | SEQ ID NO:32                                | SEQ ID NO:33    |
| ENDO10 | SEQ ID NO:34                                 | 573-1418                  | SEQ ID NO:35                                | SEQ ID NO:36    |

(ENDOX核酸およびポリペプチド)

本発明の1つの局面は、ENDOXポリペプチドまたはそれらの生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子に関する。また、ENDOXをコードする核酸(例えば、ENDOX mRNA)を同定するためにハイブリダイゼーションプローブとして使用するための十分な核酸フラグメント、およびENDOX核酸分子の増幅および/または変異のためのPCRプライマーとして使用するためのフラグメントも本発明に含まれる。本明細書において使用されるように、用語「核酸分子」は、DNA分子(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)、RNA分子(例えば、mRNA)、ヌクレオチドアナログを使用して産生されるDNAまたはRNAのアナログ、ならびにそれらの誘導体、フラグメントおよびホモログを含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは、二本鎖DNAを含む。

【0201】

ENDOX核酸は、成熟ENDOXポリペプチドをコードし得る。本明細書中

で使用される場合、本発明において開示されるポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、天然に存在するポリペプチドあるいは前駆体形態またはプロタンパク質の産物である。天然に存在するポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質としては、非制限例として、対応する遺伝子によってコードされる完全長遺伝子産物が挙げられる。あるいは、本明細書中で記載されるオープンリーディングフレームによってコードされる、ポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質として規定されている。産物「成熟」形態は、さらに非制限例として、遺伝子産物が産生される細胞または宿主細胞内で発生し得る、1以上の天然に存在するプロセッシング工程の結果として発生する。ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態に導くこのようなプロセッシング工程の例としては、オープンリーディングフレームの開始コドンによってコードされる、N-末端メチオニン残基の切断、またはシグナルペプチドまたはリーダー配列のタンパク分解性切断が挙げられる。従って、残基1~N(ここで、残基1は、N-末端メチオニンである)を有する、前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟形態は、N-末端メチオニンの除去後に残った残基2~N末端を有する。あるいは、残基1~Nを有する前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟形態(ここで、残基1~残基MのN末端シグナル配列が切断される)は、残った残基M+1~残基Nを有する。本明細書中でさらに使用されるように、ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、タンパク質分解性切断事象以外の、翻訳後就職の工程から生じ得る。このようなさらなるプロセスとしては、非制限例として、グリコシル化、ミリストイル化、またはリン酸化が挙げられる。一般に、成熟ポリペプチドまたは成熟タンパク質は、結果として、これらのプロセスの1つのみの作用、またはそれらの任意の組み合わせから得られ得る。

#### 【0202】

本明細書中で使用される場合、用語「プローブ」とは、種々の長さの核酸配列をいい、好ましくは、特定の使用に依存して、少なくとも約10ヌクレオチド(nt)、100nt、または例えば、約6,000ntほどの大きさの間である。プローブは、同一、類似または相補的な核酸配列の検出において使用される。より長いプローブは、通常、天然供給源または組換え供給源から入手され、非常

に特異的であり、そしてより短いオリゴマープローブよりもはるかに遅くハイブリダイズする。プローブは、一本鎖または二本鎖であり得、そしてPCR、メンブレンベースのハイブリダイゼーション技術またはELISAのような技術において特異性を有するように設計される。

#### 【0203】

本明細書中で使用される場合、用語「単離された」核酸分子は、この核酸の天然の供給源中に存在するその他の核酸分子から分離されているものである。好ましくは、「単離された」核酸は、この核酸が由来する生物のゲノムDNA中でこの核酸に天然に隣接する配列（すなわち、この核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態で、単離されたENDOX核酸分子は、この核酸が由来する細胞/組織（例えば、脳、心臓、肝臓、脾臓など）のゲノムDNA中でこの核酸に天然で隣接する、約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb、または0.1 kb未満のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子、例えば、cDNA分子は、組換え技術により産生される場合、その他の細胞物質または培養培地を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合、化学物質前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まないものであり得る。

#### 【0204】

本発明の核酸分子、例えば、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48のヌクレオチド配列を有する核酸分子、またはこれらのヌクレオチド配列の相補体は、標準的な分子生物学的技法および本明細書で提供される配列情報を用いて単離され得る。ハイブリダイゼーションプローブとして、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48の核酸の全部または一部を使用して、ENDOX分子は、標準的なハイブリダイゼーション技術およびクローニング技術（例えば、Sambrookら（編）、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989；およびAusubelら、（編）、CURRENT PROTOCOLS

IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993に記載されるような)を用いて単離され得る。

【0205】

本発明の核酸は、標準的なPCR増幅技法に従って、テンプレートとしてcDNA、mRNAあるいはゲノムDNA、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅され得る。このように増幅された核酸は、適切なベクター中にクローン化され得、そしてDNA配列分析により特徴付けられ得る。さらに、ENDOXヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術、例えば、自動化DNA合成機を用いることにより調製され得る。

【0206】

本明細書で用いられる場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいい、このオリゴヌクレオチドは、PCR反応で用いられ得る十分な数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列もしくはcDNA配列に基づき得るか、またはそれから設計され得、そして特定の細胞もしくは組織において、同一、類似もしくは相補的DNAまたはRNAを増幅し、確認し、もしくはその存在を示すために用いられる。オリゴヌクレオチドは、約10nt、50nt、または100ntの長さ、好ましくは約15nt~30ntの長さを有する核酸配列の部分を含む。本発明の1つの実施形態では、100ntより少ない長さの核酸分子を含むオリゴヌクレオチドは、さらに、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21もしくは23の少なくとも6個連続するヌクレオチド、またはその相補体を含む。オリゴヌクレオチドは、化学的に合成され得、そしてプローブとして用いられ得る。

【0207】

別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、もしくは23に示されるヌクレオチド配列またはこのヌクレオチド配列の一部の相補体である核酸分子を含む(例えば、プローブもしくはプライマーとして使用され得るフラグメント、または

ENDOXポリペプチドの生物学的に活性な部位をコードするフラグメント)。配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48に示されるヌクレオチド配列に十分相補的である核酸分子であり、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48に示されるヌクレオチド配列に対しミスマッチがほとんどまたは全くなく水素結合し得、それによって安定な二本鎖を形成する。

#### 【0208】

本明細書で用いる場合、用語「相補的」は、核酸分子のヌクレオチド単位間のWatson-CrickまたはHoogsteen塩基対形成をいい、そして用語「結合」は、2つのポリペプチドまたは化合物または関連ポリペプチドまたは化合物あるいはその組合せ間の物理的または化学的相互作用を意味する。結合は、イオン性、非イオン性、ファンデルワールス性、疎水性相互作用などを含む。物理的相互作用は直接的かまたは間接的のいずれかであり得る。間接的相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物を介してか、またはその効果に起因し得る。直接的結合は、別のポリペプチドもしくは化合物を介してか、またはその効果に起因して生じないが、他の実質的な化学的中間体がない相互作用をいう。

#### 【0209】

本明細書中に提供されるフラグメントは、少なくとも6個の(連続する)核酸配列または少なくとも4個の(連続する)アミノ酸配列(それぞれ、核酸の場合には、特異的なハイブリダイゼーションを可能にし、またはアミノ酸の場合には、エピトープの特異的な認識を可能にするに十分な長さ)として規定され、そして全長配列未満のせいぜいいくらかの部分である。フラグメントは、選択された核酸配列またはアミノ酸配列の任意の連続する部分に由来し得る。誘導体は、直接的にかまたは改変もしくは部分的置換によってかのいずれかでネイティブな化合物から形成される核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、ネイティブな化合物に類似する構造を有する(しかし、同一ではない)が、特定の成分または側鎖に関してそれとは異なる核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログ

は、合成物であり得るか、または進化的に異なる起源に由来し得、そして野生型と比較して、類似の代謝活性または反対の代謝活性を有し得る。ホモログは、異なる種由来である特定の遺伝子の核酸配列またはアミノ酸配列である。

#### 【0210】

誘導体およびアナログは、以下に記載のように、誘導体またはアナログが、修飾された核酸またはアミノ酸を含む場合、全長、または全長以外のものであり得る。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログは、種々の実施形態において、本発明の核酸もしくはタンパク質に、同一の大きさの核酸またはアミノ酸配列にわたって、または整列した配列と比較した場合（この整列は、当該分野で公知であるコンピューター相同性プログラムによって実施される）、少なくとも約70%、80%、もしくは95%の同一性（好ましい同一性は、80~95%）で実質的に相同であるか、あるいはそのコードする核酸がストリンジェントの、中程度にストリンジェントの、または低いストリンジェントの条件下で上記のタンパク質をコードする配列の相補体にハイブリダイズし得る、領域を含む分子を包含するが、これらに限定されない。例えば、Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993、および以下を参照のこと。

#### 【0211】

「相同な核酸配列」もしくは「相同なアミノ酸配列」、またはその改変体とは、上記で考察したように、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルにおける相同性によって特徴付けられる配列をいう。相同なヌクレオチド配列は、ENDOXポリペプチドのアイソフォームをコードする配列をコードする。アイソフォームは、例えば、RNAの選択的スプライシングの結果として、同一の生物の異なる組織において発現され得る。あるいは、アイソフォームは、異なる遺伝子によってコードされ得る。本発明において、相同なヌクレオチド配列は、ヒト以外の種（脊椎動物が挙げられるが、これに限定されず、従って、例えば、カエル、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の生物が挙げられ得る）のENDOXポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。相同なヌク

レオチド配列はまた、天然に生じる対立遺伝子改変体および本明細書に記載されるヌクレオチド配列の変異体が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、相同的ヌクレオチド配列は、ヒトENDOXタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含まない。相同核酸配列は、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35から45まで、47および49の保存的アミノ酸置換（以下を参照のこと）、ならびにENDOX生物学的活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。ENDOXタンパク質の種々の生物学的活性は以下に記載されている。

#### 【0212】

ENDOXポリペプチドは、ENDOX核酸のオープンリーディングフレーム（「ORF」）によってコードされる。ORFは、潜在的にポリペプチドに翻訳され得るヌクレオチド配列に対応する。ORFを含む核酸のストレッチは、停止コドンにより中断されない。完全タンパク質のコード配列を示すORFは、ATG「開始」コドンで始まり、そして3つの停止コドン、すなわち、TAA、TAG、またはTGAの1つで停止する。本発明の目的には、ORFは、開始コドン、停止コドン、またはその両方をともなうか、またはそれらのないコード配列の任意の部分であり得る。真実の細胞タンパク質をコードするための良好な候補として考慮されるべきORFには、最小サイズの要求（例えば、50アミノ酸またはそれ以上のタンパク質をコードするDNAのストレッチ）がしばしば設定される。

#### 【0213】

ヒトENDOX遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列は、他の細胞型（例えば、他の組織由来）におけるENDOXホモログ、ならびに他の脊椎動物由来のENDOXホモログを同定および/またはクローニングする際の使用のために設計されるプローブおよびプライマーの作製を可能にする。このプローブ/プライマーは、代表的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、代表的には、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48の少なくとも約12個、約25

個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個または約400個の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列；または配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；あるいは配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48の天然に存在する変異体の少なくとも約12個、約25個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個または約400個の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

#### 【0214】

ヒトENDOXヌクレオチド配列に基づくプローブは、同じまたは相同なタンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出するために使用され得る。種々の実施形態において、このプローブはさらに、プローブに付着した標識基を含み、例えば、この標識基は放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。このようなプローブは、ENDOXタンパク質を誤って発現する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として、例えば、被験体由来の細胞のサンプル中のENDOXをコードする核酸のレベルを測定すること（例えば、ENDOX mRNAレベルを検出すること、またはゲノムENDOX遺伝子に変異しているかまたは欠失しているか否かを決定すること）によって使用され得る。

#### 【0215】

「ENDOXポリペプチドの生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」は、本発明のポリペプチドの活性に類似するが必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいい、用量依存性の有無に関わらず、特定の生物学的アッセイにおいて測定されるような成熟形態を含む。「ENDOXの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、ENDOXの生物学的活性（ENDOXタンパク質の生物学的活性は、以下に記載される）を有するポリペプチドをコードする、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48の一部を単離し、ENDOXタンパク質のコードされた部分を発現させ（例

えば、インビトロでの組換え発現によって)、そしてENDOXのコードされた部分の活性を評価することによって調製され得る。

#### 【0216】

(ENDOX核酸およびポリペプチドの改変体)

本発明はさらに、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48に示されるヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を包含する。それにより、これらの核酸は、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48に示されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質と同じENDOXタンパク質をコードする。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35から45まで、47および49に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

#### 【0217】

配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48に示されるヒトENDOXヌクレオチド配列に加えて、ENDOXポリペプチドのアミノ酸配列における変化を導くDNA配列多型は、集団(例えば、ヒト集団)内に存在し得ることが、当業者によって理解される。ENDOX遺伝子中のこのような遺伝的多型は、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して、集団内の個体間に存在し得る。本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、ENDOXタンパク質、好ましくは脊椎動物のENDOXタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を含む核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子のバリエーションは、代表的には、ENDOX遺伝子のヌクレオチド配列において1~5%の変動性を生じ得る。天然の対立遺伝子バリエーションの結果であり、そしてENDOXポリペプチドの機能的活性を変化させない、ENDOXポリペプチド内の任意および全てのこのようなヌクレオチドのバリエーションならびに得られるアミノ酸多型は、本発明の範囲内であると意図される。

## 【0218】

さらに、他の種由来のENDOXタンパク質をコードし、従って、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48のヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内にあることが意図される。本発明のENDOXのcDNAの天然の対立遺伝子改変体およびホモログに対応する核酸分子は、本明細書中に開示されるヒトENDOX核酸に対するその相同性に基づいて、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、標準的なハイブリダイゼーション技術に従うハイブリダイゼーションプローブとしてヒトcDNAまたはその一部を用いて単離され得る。

## 【0219】

従って、別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも6ヌクレオチド長であり、そしてストリンジェント条件下で配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする。別の実施形態では、この核酸は、少なくとも10、25、50、100、250、500、750、1000、1500または2000以上のヌクレオチド長である。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、コード領域にハイブリダイズする。本明細書中で用いられる場合、用語「ストリンジェント条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関して、互いに少なくとも60%相同なヌクレオチド配列が代表的には互いにハイブリダイズしたままである条件を記載することを意図する。

## 【0220】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来のENDOXタンパク質をコードする核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ（paralogs））は、特定のヒト配列の全てまたは一部をプローブとし、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングに関して当該分野で周知の方法を使用して、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって入手され得る。

## 【0221】

本明細書で用いられる場合、語句「ストリンジェントハイブリダイゼーション

条件」は、その条件下で、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、その他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジントな条件は配列依存性であり、そして異なる状況で異なる。より長い配列は、より短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジントな条件は、規定されたイオン強度およびpHで、特定の配列の熱融解点( $T_m$ )より約5%低いように選択される。この $T_m$ は、標的配列に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする(規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度下)温度である。標的配列は一般に過剰で存在するので、 $T_m$ では、50%のプローブが平衡状態で占有されている。代表的には、ストリンジントな条件は、pH7.0~8.3で、塩濃度が約1.0Mナトリウムイオンより少なく、代表的には約0.01~1.0Mナトリウムイオン(またはその他の塩)、そして温度が短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド(例えば、10nt~50nt)について少なくとも約30%、そしてより長いプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドについて少なくとも約60%であるような条件である。ストリンジントな条件はまた、ホルムアミドのような、脱安定化剤の添加で達成され得る。

#### 【0222】

ストリンジント条件は、当業者に公知であり、そしてAusubelら(編)、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出され得る。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約98%または約99%相同な配列が、代表的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。ストリンジントハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、6×SSC、50mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA、および500mg/ml変性サケ精子DNAを含む高塩緩衝液中での65%でのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーションに、0.2×SSC、0.01% BSA中での50%での1回以上の洗浄が続く。ストリンジエン

ト条件下で配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48の配列にハイブリダイズする、本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子とは、天然に存在する（例えば、天然のタンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有する、RNA分子またはDNA分子をいう。

#### 【0223】

第2の実施形態では、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、中程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸配列が提供される。中程度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、55 での6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDSおよび100mg/ml変性サケ精子DNA中でのハイブリダイゼーション、続いて1×SSC、0.1% SDS中での37 での1回以上の洗浄である。用いられ得る中程度のストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である。例えば、Ausubelら(編), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYおよびKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NYを参照のこと。

#### 【0224】

第3の実施形態では、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48、またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸が提供される。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、35%ホルムアミド、5×SSC、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100mg/mlの変性サケ精子DNA、10% (重量/容量) デキストラン硫酸中での40 でのハイブリダイゼー

ション、続いて2×SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTAおよび0.1% SDS中での50℃での1回以上の洗浄である。用いられ得る低ストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である(例えば、種交差ハイブリダイゼーションについて用いられるように)。例えば、Ausubelら(編), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYならびにKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; ShiloおよびWeinberg, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78:6789-6792を参照のこと。

#### 【0225】

(保存的変異)

集団中に存在し得る、ENDOX配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、当業者は、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48のヌクレオチド配列への変異によって変化が導入され得、それによって、ENDOXタンパク質の機能的能力を変更することなく、コードされるENDOXタンパク質のアミノ酸配列に変化がもたらされることをさらに理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基にてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35から45まで、47および49の配列において行われ得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を変更することなく、ENDOXタンパク質の野生型配列から、変更され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明のENDOXタンパク質の間で保存されているアミノ酸残基は、特に変更を受け入れ難いと予測される。保存的アミノ酸置換が行われるアミノ酸は、当該分野において周知である。

#### 【0226】

本発明の別の局面は、活性に必須ではないアミノ酸残基における変化を含む、

ENDOXタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなENDOXタンパク質は、アミノ酸配列が、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35から45まで、47および49とは異なるが、生物学的活性をなお保持する。1つの実施形態では、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、このタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35から45まで、47および49のアミノ酸配列に少なくとも約45%の相同性であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、この核酸分子によってコードされるタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35から45まで、47および49に少なくとも約60%相同性であり；より好ましくは配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35から45まで、47および49に少なくとも約70%相同性であり；なおより好ましくは、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35から45まで、47および49に少なくとも約80%相同性であり；さらにより好ましくは、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35から45まで、47および49に少なくとも約90%相同性であり；そして最も好ましくは、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35から45まで、47および49に少なくとも約95%相同性である。

【0227】

配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35から45まで、47および49のタンパク質に相同なENDOXタンパク質をコードする単離された核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、4

6 および 48 のヌクレオチド配列に 1 以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失を導入することにより作製され得、その結果、1 以上のアミノ酸の置換、付加または欠失が、コードされるタンパク質に導入される。

#### 【0228】

変異は、標準技術（例えば、部位特異的変異誘発および PCR 媒介変異誘発）によって配列番号 2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35 から 45 まで、47 および 49 に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1 以上の推定非必須アミノ酸残基にて作製される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される、アミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーとしては、以下が挙げられる：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アルパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）。従って、ENDOX タンパク質中の推定された非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態では、変異は、ENDOX コード配列の全てまたは一部に沿って（例えば、飽和変異誘発 (saturation mutagenesis) によって）ランダムに導入され得、そして得られる変異体は、ENDOX の生物学的活性についてスクリーニングされて、活性を維持する変異体を同定し得る。配列番号 2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35 から 45 まで、47 および 49 の変異誘発に続いて、コードされるタンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現され得、そしてこのタンパク質の活

性が決定され得る。

【0229】

1つの実施形態では、変異ENDOXTタンパク質は、以下についてアッセイされ得る：(i)他のENDOXTタンパク質、他の細胞表面タンパク質、または生物学的に活性なそれらの部分と、タンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力、(ii)変異ENDOXTタンパク質とENDOXRリガンドとの間の複合体形成；あるいは(iii)変異ENDOXTタンパク質が細胞内標的タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力；(例えば、アビジンタンパク質)。

【0230】

なお別の実施形態においては、変異ENDOXTタンパク質は、特定の生物学的機能を調節する能力(例えば、インシュリン放出の調節)についてアッセイされ得る。

【0231】

(アンチセンス核酸)

本発明の別の局面は、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48またはそのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズし得るかまたは相補的である、単離されたアンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である(例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的であるかまたはmRNA配列に相補的である)ヌクレオチド配列を含む。特定の局面では、少なくとも約10、約25、約50、約100、約250もしくは約500ヌクレオチドまたは全体のENDOXCコード鎖、またはそれらの一部のみ相補的な配列を含む、アンチセンス核酸分子が提供される。配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35から45まで、47および49のENDOXTタンパク質のフラグメント、ホモログ、誘導体およびアナログをコードする核酸分子、または配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48のENDOXCの核酸配列に相補的なアンチセ

ンス核酸がさらに提供される。

#### 【0232】

1つの実施形態では、アンチセンス核酸分子は、ENDOXタンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」とは、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含む、ヌクレオチド配列の領域をいう。別の実施形態では、このアンチセンス核酸分子は、ENDOXタンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」とは、コード領域に隣接する、アミノ酸に翻訳されない、5'配列および3'配列をいう（すなわち、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域ともいわれる）。

#### 【0233】

本明細書中に開示されるENDOXタンパク質をコードするコード鎖配列を考慮すれば、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickまたはHoogsteenの塩基対合の規則に従って設計され得る。アンチセンス核酸分子は、ENDOX mRNAのコード領域全体に相補的であり得るが、より好ましくは、ENDOX mRNAのコード領域または非コード領域の一部にのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ENDOX mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45または約50ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いて、化学的合成または酵素連結反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、またはこの分子の生物学的安定性を増大させるように、もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二重鎖の物理的安定性を増大させるように設計された種々に改変されたヌクレオチドを用いて化学的に合成され得る（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが用いられ得る）。

#### 【0234】

アンチセンス核酸を作製するために用いられ得る改変されたヌクレオチドの例としては以下が挙げられる：5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 $\beta$  - D - ガラクトシルクエオシン (galactosylqueosine)、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、 $\beta$  - D - マンノシルクエオシン (mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン (queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2, 6 - ジアミノプリン。あるいは、このアンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクローニングされた発現ベクターを用いて生物学的に生成され得る (すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下の小節にさらに記載される、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である)。

#### 【0235】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的には被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果それらは、ENDOXタンパク質をコードする細胞性mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはそれに結合し、それによってこのタンパク質の発現を、例えば転写および/または翻訳を阻害することによって阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二

重鎖を形成する従来のヌクレオチド相補性によってか、または例えばDNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの主要溝 (major groove) における特異的相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように改変され得、次いで全身に投与され得る。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、それらが、選択された細胞表面上に発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る。これは、例えば、そのアンチセンス核酸分子を、細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによる。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載されるベクターを用いて細胞に送達され得る。十分な量の核酸分子であることを達成するために、アンチセンス核酸分子が強力な pol II プロモーターまたは pol III プロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が、好ましい。

#### 【0236】

さらに別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸分子は、 $\beta$ -アノマー核酸分子である。 $\beta$ -アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する。ここで、通常の $\alpha$ -ユニットとは対照的に、鎖は、互いに平行に走行する(例えば、Gaultierら(1987) *Nucl. Acids Res* 15:6625~6641を参照のこと)。このアンチセンス核酸分子はまた、2'-O-メチルリボヌクレオチド(例えば、Inoueら、(1987) *Nucl. Acids Res* 15:6131~6148を参照のこと)またはキメラRNA-DNAアナログ(例えば、Inoueら(1987) *FEBS Lett* 215:327~330を参照のこと)を含み得る。

#### 【0237】

(リボザイムおよびPNA部分)

非制限的な例として、核酸改変としては、改変塩基、および糖リン酸骨格が改変または誘導体化された核酸が挙げられる。これらの改変は、改変された核酸の化学的安定性を少なくとも部分的に増強するために実施され、その結果、これら

は、例えば、被験体における治療的適用においてアンチセンス結合核酸として使用され得る。

#### 【0238】

1つの実施形態において、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、一本鎖核酸（例えば、mRNA）を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子であり、これらは、その一本鎖核酸に対して相補領域を有する。従って、リボザイム（例えば、ハンマーヘッド型リボザイム（HasselhoffおよびGerlach（1988）Nature 334:585~591に記載される））を使用して、ENDOX mRNA転写物を触媒的に切断し、それによってENDOX mRNAの翻訳を阻害し得る。ENDOXをコードする核酸に特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示されるENDOX cDNAのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46、および48）に基づいて設計され得る。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、ENDOXをコードするmRNA内で切断されるヌクレオチド配列に相補的である、Tetrahymena L-19 IVS RNAの誘導体が構築され得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号；およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。ENDOX mRNAをまた使用して、RNA分子のプールから、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択し得る。例えば、Bartelら（1993）Science 261:1411~1418を参照のこと。

#### 【0239】

あるいは、ENDOX遺伝子発現は、ENDOX核酸の調節領域（例えば、ENDOXのプロモーターおよび/またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的化し、標的細胞中でENDOX遺伝子の転写を妨害する三重らせん構造を形成することによって阻害され得る。例えば、Helene（1991）Anticancer Drug Des. 6:569~84；Heleneら（1992）Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27~36；およびMaher（1992）Bioassays 14:807~15を参照のこと。

## 【0240】

種々の実施形態において、ENDOXの核酸は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格で改変され、例えば、その分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは可溶性を改善し得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を改変して、ペプチド核酸を生成し得る(Hyrupら(1996) Bioorg Med Chem 4:5~23を参照のこと)。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースリン酸骨格が偽ペプチド骨格によって置換され、そして4つの天然の核酸塩基(nucleobase)のみが保持されている核酸模倣物(例えば、DNA模倣物)をいう。PNAの中性の骨格は、低いイオン強度の条件下でDNAおよびRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、上記のHyrupら(1996); Perry-O'Keefeら(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14670~14675において記載されるような標準的固相ペプチド合成プロトコルを用いて行われ得る。

## 【0241】

ENDOXのPNAは、治療的適用および診断的適用において使用され得る。例えば、PNAは、例えば転写または翻訳の停止を誘導することまたは複製を阻害することによる、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンスまたは抗遺伝子(antigene)剤として使用され得る。ENDOXのPNAはまた、例えば、遺伝子における一塩基対変異の分析(例えば、PNA指向性PCRクランプ(c l a m p i n g))において;他の酵素(例えば、S<sub>1</sub>ヌクレアーゼ)と組み合わせて使用される場合の人工制限酵素として(Hyrupら(1996)上記を参照のこと);またはDNA配列およびハイブリダイゼーションのプローブもしくはプライマーとして(Hyrupら(1996)上記; Perry-O'Keefeら(1996)、上記を参照のこと)、使用され得る。

## 【0242】

別の実施形態において、ENDOXのPNAは、例えば、それらの安定性または細胞性取り込みを増強するために、PNAに親油性基または他のヘルパー基を

結合することによって、PNA-DNAキメラの形成によって、またはリポソームもしくは当該分野において公知の薬物送達の他の技術を使用することによって改変され得る。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組合せ得る、ENDOXのPNA-DNAキメラが生成され得る。PNA部分が高い結合親和性および特異性を提供する一方で、そのようなキメラは、DNA認識酵素（例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼ）がDNA部分と相互作用するのを可能にする。PNA-DNAキメラは、塩基のスタッキング（stacking）、核酸塩基間の結合数および方向を考慮して選択される適切な長さのリンカーを使用して連結され得る（Hyrupら（1996）上記を参照のこと）。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrupら（1996）上記およびFinnら（1996）Nucl Acids Res 24:3357~63において記載されるように行われ得る。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホラミダイトカップリング化学を用いて固体支持体上で合成され得、そして改変されたヌクレオシドアナログ（例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホラミダイト）が、PNAとDNAの5'末端との間に使用され得る（Magら（1989）Nucl Acid Res 17:5973~5988を参照のこと）。次いで、PNAモノマーが段階様式でカップリングされ、5' PNAセグメントおよび3' DNAセグメントを有するキメラ分子を生成する（例えば、Finnら（1996）上記を参照のこと）。あるいは、5' DNAセグメントおよび3' PNAセグメントを用いて、キメラ分子が合成され得る。例えば、Petersenら（1975）Bioorg Med Chem Lett 5:1119~11124を参照のこと。

#### 【0243】

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、以下のような他の付属の基を含み得る：ペプチド（例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的化するため）、または細胞膜を横切る輸送を容易にする因子（例えば、Letsingerら、1989、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:6553~6556；Lemaitreら、1987、Proc.Natl.Acad.Sci.84:648~652；PCT公開番号WO88/09810を

参照のこと)、または血液脳関門(例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと)。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発切断剤(例えば、Krolら、1988、BioTechniques 6:958~976を参照のこと)、またはインターカレート剤(例えば、Zon, 1988、Pharm. Res. 5:539~549を参照のこと)で改変され得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子(例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤など)に結合され得る。

#### 【0244】

(ENDOXポリペプチド)

本発明のポリペプチドは、その配列が配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35~45、47、および49に提供されるENDOXポリペプチドのアミノ酸配列を含むタンパク質を含む。本発明はまた、なおそのENDOX活性および生理学的機能を維持するタンパク質、またはその機能的フラグメントをコードするが、その任意の残基が配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35~45、47、および49に示される対応する残基から変化され得る、変異体または改変体タンパク質を含む。

#### 【0245】

一般に、ENDOX様機能を保持するENDOX改変体は、配列中の特定位置の残基が他のアミノ酸により置換され、そしてさらに、親タンパク質の2つの残基間にさらなる残基を挿入する可能性、および親配列から1つ以上の残基を欠失する可能性を含む任意の改変体を含む。任意のアミノ酸置換、挿入または欠失が、本発明に包含される。好適な状況では、この置換は、上記で規定されるような保存的置換である。

#### 【0246】

本発明の1つの局面は、単離されたENDOXタンパク質、およびその生物学的に活性な部分、またはその誘導體、フラグメント、アナログもしくはホモログ

に関する。抗ENDOX抗体を惹起するための免疫原としての使用に適するポリペプチドフラグメントもまた提供される。1つの実施形態では、ネイティブなENDOXタンパク質が、標準的なタンパク質精製技法を用いる適切な精製スキームにより、細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態では、ENDOXタンパク質は、組換えDNA技法により生産される。組換え発現の代替として、ENDOXタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技法を用いて化学的に合成され得る。

#### 【0247】

「単離された」または「精製された」ポリペプチドもしくはタンパク質またはその生物学的に活性な部分は、ENDOXタンパク質の由来する細胞または組織供給源由来の細胞性物質または他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、あるいは化学合成される場合には、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、ENDOXタンパク質の調製物を含み、この調製物において、タンパク質が単離または組換え産生される細胞の細胞性成分から、タンパク質は分離されている。1つの実施形態において、用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、非ENDOXタンパク質（本明細書中において「夾雑タンパク質」とも呼ばれる）を約30%未満（乾燥重量にて）、より好ましくは非ENDOXタンパク質を約20%未満、なおより好ましくは非ENDOXタンパク質を約10%未満、そして最も好ましくは非ENDOXタンパク質を約5%未満有する、ENDOXタンパク質の調製物を含む。ENDOXタンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え産生される場合、好ましくは、調製物はまた培養培地を実質的に含まない。すなわち、培養培地は、そのENDOXタンパク質調製物の容量の約20%未満、より好ましくは約10%未満、そして最も好ましくは約5%未満を示す。

#### 【0248】

用語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、タンパク質が、そのタンパク質の合成に関与する化学前駆体または他の化学物質から分離されているENDOXタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態において、用語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、化学前駆体または非E

ENDO Xの化学物質を約30%未満(乾燥重量にて)、より好ましくは化学前駆体または非ENDO X化学物質を約20%未満、なおより好ましくは化学前駆体または非ENDO X化学物質を約10%未満、そして最も好ましくは化学前駆体または非ENDO X化学物質を約5%未満有する、ENDO Xタンパク質の調製物を含む。

#### 【0249】

ENDO Xタンパク質の生物学的に活性な部分は、全長ENDO Xタンパク質より少ないアミノ酸を含み、そしてENDO Xタンパク質の少なくとも1つの活性を示す、ENDO Xタンパク質のアミノ酸配列(例えば、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35~45、47、および49に示されるアミノ酸配列)に十分に相同なアミノ酸配列、またはENDO Xタンパク質のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、ENDO Xタンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。ENDO Xタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、長さが10、25、50、100またはそれより多いアミノ酸残基であるポリペプチドであり得る。

#### 【0250】

さらに、タンパク質の他の領域が欠失している他の生物学的に活性な部分は、組換え技術によって調製され得、そしてネイティブなENDO Xタンパク質の機能的活性のうちの1つ以上について評価され得る。

#### 【0251】

1つの実施形態において、ENDO Xタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35~45、47、および49に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、ENDO Xタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35~45、47、および49に実質的に相同であり、そして以下に詳細に議論されるように、天然の対立遺伝子改変ま

たは変異誘発に起因してアミノ酸配列が異なるが、なお配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49のタンパク質の機能的活性を保持する。従って、別の実施形態において、ENDOXタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49のアミノ酸配列に少なくとも約45%相同なアミノ酸配列を含み、そして、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35～45、47、および49のENDOXタンパク質の機能的活性を保持するタンパク質である。

#### 【0252】

(2つ以上の配列間の相同性の決定)

2つのアミノ酸配列または2つの核酸の相同性の%を決定するために、配列は、至適な比較の目的のために整列される(例えば、ギャップが、第2のアミノ酸配列または核酸配列との最適整列のために、第1のアミノ酸配列または核酸配列の配列中に導入され得る)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、分子はその位置で相同である(すなわち、本明細書中で使用される場合、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸の「同一性」と等価である)。

#### 【0253】

核酸配列の相同性は、2つの配列間の同一性の程度として決定され得る。相同性は、当該分野において公知のコンピュータプログラム(例えば、GCGプログラムパッケージにおいて提供されるGAPソフトウェア)を用いて決定され得る。NeedlemanおよびWunsch 1970 J Mol Biol 48:443~453を参照のこと。核酸配列比較のための以下の設定(GAP作製ペナルティー、5.0、およびGAP伸長ペナルティー、0.3)を用いてGCG GAPソフトウェアを使用すると、上記で言及される類似の核酸配列

のコード領域は、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46、および48に示されるDNA配列のCDS(コード)部分と、好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性の程度を示す。

#### 【0254】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が、特定の比較領域にわたって、残基毎を基準として同一である程度をいう。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、以下により算出される：この比較領域にわたって最適に整列された2つの配列を比較すること、両方の配列において同一の核酸塩基(例えば、核酸の場合にはA、T、C、G、U、またはI)が存在する位置の数を決定し、一致した位置の数を導くこと、この一致した位置の数を、比較領域の内の位置の総数(すなわち、ウインドウサイズ)で除算すること、そしてその結果を100で乗算して、配列同一性のパーセンテージを導くこと。用語「実質的な同一性」は、本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、ここでこのポリヌクレオチドは、比較領域にわたり参照配列と比較して、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%の同一性、そして頻繁には90~95%の配列同一性、より通常には少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。

#### 【0255】

(キメラタンパク質および融合タンパク質)

本発明はまた、ENDOXキメラタンパク質または融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合、ENDOX「キメラタンパク質」またはENDOX「融合タンパク質」は、非ENDOXポリペプチドに作動可能に連結された、ENDOXポリペプチドを含む。「ENDOXポリペプチド」は、ENDOXタンパク質(配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35~45、47、および49)に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいうが、「非ENDOXポリペプチド」は、ENDOXタンパク質に対して実質的に相同で

はないタンパク質（例えば、ENDOXタンパク質とは異なり、かつ同一または異なる生物体に由来するタンパク質）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。ENDOX融合タンパク質において、このENDOXポリペプチドは、ENDOXタンパク質のすべてまたは一部分に対応し得る。1つの実施形態では、ENDOX融合タンパク質は、ENDOXタンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態では、ENDOX融合タンパク質は、ENDOXタンパク質の少なくとも2つの生物学的に活性な部分を含む。さらに別の実施形態では、ENDOX融合タンパク質は、ENDOXタンパク質の少なくとも3つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結された」は、ENDOXポリペプチドおよび非ENDOXポリペプチドが、インフレームで互いに融合されていることを示すことが意図される。非ENDOXポリペプチドは、ENDOXポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

#### 【0256】

1つの実施形態においては、この融合タンパク質は、GST-ENDOX融合タンパク質であり、ここではENDOX配列が、GST（すなわち、グルタチオンS-トランスフェラーゼ）配列のC末端に融合される。このような融合タンパク質は、組換えENDOXポリペプチドの精製を容易にし得る。

#### 【0257】

別の実施形態では、融合タンパク質は、そのN末端に異種シグナル配列を含むENDOXタンパク質である。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、ENDOXの発現および/または分泌は、異種シグナル配列の使用を通して増加され得る。

#### 【0258】

さらに別の実施形態においては、この融合タンパク質は、ENDOX-免疫グロブリン融合タンパク質であり、ここではENDOX配列が、免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合される。本発明のこのENDOX-免疫グロブリン融合タンパク質は、薬学的組成物中に取り込まれ、そして被験体に投与されて、細胞の表面上でのENDOXリガントとENDOXタン

パク質との間の相互作用を阻害し、それによってインビボのENDOX媒介シグナル伝達を抑制し得る。このENDOX-免疫グロブリン融合タンパク質を用い、ENDOX同族(cognate)リガンドのバイオアベイラビリティに影響を与え得る。ENDOXリガンド/ENDOX相互作用の阻害は、増殖障害および分化障害の両方の処置、ならびに細胞生存を調節(例えば、促進または阻害)のために、治療的に有用であり得る。さらに、本発明のこのENDOX-免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中で抗ENDOX抗体を産生するための免疫原として用いられ得、ENDOXリガンドを精製し、そしてENDOXリガンドとのENDOXの相互作用を阻害する分子を同定するスクリーニングアッセイで用いられ得る。

#### 【0259】

本発明のENDOXキメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技法により産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントを、従来の技法に従って、例えば、連結のための平滑末端または粘着(stagger)末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて粘着(cohesive)末端のフィルイン(filling-in)、所望しない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を採用することにより、インフレイムで一緒に連結する。別の実施形態では、融合遺伝子を、自動化DNA合成機を含む従来技法により合成し得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅を、後にキメラ遺伝子配列を生成するためにアニールおよび再増幅され得る、2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバーハングを生じるアンカープライマーを用いて実施し得る(例えば、Ausbelら(編)CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、1992を参照のこと)。さらに、融合成分(例えば、GSTポリペプチド)をすでにコードした多くの発現ベクターが市販されている。ENDOXをコードする核酸は、この融合成分がENDOXタンパク質にインフレイム連結されるように、このような発現ベクター中にクローン化され得る。

#### 【0260】

( E N D O X アゴニストおよびアンタゴニスト )

本発明はまた、 E N D O X アゴニスト ( 模倣物 ) として、または E N D O X アンタゴニストとして機能する E N D O X タンパク質の改変体に関する。 E N D O X タンパク質の改変体 ( 例えば、 E N D O X タンパク質の離散した点変異または短縮型 ) が、変異誘発により生成され得る。 E N D O X タンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態の E N D O X タンパク質と実質的に同じ生物学的活性、またはその生物学的活性のサブセットを保持し得る。 E N D O X タンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形態の E N D O X タンパク質の 1 つ以上の活性を、例えば、 E N D O X タンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流メンバーに競合的に結合することにより阻害し得る。従って、特異的生物学的効果が、限られた機能の改変体を用いた処理により惹起され得る。 1 つの実施形態では、このタンパク質の天然に存在する形態の生物学活性のサブセットを有する改変体を用いた被験体の処置は、 E N D O X タンパク質の天然に存在する形態を用いた処置に対して被験体におけるより少ない副作用を有する。

【 0 2 6 1 】

E N D O X アゴニスト ( 模倣物 ) として、または E N D O X アンタゴニストのいずれかとして機能する E N D O X タンパク質の改変体は、 E N D O X タンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性のための E N D O X タンパク質の変異体 ( 例えば、短縮型変異体 ) のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより同定され得る。 1 つの実施形態では、 E N D O X 改変体の多彩なライブラリーは、核酸レベルのコンビナトリアル変異誘発により生成され、そして多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。 E N D O X 改変体の多彩なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を、潜在的な E N D O X 配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいは、その中に E N D O X 配列のセットを含む ( 例えば、ファージディスプレイのための ) より大きな融合タンパク質のセットとして発現可能であるように、酵素的に連結することにより産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的な E N D O X 改変体のライブラリーを産生するために用いられ得る種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化 D N A 合成機中で実施され得、次いでこの合成遺伝子は

、適切な発現ベクター中に連結される。遺伝子の縮重セットの使用は、1つの混合物において、潜在的なENDOX配列の所望のセットをコードする配列のすべての供給量を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当該分野で公知である(例えば、Narang(1983)Tetrahedron 39:3; Itakuraら(1984)Annu Rev Biochem 53:323; Itakuraら(1984)Science 198:1056; Ikeら(1983)Nucl Acid Res 11:477)。

#### 【0262】

(ポリペプチドライブラリー)

さらに、ENDOXタンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーを用いて、ENDOXタンパク質の改変体のスクリーニングおよび引き続く選択のためのENDOXフラグメントの多彩な集団を生成し得る。1つの実施形態では、コード配列フラグメントのライブラリーは、ENDOXコード配列の二本鎖PCRフラグメントを、1分子あたり約1つのみのニックが生じる条件下、ヌクレアーゼで処理すること、二本鎖DNAを変性させること、異なるニック産物からのセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖を形成するためにこのDNAを再生すること、 $S_1$ ヌクレアーゼを用いた処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することにより生成し得る。この方法により、ENDOXタンパク質の種々のサイズのN末端および内部フラグメントをコードする発現ライブラリーが派生し得る。

#### 【0263】

点変異または短縮により作成されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、選択された性質を有する遺伝子産物のcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技法が当該分野で公知である。このような技法を、ENDOXタンパク質のコンビナトリアル変異誘発により生成された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループット分析に適した最も広く用いられる技法は、代表的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現

ベクター中にクローニングすること、得られるベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、およびこのコンビナトリアル遺伝子を、所望の活性の検出が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で発現することを含む。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増大する新規技法であるリクルーシブエンセブル変異誘発 (REM) を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用い、ENDOX 改変体を同定し得る (Arkin および Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7811 - 7815; Delgrave ら (1993) Protein Engineering 6: 327 - 331)。

**【0264】**

(抗ENDOX抗体)

本発明は、本発明のPNDOXポリペプチドに免疫特異的に結合する、 $F_{ab}$  または  $(F_{ab})_2$  のような抗体または抗体フラグメントを包含する。

**【0265】**

単離されたENDOXタンパク質、またはその部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体調製のための標準的な技法を用いて、ENDOXに結合する抗体を生成するための免疫原として用いられ得る。完全長のENDOXタンパク質が用いられ得るが、あるいは、本発明は、免疫原としての使用のためのENDOXの抗原性ペプチドフラグメントを提供する。ENDOXの抗原性ペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30、32、33、35~45 (これを含む)、47および49で示されるアミノ酸配列の少なくとも4アミノ酸残基を含み、そしてこのペプチドに対して惹起された抗体がENDOXと特異的な免疫複合体を形成するように、ENDOXのエピトープを含む。好ましくは、この抗原性ペプチドは、少なくとも6、8、10、15、20、または30のアミノ酸残基を含む。より長い抗原性ペプチドが、使用および当業者に周知の方法により依存して、より短い抗原性ペプチドよりもしばしば好適である。

**【0266】**

本発明の特定の実施形態では、抗原性ペプチドにより包含される少なくとも1つのエピトープは、ENDOXタンパク質の表面上に位置する領域、例えば、親水性領域である。抗体産生を標的にする手段として、親水性および疎水性の領域を示すヒドロパシープロットを、例えば、フーリエ変換とともにまたはなしの、Kyte DoolittleまたはHopp Woods法を含む、当該分野で周知の任意の方法により生成し得る。例えば、それらの全体が本明細書に参考として援用される、HoppおよびWoods、1981、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78:3824-3828; KyteおよびDoolittle 1982、J. Mol. Biol. 157:105-142(これらはその全体が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

#### 【0267】

本明細書で開示されるように、配列番号2、4、6、8、10のENDOXタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくは相同体を、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の生成における免疫原として利用し得る。本明細書で用いる用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、ENDOXのような抗原に特異的に結合(免疫反応)する抗原結合部位を含む分子をいう。このような抗体は、制限されずに、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、 $F_{ab}$  および  $F_{(ab')_2}$  フラグメント、および  $F_{ab}$  発現ライブラリーを含む。特定の実施形態では、ヒトENDOXタンパク質に対する抗体が開示される。当該分野で公知の種々の手順が、配列番号2、4、6、8、10のENDOXタンパク質配列、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくは相同体に対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体の産生のために用いられ得る。これらのタンパク質のいくつかを以下で論議する。

#### 【0268】

ポリクローナル抗体の産生のために、種々の適切な宿主動物(例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたはその他の哺乳動物)を、ネイティブタンパク質、またはその合成改変体、または前述の誘導体での注射により免疫化し得る。適切な免疫原調製物は、例えば、組換えにより発現されたENDOXタンパク質または化学的

に合成されたポリペプチドを含有し得る。この調製物は、アジュバントをさらに含み得る。免疫学的応答を増大するために用いられる種々のアジュバントとしては、フロイントの完全および不完全アジュバント、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノールなど）、Bacille Calmette - GuerinおよびCorynebacterium parvumのようなヒトアジュバント、または類似の免疫刺激剤が挙げられるが、これらに限定されない。所望であれば、ENDOXに対して惹起された抗体分子は、哺乳動物（例えば、血液）から単離され、そしてさらに、IgGフラクションを得るためのプロテインAクロマトグラフィーのような、周知の技法により精製され得る。

#### 【0269】

本明細書で用いられる用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、ENDOXの特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位の特定の1種のみを含む抗体分子の集団をいう。従って、代表的には、モノクローナル抗体組成物は、それと免疫反応する特定のENDOXタンパク質に対し、単一の結合親和性を示す。特定のENDOXタンパク質配列、またはその誘導體、フラグメント、アナログもしくは相同体に対して惹起されたモノクローナル抗体の調製には、連続的な細胞株培養による抗体分子の産生のために提供する任意の技法が利用され得る。このような技法は、制限されずに、ハイブリドーマ技法（Kohler & Milstein, 1975 Nature 256:495-497を参照のこと）；トリオーマ技法；ヒトB細胞ハイブリドーマ技法（Kozborら、1983 Immunol Today 4:72）およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技法（Coleら、1985 MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc. 77-96頁を参照のこと）を含む。ヒトモノクローナル抗体を、本発明の実施において利用し得、そしてヒトハイブリドーマを用いることによるか（Coteら、1983. Proc Natl Acad Sci USA 80:2026-2030を参照のこと）

と)、またはインビトロでヒトB細胞をエプスタイン-バーウイルスで形質転換することにより(Coteら、1985 MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R. Liss、Inc. 77-96頁を参照のこと)産生され得る。上記の引用の各々は、それらの全体が参考として本明細書に援用される。

#### 【0270】

本発明によれば、技法は、ENDOXタンパク質に特異的な単鎖抗体の産生のために適合され得る(例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと)。さらに、方法は、 $F_{ab}$ 発現ライブラリーの構築のために適合され得(例えば、Huseら、1989 Science 246:1275-1281を参照のこと)、ENDOXタンパク質配列、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくは相同体に対し、所望の特異性を有するモノクローナル $F_{ab}$ フラグメントの迅速かつ有効な同定を可能にする。非ヒト抗体は、当該分野で周知の技法により「ヒト化」され得る。例えば、米国特許第5,225,539号を参照のこと。ENDOXタンパク質に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントを、当該分野で公知の技法により産生し得、これには、制限されないで:(i)抗体分子のペプシン消化により産生される $F_{(ab')_2}$ フラグメント;(ii) $F_{(ab')_2}$ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより生成される $F_{ab}$ フラグメント;(iii)抗体分子のパパインおよび還元剤での処理により生成される $F_{ab}$ フラグメントおよび(iv) $F_v$ フラグメントが含まれる。

#### 【0271】

さらに、ヒトおよび非ヒト部分の両方を含むキメラ抗体およびヒト化モノクローナル抗体のような、組換え抗ENDOX抗体(これらは、標準組換えDNA技術を用いて作製され得る)は、本発明の範囲内である。このようなキメラ抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えDNA技術により生成され得る。この技術は例えば、以下に記載の方法を用いる:国際出願番号PCT/US86/02269;欧州特許出願番号184,187号;欧州特許出願番号171,496;欧州特許出願番号173,494;PCT国際公開番号WO 86/01533;米国特許第4,816,567号;米国特許第5,22

5, 539号; 欧州特許出願番号125, 023号; Betterら(1988) Science 240:1041~1043; Liuら(1987) PNAS 84:3439~3443; Liuら(1987) J Immunol 139:3521~3526; Sunら(1987) PNAS 84:214~218; Nishimuraら(1987) Cancer Res 47:999~1005; Woodら(1985) Nature 314:446~449; Shawら(1988) J Natl Cancer Inst 80:1553~1559; Morrison(1985) Science 229:1202~1207; Oiら(1986) BioTechniques 4:214; Jonesら(1986) Nature 321:552~525; Verhoeffら(1988) Science 239:1534; ならびに Beidlerら(1988) J Immunol 141:4053~4060。上記引用の各々は、それらの全体において参考として本明細書中に援用される。

#### 【0272】

1つの実施形態において、所望の特異性を保有する抗体のスクリーニングのための方法論は、当該分野内で公知の酵素結合抗体免疫吸着アッセイ(ELISA)および他の免疫学的に媒介された技術を含むが、これに限定されない。特定の実施形態において、ENDOXタンパク質の特定のドメインに対して特異的である抗体の選抜は、このようなドメインを所有しているENDOXタンパク質のフラグメントに結合するハイブリドーマの生成により容易にされる。従って、ENDOXタンパク質、またはそれらの誘導體、フラグメント、アナログまたはホモログ内の所望のドメインについて特異的である抗体がまた、本願明細書において提供される。

#### 【0273】

抗ENDOX抗体は、ENDOXタンパク質の局在化および/または定量化に関する当該分野で公知の方法において用いられ得る(例えば、適切な生理学的なサンプル内のENDOXタンパク質のレベルを測定する使用のために、診断的方法における使用のために、タンパク質の画像化における使用のために、など)。所定の実施形態において、ENDOXタンパク質、またはそれらの誘導體、フラ

グメント、アナログまたはホモログの抗体（抗体由来の結合ドメインを含む）は、薬理的に活性な化合物〔本明細書中、以降において「治療剤」〕として利用される。

#### 【0274】

抗ENDOX抗体（例えば、モノクローナル抗体）は、標準技術（例えばアフィニティークロマトグラフィまたは免疫沈降）によって、ENDOXポリペプチドを単離するために用いられ得る。抗ENDOX抗体は、細胞からの天然のENDOXポリペプチド、そして宿主細胞において発現される組換え的に産生されたENDOXポリペプチドの精製を容易にし得る。さらに、抗ENDOX抗体が、（例えば、細胞の溶菌液または細胞上清における）ENDOXタンパク質を検出するために用いられ、ENDOXタンパク質の発現の量およびパターンを評価し得る。抗ENDOX抗体は、例えば、所定の治療レジメンの有効性を決定するために、臨床試験の手順の一部として組織におけるタンパク質レベルを診断的にモニターするために用いられ得る。検出は、抗体を検出可能物質に連結する（すなわち、物理的に連結する）ことにより容易になり得る。検出可能物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光材料、生物発光材料および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン（dichlorotriazinylamine）フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられる；発光材料の例としては、ルミノールが挙げられる；生物発光材料の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられる；そして、適切な放射性物質の例としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^3\text{H}$ が挙げられる。

#### 【0275】

（ENDOX組換え発現ベクターおよび宿主細胞）

本発明の別の局面は、ENDOXタンパク質、またはそれらの誘導体、フラグ

メント、アナログもしくはホモログをコードする核酸を含む、ベクター、好ましくは、発現ベクターに関する。本明細書において使用する場合、用語「ベクター」は、それに連結された別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。1つの型のベクターは、「プラスミド」である。これはさらなるDNAセグメントが連結され得る環状の二本鎖DNAループをいう。他の型のベクターは、ウイルス性ベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントが、ウイルスゲノムに連結され得る。特定のベクターは、ベクターが導入される宿主細胞中で自律複製し得る（例えば、細菌性の複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、そして、これにより宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を導き得る。このようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術における有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本願明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に用いられる形態のベクターであるので、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、等価の機能を果たす、ウイルス性ベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）のような、このような他の形態の発現ベクターを含むことを意図する。

#### 【0276】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態の本発明の核酸を含む。これは、組換え発現ベクターが、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結されている、発現に用いられるべき宿主細胞に基づいて選択される、1つ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内で、「作動可能に連結する」とは、目的のヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロの転写/翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入される場合は、宿主細胞において）ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節配列に連結されるという意味を意図する。

#### 【0277】

用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことを意図する。このような調節配列は、例えば、Goeddel ; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY : METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif. (1990)に記載されている。調節配列は、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を指向する配列（例えば、組織特異的調節配列）を含む。発現ベクターの設計が形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは当業者には明白である。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され得、それにより、本明細書に記載される核酸によりコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質またはペプチドを含む）（例えば、ENDOXタンパク質、またはENDOXの変異形態、融合タンパク質など）を生成し得る。

#### 【0278】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞における、ENDOX発現のために設計され得る。例えば、ENDOXタンパク質は、細菌細胞（例えば、E. coli）、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Goeddel ; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY : METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif. (1990)にさらに考察されている。あるいは、組換え型発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写および翻訳され得る。

#### 【0279】

原核生物におけるタンパク質の発現は、最も頻繁には、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを有するE. coliにおいて実行される。融合ベクターは、そこにコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ

末端に、多数のアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、以下の3つの目的のために役立つ：(1)組換えタンパク質の発現を増加させること；(2)組換えタンパク質の可溶性を増加させること；および(3)アフィニティー精製においてリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製の際に補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解の切断部位が、融合部分の結合部に導入され、そしてこの組換えタンパク質により、融合タンパク質の精製の後に融合部分から組換えタンパク質を分離することが可能になる。このような酵素、およびその同族の認識配列は、第Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを、それぞれ、標的の組換えタンパク質に融合するpGEX(Pharmacia Biotech Inc.; Smith and Johnson(1988)Gene 67:31-40)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, Mass.)およびpRIT5(Pharmacia, Piscataway, N.J.)が挙げられる。

#### 【0280】

適切な誘導性非融合E.coli発現ベクターの例には、pTrc(Amrannら(1988)Gene 69:301-315)およびpET 11d(Studierら、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif.(1990)60-89)が挙げられる。

#### 【0281】

E.coliにおける組換えタンパク質発現を最大化するための1つのストラテジーは、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌中でタンパク質を発現することである。Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego

, Calif. (1990) 119 - 128を参照のこと。別の戦略は、各アミノ酸についての個々のコドンが、E. coliにおいて優先的に利用されるコドンであるように発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである(Wadaら(1992) Nucleic Acids Res. 20 : 2111 - 2118)。本発明のこのような核酸配列の変更は、標準的なDNA合成技術によって実行され得る。

#### 【0282】

別の実施形態において、ENDOX発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母*S. cerevisiae*における発現のためのベクターの例には、pYepSec1(Baldariら、(1987)EMBO J 6:229-234)、pMFa(KurjanおよびHerskowitz、(1982)Cell 30:933-943)、pJRY88(Schultzら、(1987)Gene 54:113-123)、pYES2(Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、およびpicZ(Invitrogen Corp., San Diego, Calif.)が挙げられる。

#### 【0283】

あるいは、ENDOXは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞中で発現され得る。培養昆虫細胞(例えば、SF9細胞)中でのタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAcシリーズ(Smithら(1983)Mol Cell Biol 3:2156-2165)およびpVLシリーズ(LucklowおよびSummers(1989)Virology 170:31-39)が挙げられる。

#### 【0284】

なお別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8(Seed(1987)Nature 329:840)およびpMT2PC(Kaufmanら(1987)EMBO J 6:187-195)が挙げられる。哺乳動物細胞中で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、

ウイルスの調節エレメントによって提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方のための他の適切な発現系については、例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989の第16章および第17章を参照のこと。

【0285】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型中で優先的に核酸の発現を指向し得る（例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現する）。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例には、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkertら（1987）Genes Dev 1:268-277）、リンパ特異的プロモーター（CalameおよびEaton（1988）Adv Immunol 43:235-275）、T細胞レセプターの特定のプロモーターにおいて（WinotoおよびBaltimore（1989）EMBO J 8:729-733）および免疫グロブリン（Banerjiら（1983）Cell 33:729-740；QueenおよびBaltimore（1983）Cell 33:741-748）、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；ByrneおよびRuddle（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477）、膵臓特異的プロモーター（Edlundら（1985）Science 230:912-916）、および乳腺特異的プロモーター（例えば、ミルク乳清プロモーター；米国特許第4,873,316号および欧州出願公開第264,166号）が挙げられる。発生的に調節されるプロモーターもまた含まれる（例えば、マウスホックス（murine hox）プロモーター（KesselおよびGruss（1990）Science 249:374

- 379) および - フェトプロテインプロモーター (Campe s および T i l g h m a n ( 1 9 8 9 ) G e n e s D e v 3 : 5 3 7 - 5 4 6 ) 。

【0286】

本発明はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、そのDNA分子は、ENDOX mRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の発現(DNA分子の転写によって)を可能にする様式で調節配列に作動可能に連結される。種々の細胞型におけるアンチセンスRNA分子の連続的な発現を指向する、アンチセンス方向でクローニングされた核酸に作動可能に連結される調節配列が選択され得る。例えば、アンチセンスRNAの構成的発現、組織特異的発現、または細胞特異的発現を指向する、ウイルスプロモーターおよび/もしくはエンハンサー、または調節配列が選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化されたウイルスの形態であり得、ここではアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で産生され、その活性は、ベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の議論については、Weintraubら、「Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis」、Reviews - - Trends in Genetics、第1巻(1)1986を参照のこと。

【0287】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の対象の細胞をいうのみでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をいうことが理解される。変異または環境的影響のいずれかに起因して、特定の改変は次の世代において存在し得るので、このような子孫は、実際、親の細胞と同一でないかもしれないが、なお、本明細書中で使用されるような用語の範囲内に含まれる。

【0288】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、E

ENDO Xタンパク質は、細菌細胞（例えば、E . c o l i i）、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（C H O）またはC O S細胞）で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0289】

ベクターDNAは、従来的な形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらには、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションするための適切な方法は、Sambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989）および他の実験室マニュアルに見出され得る。

【0290】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションについては、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞のほんの一部のみが外来DNAをそのゲノムに組み込み得ることが知られている。これらの組み込み体（i n t e g r a n t）を同定および選択するために、選択マーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子が、一般的には目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。種々の選択マーカーには、薬物（例えば、G418、ハイグロマイシン、およびメトトレキサート）に対する耐性を付与するものが含まれる。選択マーカーをコードする核酸は、ENDO Xをコードするベクターと同じベクター上で宿主細胞に導入され得るか、あるいは別々のベクター上で導入され得る。導入された核酸とともに安定にトランスフェクトされる細胞は、薬物選択によって同定され得る（例えば、選択マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生存

し、一方、他の細胞は死滅する)。

【0291】

本発明の宿主細胞(例えば、培養中の原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞)は、ENDOXタンパク質を産生(すなわち、発現)するために使用され得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して、ENDOXタンパク質を産生するための方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、ENDOXタンパク質が産生されるような適切な培地中で、本発明の宿主細胞(ここに、ENDOXタンパク質をコードする組換え発現ベクターが導入された)を培養する工程を包含する。別の実施形態において、この方法はさらに、培地または宿主細胞からENDOXタンパク質を単離する工程を包含する。

【0292】

(トランスジェニックENDOX動物)

本発明の宿主細胞はまた、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。例えば、1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、ENDOXタンパク質コード配列が導入される、受精した卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような宿主細胞は、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得、ここで外因性のENDOX配列は、それらのゲノムまたは相同組換え動物(ここで、内因性のENDOX配列は、変更されている)に導入される。このような動物は、ENDOXタンパク質の機能および/または活性を研究するため、およびENDOXタンパク質の活性のモジュレーターを同定および/または評価するために有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」とは、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラットまたはマウスのような齧歯動物であり、ここでこれらの動物の1つ以上の細胞は、導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などを含む。導入遺伝子は、細胞のゲノムに組み込まれ(この細胞からトランスジェニック動物が発生する)、そして成熟動物のゲノムに残存する外因性のDNAであり、それによって、このトランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織においてコード遺伝子産物の発現を指向する。本明細書中で使用される場合、「相同組換え動物」

とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスであり、ここで、内因性ENDOX遺伝子は、この内因性の遺伝子と、動物の発生の前に動物の細胞（例えば、動物の胚細胞）に導入された外因性DNA分子との間の相同組換えによって、変更されている。

【0293】

本発明のトランスジェニック動物は、ENDOXをコードする核酸を、（例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって）受精した卵母細胞の雄性前核に導入すること、およびこの卵母細胞が偽妊娠雌性フォスター動物（*foster animal*）中で発生することを可能にすることによって作製され得る。配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48のヒトENDOX cDNA配列は、非ヒト動物のゲノムに導入遺伝子として導入され得る。あるいは、ヒトENDOX遺伝子の非ヒトホモログ（例えば、マウスENDOX遺伝子）が、ヒトENDOX cDNAに対するハイブリダイゼーションに基づいて単離され得（以下にさらに記載される）、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた導入遺伝子中に含まれ、その導入遺伝子の発現の効率を増大させ得る。組織特異的調節配列（単数または複数）は、特定の細胞に対して、ENDOXタンパク質の発現を指向するために、ENDOX導入遺伝子に作動可能に連結され得る。胚の操作およびマイクロインジェクションを介するトランスジェニック動物（特に、マウスのような動物）を生成するための方法は、当該分野で従来的になっており、そして例えば、米国特許第4,736,866号；同第4,870,009号；および同第4,873,191号；ならびにHogan 1986、*MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載されている。同様の方法は、他のトランスジェニック動物の作製のために使用される。トランスジェニック初代動物は、そのゲノムにおけるENDOX導入遺伝子の存在および/またはその動物の組織または細胞中のENDOX mRNAの発現に基づいて同定され得る。次いで、トランスジェニック初代動物は、導入遺伝子を有するさらなる動物を繁殖さ

せるために使用され得る。さらに、E N D O Xタンパク質をコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物に繁殖させ得る。

#### 【0294】

相同組換え動物を作製するために、欠失、付加、または置換が導入されて、それによってE N D O X遺伝子が増加（例えば、機能的に破壊）されている、少なくとも、E N D O X遺伝子の一部を含むベクターを調製する。E N D O X遺伝子はヒト遺伝子（例えば、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48のcDNA）であり得るが、より好ましくは、ヒトE N D O X遺伝子の非ヒトホモログである。例えば、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48のヒトE N D O X遺伝子のマウスホモログは、マウスゲノムにおいて内因性E N D O X遺伝子を変更するのに適切な相同組換えベクターを構築するために使用され得る。1つの実施形態において、そのベクターは、相同組換えに際して、内因性E N D O X遺伝子が機能的に破壊される（すなわち、機能的タンパク質をもはやコードしない；「ノックアウト」ベクターともいわれる）ように設計される。

#### 【0295】

あるいは、このベクターは、相同組換えに対して、内因性E N D O X遺伝子が増加されるか、あるいはさもなければ、変更されるが、なお機能的タンパク質をコードするように設計される（例えば、上流の調節領域を変更して、それによって内因性E N D O Xタンパク質の発現を変更し得る）。相同組換えベクターにおいて、E N D O X遺伝子の変更された部分は、E N D O X遺伝子のさらなる核酸によって、その5'末端および3'末端で隣接され、相同組換えが、そのベクターによって運ばれる外因性E N D O X遺伝子と胚性幹細胞中の内因性E N D O X遺伝子との間で起こることを可能にする。このさらなる隣接するE N D O X核酸は、内因性遺伝子との首尾よい相同組換えに十分な長さである。代表的に、数千ベースの隣接するDNA（5'末端および3'末端の両方における）が、ベクターに含まれる。例えば、相同組換えベクターの記載について、Thomasら（1987）Cell 51:503を参照のこと。このベクターは、胚性幹細

胞株に導入され(例えば、エレクトロポレーションによって)、この導入された ENDOX 遺伝子が、内因性 ENDOX 遺伝子と相同組換えされた細胞が、選択される(例えば、Liら(1992) Cell 69:915を参照のこと)。

#### 【0296】

次いで、この選択された細胞を、動物(例えば、マウス)の胚盤胞へ注入して、凝集キメラを形成する。例えば、Bradley(1987)の Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach、Robertson編、IRL、Oxford 113頁~152頁を参照のこと。次いで、このキメラ胚を、適切な偽妊娠雌性フォスター動物に移植し得、そしてこの胚を、一定期間置く。それらの生殖細胞中に相同組換えされたDNAを保有する子孫を使用して、動物を繁殖し得、ここで、この動物の全ての細胞は、導入遺伝子の生殖系列伝達によって、この相同組換えされたDNAを含む。相同的組換えベクターおよび相同的組換え動物を構築するための方法が、さらに以下に記載される; Bradley(1991) Curr Opin Biotechnol 2:823-829; PCT国際公開番号: WO90/11354; WO91/01140; WO92/0968; およびWO/93/04169。

#### 【0297】

別の実施形態において、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択された系を含む、非ヒトトランスジェニック動物が産生され得る。このような系の1つの例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。cre/loxPリコンビナーゼ系の記載については、例えば、Laksoら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Saccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系である(O'Gormanら(1991) Science 251:1351-1355)。cre/loxPリコンビナーゼ系が導入遺伝子の発現を調節するために使用される場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が、必要となる。このような動物は、例えば、2種のトランスジェ

ニック動物（一方は選択されたタンパク質をコードした導入遺伝子を含み、他方はリコンビナーゼをコードした導入遺伝子を含む）を交配することによる、「二重の」トランスジェニック動物の構築によって提供され得る。

【0298】

本明細書中に記載される非ヒトトランスジェニック動物のクローンがまた、Wilmutら(1997) Nature 385:810-813に記載される方法に従って、産生され得る。簡単には、トランスジェニック動物からの細胞（例えば、体細胞）を単離して、そして増殖サイクルから出させてそしてG<sub>0</sub>期に入るように誘導する。次いで、この静止細胞を、例えば、電気パルスの使用により、この静止細胞が単離される同種動物由来の除核された卵母細胞へ融合し得る。次いで、この再構成された卵母細胞を培養し、これにより、この卵母細胞は、桑実胚または未分化胚芽細胞に発達し、次いで、偽妊娠雌性フォスター動物に移入される。この雌性フォスター動物の産生子孫は、この細胞（例えば、体細胞）が単離される動物のクローンである。

【0299】

（薬学的組成物）

本発明のENDOX核酸分子、ENDOXタンパク質、および抗ENDOX抗体（これはまた、本明細書中で「活性化化合物」として参照される）、ならびにそれらの誘導體、フラグメント、アナログ、およびホモログが、投与に適した薬学的組成物に組み込まれ得る。このような組成物は、代表的に、核酸分子、タンパク質または抗体、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書中で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的な投与に適合した、任意および全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤（delaying agent）などを含むことが意図される。適切なキャリアは、Remington's Pharmaceutical Sciences（当該分野の標準的な参照テキスト）の最新版に記載される（これは、本明細書中に参考として援用される）。このようなキャリアまたは希釈剤の好ましい例としては、水、生理食塩水、フィンガー（finger's）溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられる。リ

ポソームおよび非水性ビヒクル（例えば、揮発性油）もまた、使用され得る。薬学的に活性な物質に対する、このような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または薬剤が、この活性化化合物と不適合である限りを除いて、この組成物におけるそれらの使用が考慮される。補助的活性化化合物もまた、組成物へ組み込まれ得る。

### 【0300】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与の経路と適合するように処方される。投与の経路の例には、非経口（例えば、静脈、皮内、皮下）投与、経口（例えば、吸入）投与、経皮（局所的）投与、経粘膜（transmucosal）投与、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：注射用水、生理食塩水溶液、揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒のような滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝液；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張度の調節のための薬剤。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整され得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、あるいはガラスまたはプラスチックから作製される多用量のバイアル中に入れられ得る。

### 【0301】

注射使用に適した薬学的組成物は、滅菌の水溶液（ここで、水溶性）または水性分散液、および滅菌の注射可能な溶液または分散液の即座調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与について、適切なキャリアには、生理食塩水、静菌性水、Cremophor EL™（BASF、 Parsippany、 N. J.）またはリン酸塩緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、組成物は、滅菌性であるべきであり、そして容易な注入性（syringability）が存在する程度に流動的であるべきである。これは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されるべきである。このキャリアは、例えば、以下を含む溶媒

または分散液であり得る：水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）ならびにそれらの適切な混合物。適切な流動性が、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合、要求される粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど）によって達成され得る。多くの場合、組成物中に等張剤（例えば、糖、マンニトール（*manitol*）、ソルビトールなどのポリアルコール、塩化ナトリウム）を含むことが好ましい。注射可能組成物の長期の吸収は、吸収を遅らせる薬剤（例えば、アルミニウムモノステアレートおよびゼラチン）を組成物に含ませることによってもたらされ得る。

#### 【0302】

滅菌注射可能液剤は、必要量のこの活性化化合物（例えば、ENDOXタンパク質または抗ENDOX抗体）を、適切な溶媒中に、上記で列挙される成分の1つまたは組み合わせと共に組み込み、必要な場合、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般的に、分散液は、活性化化合物を、基本（*basic*）分散媒および上記で列挙される成分からの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中へ組み込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合において、調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、活性成分および既に滅菌濾過されたその溶液からの任意のさらなる所望の成分の粉末を得る。

#### 【0303】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤へ圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、この活性化化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、マウスウォッシュ（*mouthwash*）としての使用のために流体キャリアを使用して調製され得、ここで、この流体キャリア中のこの化合物は、経口的に適用され、そして素早く動かされ（スイッシュ）（*swish*）、そして吐き出さ

れるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント材料が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などが、任意の以下の成分または同様の性質を有する化合物を含み得る：結合剤（例えば、微結晶セルロース、ガムトラガントまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸）、Primogel、またはコーンスターチ；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはSterotes）；グライダント（glidant）（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは香味剤（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー）。

#### 【0304】

吸入による投与について、この化合物は、適切な噴霧剤（例えば、二酸化炭素のような気体）を含む圧縮容器またはディスペンサー、あるいは噴霧器から、エアロゾルスプレーの形態で送達される。

#### 【0305】

全身的投与はまた、経粘膜手段または経皮手段により得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透されるバリアに対して適切な浸透剤が、処方において使用される。このような浸透剤は、一般的に、当該分野で公知であり、そして、例えば、経粘膜投与については、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻スプレーまたは坐剤によって達成され得る。経皮投与については、この活性化合物は、当該分野で一般的に公知である軟膏剤、軟膏、ゲル、またはクリーム剤へ処方される。

#### 【0306】

この化合物はまた、直腸送達のための坐剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤ベースと共に）または保持浣腸の形態で調製され得る。

#### 【0307】

1つの実施形態において、この活性化合物は、身体からの迅速な排出に対してこの化合物を保護するキャリアを用いて調製され（例えば、制御放出処方物）、

これには、移植片およびマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。酢酸エチレンビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような、生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当該業者には明らかである。これらの材料はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手可能である。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を含む、感染させた細胞へ標的化されるリポソームを含む）がまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

#### 【0308】

投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、投薬単位形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有益である。本明細書で使用される投薬単位形態は、処置される被験体のための単位投薬量として適切な物理的に個々の単位をいい；各単位は、必要とされる薬学的キャリアと関連して所望の治療的効果を生じるように計算された、所定量の活性化化合物を含む。本発明の投薬単位形態についての詳細は、この活性化化合物の独特の特徴、および達成される特定の治療効果、ならびに個体の処置のためのこのような活性化化合物を調合する当該分野に固有の制限によって決定されるか、あるいはこれらに直接依存する。

#### 【0309】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、被験体へ、例えば静脈注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照のこと）によって、または定位注射（例えば、Chenら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:3054-3057を参照のこと）によって送達され得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物は、受容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含み得、または遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれる徐放性マトリックスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが組換え細胞からインタクトで産生され得（例えば、レトロウイルスベクター）、薬学的調製物は、遺伝子送達系を産

生する1以上の細胞を含み得る。

【0310】

薬学的組成物は、投与のための使用説明書と共に容器、包装、またはディスペンサーに含まれ得る。

【0311】

(スクリーニング方法および検出方法)

本発明の単離された核酸分子は、ENDOXタンパク質を発現するために(例えば、遺伝子治療適用の際に宿主細胞における組み換え発現ベクターを介して)、ENDOX mRNA(例えば、生物学的サンプルにおける)またはENDOX遺伝子における遺伝損傷を検出するために、および以下にさらに記載されるようなENDOX活性を調節するために使用され得る。さらに、ENDOXタンパク質は、ENDOXタンパク質活性または発現を調節する薬物または化合物をスクリーニングするため、ならびにENDOXタンパク質の不十分かもしくは過剰な産生またはENDOX野生型タンパク質と比較して活性が低下しているかもしくは異常なENDOXタンパク質形態の産生によって特徴づけられる障害(例えば、糖尿病(インスリン放出を調節する);肥満(脂質に結合して脂質を輸送する);肥満に関連した代謝障害、代謝性X症候群ならびに慢性疾患および種々の癌に関連した食欲不振および消耗障害、ならびに感染性疾患(抗微生物活性を有する)および種々の脂肪代謝異常(dyslipidemia))を処置するために使用され得る。さらに、本発明の抗ENDOX抗体は、ENDOXタンパク質を検出および単離し、ならびにENDOX活性を調節するために使用され得る。さらなる局面では、本発明は、食欲、栄養素の吸収および代謝物質の廃棄にポジティブな様式およびネガティブな様式の両方で影響を与える方法において用いられ得る。

【0312】

本発明は、さらに、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される新規の薬剤および上記される処置のためのそれらの使用に関する。

【0313】

(スクリーニングアッセイ)

本発明は、調節因子、すなわち、E N D O Xタンパク質に結合するか、あるいは例えば、E N D O Xタンパク質発現またはE N D O Xタンパク質活性に対して刺激効果または阻害効果を有する、候補化合物または候補薬剤、あるいは試験化合物または試験薬剤（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子または他の薬物）を同定するための方法（本明細書中において「スクリーニングアッセイ」とも称される）を提供する。本発明はまた、本明細書中で記載されるスクリーニングアッセイにおいて同定される化合物を含む。

#### 【0314】

1つの実施形態において、本発明は、E N D O Xのタンパク質またはポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分の膜結合形態に結合するか、またはそれら膜結合形態の活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における任意の多数のアプローチを使用して得られ得、これらのライブラリーとしては、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相もしくは液相ライブラリー；逆重畳を要する合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチドライブラリー、非ペプチドオリゴマーライブラリーもしくは低分子ライブラリーの化合物に適用可能である。例えば、Lam、1997、Anticancer Drug Design 12:145。

#### 【0315】

本明細書中で使用される場合、「低分子」とは、約5 k D未満の分子量、最も好ましくは約4 k D未満の分子量を有する組成物をいうことを意味する。低分子は、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣体、糖、脂質または他の有機分子もしくは無機分子であり得る。化学的および/または生物学的混合物（例えば、真菌、細菌または藻類の抽出物）のライブラリーは、当該分野で公知であり、そして本発明のアッセイのいずれかを用いてスクリーニングされ得る。

## 【0316】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る：DeWittら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:6909; Erbら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:11422; Zuckermannら、1994、J. Med. Chem. 37:2678; Choら、1993、Science 261:1303; Carrellら、1994、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carrellら、1994、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; およびGallopら、1994、J. Med. Chem. 37:1233。

## 【0317】

化合物のライブラリーは、溶液中で(例えば、Houghten、1992、Biotechniques 13:412~421)、あるいはビーズ上(Lam、1991、Nature 354:82~84)、チップ上(Fodor、1993、Nature 364:555~556)、細菌(Ladner 米国特許第5,223,409号)、孢子(Ladner、米国特許第5,233,409号)、プラスミド(Cullら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865~1869)またはフェージ上(ScottおよびSmith、1990、Science 249:386~390; Devlin、1990、Science 249:404~406; Cwirllaら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:6378~6382; Felici、1991、J. Mol. Biol. 222:301~310; Ladner、米国特許第5,233,409号)において示され得る。

## 【0318】

1つの実施形態において、アッセイは細胞ベースのアッセイであり、ここで、膜結合形態のENDOXTANパク質、またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上に発現する細胞が、試験化合物と接触され、そしてこの試験化合物が、ENDOXTANパク質に結合する能力が、決定される。例えば、細胞は、哺乳動物起

源の細胞または酵母細胞であり得る。この試験化合物がE N D O Xタンパク質に結合する能力の決定は、例えば、その試験化合物を放射性同位体標識または酵素標識とカップリングさせて、その結果、この試験化合物のE N D O Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分に対する結合が、複合体におけるその標識化合物を検出することによって決定され得ることによって達成され得る。例えば、試験化合物は、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、または $^3\text{H}$ で直接的または間接的のいずれかで標識され得、そしてその放射性同位体が、放射線放射の直接の計数により、またはシンチレーション計数により、検出され得る。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そしてこの酵素的標識が、適切な基質の生成物への転換を決定することにより、検出され得る。1つの実施形態において、このアッセイは、膜結合形態のE N D O Xタンパク質、またはその生物学的に活性な部分をその細胞表面上に発現する細胞を、E N D O Xと結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物に試験化合物を接触させる工程、ならびにこの試験化合物がE N D O Xタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がE N D O Xタンパク質と相互作用する能力を決定する工程が、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、E N D O Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。

#### 【0319】

別の実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、これは、膜結合形態のE N D O Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上で発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物が、E N D O Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物が、E N D O Xまたはその生物学的に活性な部分の活性を調節する能力の決定は、例えば、E N D O Xタンパク質が、E N D O X標的分子に結合またはこれら標的分子と相互作用する能力を決定することによって、達成され得る。本明細書中において使用する場合には、「標的分子」とは、E N D O Xタンパク質が自然に結合ま

たは相互作用する分子であり、例えば、E N D O X相互作用タンパク質を発現する細胞表面上の分子、第二の細胞表面上の分子、細胞外環境中の分子、細胞膜の内部表面と会合する分子、または細胞質分子である。E N D O X標的分子は、非E N D O X分子あるいは本発明のE N D O Xタンパク質またはポリペプチドであり得る。1つの実施形態において、E N D O X標的分子は、シグナル伝達経路の構成要素であり、これは、細胞膜を通過して細胞内への細胞外シグナル（例えば、化合物が膜結合E N D O X分子に結合することにより発生するシグナル）の伝達を促進する。その標的は、例えば、触媒活性を有する第二の細胞間タンパク質、または下流シグナル伝達分子のE N D O Xとの会合を容易にするタンパク質であり得る。

#### 【0320】

E N D O Xタンパク質がE N D O X標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、直接的結合を決定するための上記方法の1つにより、達成され得る。1つの実施形態において、E N D O Xタンパク質がE N D O X標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、その標的分子の活性を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の活性は、その標的の細胞セカンドメッセンジャー（すなわち、細胞内 $Ca^{2+}$ 、ジアシルグリセロール、 $IP_3$ など）の誘導を検出すること、適切な基質への標的の触媒活性/酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子（検出可能なマーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動的に連結されたE N D O X応答性調節エレメントを含む）の誘導を検出すること、または細胞応答（例えば、細胞生存、細胞分化、または細胞増殖）を検出することにより、決定され得る。

#### 【0321】

なお別の実施形態において、本発明のアッセイは、無細胞アッセイであり、E N D O Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物に接触させる工程、ならびにその試験化合物がE N D O Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分と結合する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物の、E N D O Xタンパク質への結合は、上記のように、直接的または間接的にのいずれかで

決定され得る。1つのこのような実施形態において、このアッセイは、ENDO Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、ENDO Xを結合する公知の化合物に接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物に接触させる工程、ならびにその試験化合物がENDO Xタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がENDO Xタンパク質と相互作用する能力を決定する工程は、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、ENDO Xまたはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。

#### 【0322】

さらに別の実施形態において、アッセイは、無細胞アッセイであり、ENDO Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させる工程、ならびにその試験化合物がENDO Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物がENDO Xの活性を調節する能力の決定は、例えば、ENDO Xタンパク質が、ENDO X標的分子に結合する能力を、直接的結合の決定のための上記方法の1つによって決定することにより、達成され得る。代替の実施形態において、この試験化合物がENDO Xタンパク質の活性を調節する能力の決定は、ENDO Xタンパク質が、ENDO X標的分子をさらに調節する能力を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の適切な基質に対する触媒活性/酵素活性は、上記のように決定され得る。

#### 【0323】

なお別の実施形態において、無細胞アッセイは、ENDO Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、ENDO Xタンパク質を結合する公知の化合物に接触させてアッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物がENDO Xタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がENDO Xタンパク質と相互作用する能力の決定は、ENDO Xタンパク質が、ENDO X標的分子と優先的に結合するか、またはその標的分子の活性を優先的に調節する能力を決定する工程を包含する。

## 【0324】

本発明の無細胞アッセイは、ENDOXタンパク質の、可溶性の形態または膜結合形態の両方で使用することが可能である。膜結合形態のENDOXタンパク質を含む無細胞アッセイの場合には、ENDOXタンパク質の膜結合形態が溶液中に維持されるように、可溶化剤を利用することが望ましくあり得る。このような可溶化剤の例としては、非イオン性界面活性剤が挙げられ、例えば、*n*-オクチルグルコシド、*n*-ドデシルグルコシド、*n*-ドデシルマルトシド、オクタノイル-*N*-メチルグルカミド、デカノイル-*N*-メチルグルカミド、Triton(登録商標)X-100、Triton(登録商標)X-114、Thesit(登録商標)、イソトリデシルポリ(エチレングリコールエーテル)<sub>n</sub>(Isotridecylpoly(ethylene glycol ether)<sub>n</sub>)、*N*-ドデシル-*N,N*-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホネート(3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonium-1-propane sulfonate)(CHAPS)、または3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート(3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonium-2-hydroxy-1-propane sulfonate)(CHAPSO)である。

## 【0325】

本発明の上記アッセイ方法の1つより多い実施形態において、ENDOXタンパク質またはその標的分子のいずれかを固定して、そのタンパク質の一方または両方の非複合形態からの複合形態の分離を容易にし、そしてそのアッセイの自動化に適応させることが、望ましくあり得る。試験化合物の、ENDOXタンパク質への結合、または候補化合物の存在下および非存在下での、ENDOXタンパク質の標的分子との相互作用は、これらの反応物を収容するために適切な任意の容器内で、達成され得る。このような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管、および微量遠心管が挙げられる。1実施形態において、そのタンパク質の一方または両方がマトリックスに結合することを可能にするドメインを

付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、GST-ENDOX融合タンパク質またはGST標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ (Sigma Chemical, St. Louis, MO) またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いでこれらは、試験化合物と合わせられるか、あるいは試験化合物および吸着されない標的タンパク質、またはENDOXタンパク質のいずれかと合わせられ、そしてこの混合物が、複合体形成に貢献する条件下 (例えば、塩およびpHに関して生理学的条件) でインキュベートされる。インキュベーションに続いて、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、結合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定し、例えば上記のように、複合体を直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、複合体がマトリックスから解離され得、そしてENDOXタンパク質の結合レベルまたは活性レベルを、標準的な技術を使用して決定し得る。

#### 【0326】

タンパク質をマトリックスに固定するための他の技術がまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、ENDOXタンパク質、またはその標的分子のいずれかが、ビオチンとストレプトアビジンとの結合体化を利用して、固定され得る。ビオチン化ENDOXタンパク質または標的分子は、当該分野において周知の技術を使用して、ビオチン-NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) から調製され得 (例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.)、そしてストレプトアビジンで被覆した96ウェルプレート (Pierce Chemical) のウェルに固定され得る。あるいは、ENDOXタンパク質または標的分子と反応性であるがENDOXタンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体が、そのプレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的またはENDOXタンパク質が、抗体の結合体化によってウェル内にトラップされ得る。このような複合体を検出するための方法としては、GST固定複合体に関しての上記のものに加えて、ENDOXタンパク質または標的分子と反応性の抗体を使用する、複合体の免疫検出、ならびにENDOXタンパク質または標的分子に関連した酵素活

性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

【0327】

別の実施形態において、ENDO Xタンパク質発現のモジュレーターは、細胞を候補化合物と接触させ、そして細胞中のENDO X mRNAまたはタンパク質の発現を決定する方法において同定される。候補化合物の存在下でのENDO X mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、候補化合物の非存在下でのENDO X mRNAまたはタンパク質の発現レベルと比較される。次いで、候補化合物は、この比較に基づいて、ENDO X mRNAまたはタンパク質発現のモジュレーターとして同定され得る。例えば、ENDO X mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下より、その存在下における方が大きい(すなわち、統計的に有意に大きい)場合、この候補化合物は、ENDO X mRNAまたはタンパク質の発現の刺激物質として同定される。あるいは、ENDO X mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下よりその存在下の方が少ない(統計的に有意に少ない)場合、この候補化合物は、ENDO X mRNAまたはタンパク質の発現のインヒビターとして同定される。細胞中のENDO X mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、ENDO X mRNAまたはタンパク質を検出するために本明細書中に記載の方法によって決定され得る。

【0328】

本発明のなお別の局面において、ENDO Xタンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおいて「ベイトタンパク質」として使用されて(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervosら、1993、Cell 72:223-232; Maduraら、1993、J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartelら、1993、Biotechniques 14:920-924; Iwabuchiら、1993、Oncogene 8:1693-1696; および Brent WO94/10300を参照のこと)、ENDO Xに結合するか、またはこれと相互作用し、そしてENDO X活性を調節する他のタンパク質(「ENDO X結合タンパク質」または「ENDO X-bp」)を同定し得る。このようなENDO X結合タンパク質はまた、例えば、ENDO X経路の上流または下流エレメン

トとしてENDOXタンパク質によるシグナルの増幅に関与するようである。

【0329】

ツーハイブリッドシステムは、分離可能なDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる、大部分の転写因子のモジュールの性質に基づく。簡潔には、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。一方の構築物においては、ENDOXをコードする遺伝子が既知の転写因子（例えば、GAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他方の構築物においては、DNA配列のライブラリー由来の、未同定タンパク質（「プレイ」または「サンプル」）をコードするDNA配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。「ベイト」および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用して、ENDOX依存性複合体を形成し得る場合、この転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、非常に近くにある。近位にあることにより、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結されたレポーター遺伝子（例えば、LacZ）の転写を可能にする。レポーター遺伝子の発現が検出され得、そして機能的転写因子を含む細胞コロニーは、単離され得、そしてENDOXと相互作用するタンパク質をコードするクローニングされた遺伝子を得るために使用され得る。

【0330】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規な薬剤および本明細書中に記載されるような処置のためのこの薬剤の使用に関する。

【0331】

（検出アッセイ）

本明細書中で同定されるcDNA配列（および対応する完全な遺伝子配列）の一部またはフラグメントは、ポリヌクレオチド試薬として多くの方法で使用され得る。例えば（限定はされない）、これらの配列を使用して、（i）染色体に対するそれらのそれぞれの遺伝子をマッピングし得る；従って、遺伝疾患に関連した遺伝子の領域を位置決定する；（ii）微量の生物学的サンプルから個体を同定し得る（組織型決定）；および（iii）生物学的サンプルの法医学的識別を助け得る。これらの適用のうちのいくつかは、以下のサブセクションにおいて

記載される。

【0332】

(染色体マッピング)

一旦遺伝子の配列(または配列の一部)が単離されると、この配列を用いて染色体上に遺伝子の位置をマッピングし得る。このプロセスは、染色体マッピングとよばれる。従って、ENDOX配列の一部またはフラグメント、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48またはこれらのフラグメントもしくは誘導体を用いて、それぞれ、ENDOX遺伝子の位置を染色体上にマッピングし得る。ENDOX配列を染色体にマッピングすることは、これらの配列と、疾患と関連する遺伝子とを相関付ける際の重要な第一歩である。

【0333】

簡潔には、ENDOX遺伝子は、ENDOX配列からPCRプライマー(好ましくは、15~25bpの長さ)を調製することにより染色体にマッピングされ得る。ENDOX配列のコンピューター分析を用いて、ゲノムDNAにおいて1より多いエクソンにまたがらないプライマーを迅速に選択し得、従って、増幅プロセスを複雑にし得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのために使用され得る。ENDOX配列に対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが増幅されたフラグメントを生じる。

【0334】

体細胞ハイブリッドは、異なる哺乳動物由来の体細胞(例えば、ヒトおよびマウス細胞)を融合することにより調製される。ヒト細胞とマウス細胞とのハイブリッドが増殖および分裂するにつれ、それらは、無作為な順序で徐々にヒト染色体を失うが、マウス染色体を維持する。特定の酵素がないのでマウス細胞は増殖できないが、ヒト細胞は増殖できる培地を使用することにより、必要な酵素をコードする遺伝子を含む1つのヒト染色体が維持される。種々の培地を使用することによって、ハイブリッド細胞株のパネルが確立され得る。パネルにおける各細胞株は、単一のヒト染色体または少数のヒト染色体のいずれかおよびマウス染色

体の完全なセットを含み、これにより、個々の遺伝子を特定のヒト染色体にマッピングすることが容易に可能になる。例えば、D' Eustachioら、1983、*Science* 220:919-924を参照のこと。ヒト染色体のフラグメントのみを含む体細胞ハイブリッドはまた、転座および欠失を伴うヒト染色体を使用することにより生成され得る。

#### 【0335】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に特定の配列を割り当てるための迅速な手順である。1つのサーマルサイクラーを用いて一日に3つ以上の配列が割り当てられ得る。ENDOX配列を使用して、オリゴヌクレオチドプライマーを設計すると、下位位置決定(sublocalization)が、特定の染色体由来のフラグメントの集団を用いて達成され得る。

#### 【0336】

中期染色体スプレッドに対するDNA配列の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)をさらに使用して、一工程で正確な染色体位置を提供し得る。染色体スプレッドは、コルセミド(紡錘体を破壊する)のような化学物質により分裂が中期においてブロックされた細胞を使用して作製され得る。この染色体は、トリプシンで短時間処理され得、次いで、ギムザ染色され得る。薄いバンドおよび濃いバンドのパターンが各染色体で発色し、その結果、この染色体は、個々に同定され得る。FISH技術は、500塩基または600塩基ほどの長さのDNA配列を用いて使用され得る。しかし、1,000塩基より大きなクローンは、簡単な検出に十分なシグナル強度で、独特の染色体位置に結合する可能性がより高い。好ましくは、1,000塩基、そしてより好ましくは、2,000塩基が妥当な時間量で良好な結果を得るために十分である。この技術の総説については、Vermaら、*HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES* (Pergamon Press, New York 1988)を参照のこと。

#### 【0337】

染色体マッピングの試薬は、単一の染色体またはその染色体上の単一部位を印付けするために個々に使用され得るか、または試薬の集団が、複数部位および/

または複数染色体を印付けするために使用され得る。遺伝子の非コード領域に対応する試薬が、実際に、マッピング目的のために好ましい。コード配列は、遺伝子ファミリー内に保存され、従って、染色体マッピングの間に交差ハイブリダイゼーションの機会が増大する可能性が高い。

#### 【0338】

一旦配列が正確な染色体位置にマッピングされると、その配列の染色体上の物理的位置は、遺伝子マップデータと相関し得る。このようなデータは、例えば、McKusick, MENDELIAN INHERITANCE IN MAN (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryを通じてオンラインで入手可能)において見いだされる。次いで、同じ染色体領域にマッピングされる遺伝子と疾患との間の関係は、例えば、Egelandら(1987) Nature, 325:783-787に記載される連鎖分析(物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝)によって同定され得る。

#### 【0339】

さらに、ENDOX遺伝子と関連する疾患に罹患した個体と、この疾患に罹患していない個体との間のDNA配列における差異が決定され得る。罹患した個体のいくらかまたは全てにおいて変異が認められるが、非罹患個体のいずれにおいても認められない場合、この変異は特定の疾患の候補因子である可能性が高い。罹患個体と非罹患個体の比較は、一般に、染色体における構造的変化(例えば、染色体スプレッドから可視であるか、またはそのDNA配列に基づいたPCRを用いて検出可能な、欠失または転座)を最初に探すことを包含する。最終的に、いくらかの個体に由来する遺伝子の完全な配列決定を行って、変異の存在を確認し、かつ多型に由来する変異を区別し得る。

#### 【0340】

(組織型決定(tissue typing))

本発明のENDOX配列はまた、わずかな生物学的サンプルから個体を識別するために使用され得る。この技術において、個体のゲノムDNAは、識別のために独特のバンドを生成するように1つ以上の制限酵素で消化され、そしてサザン

プロットにおいてプローブされる。本発明の配列は、RFLP（米国特許第5,272,057号に記載の「制限断片長多型」）のためのさらなるDNAマーカーとして有用である。

#### 【0341】

さらに、本発明の配列を用いて、個体のゲノムの選択された部分の実際の塩基ごとのDNA配列を決定する代替的技術を提供し得る。従って、本明細書中に記載のENDOX配列を用いて、配列の5'末端および3'末端から2つのPCRプライマーを調製し得る。次いで、これらのプライマーを使用して、個体のDNAを増幅し得、そしてその後これを配列決定し得る。

#### 【0342】

このように調製された個体由来の対応するDNA配列の集団は、各個体が対立遺伝子差異に起因するこのようなDNA配列の独特のセットを有するので、唯一の個体識別を提供し得る。本発明の配列は、個体由来および組織由来の配列のこのような識別を得るために使用され得る。本発明のENDOX配列は、ヒトゲノムの部分を独特に表す。対立遺伝子のバリエーションが、これらの配列のコード領域においてある程度生じ得、そして非コード領域においてより大きな程度に生じる。個々のヒト間での対立遺伝子のバリエーションは、各500塩基につき約1回の頻度で生じると推定される。対立遺伝子のバリエーションの多くは、制限断片長多型（RFLP）を含む単一ヌクレオチド多型（SNP）に起因する。

#### 【0343】

本明細書中で記載の配列の各々は、ある程度まで、標準物質（これに対して個体からのDNAが識別の目的で比較され得る）として使用され得る。より多くの数の多型が非コード領域で生じるので、個体を区別するために、それほど多くの配列が必要であるわけではない。その非コード配列は、おそらく10~1,000プライマーの集団を用いてポジティブな個体識別を不自由なく提供し得る。これらのプライマー各々が、100塩基の増幅された非コード配列を生じる。推定コード配列（例えば、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、34、46および48におけるコード配列）が使用される場合、ポジティブな個体識別に関するプライマーのより多くの適切な数は、500~2,000である

。

## 【0344】

(予測医療)

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、薬理ゲノミクス (pharmacogenomics) およびモニタリング臨床試験が、予後 (予測) の目的に使用され、これによって個体を予防的に処置する、予測医療の分野に関する。従って、本発明の1つの局面は、ENDOXタンパク質および/または核酸の発現、ならびにENDOXの活性を、生物学的サンプル (例えば、血液、血清、細胞、組織) の関連で決定し、これによって、異常なENDOXの発現または活性に関連した、疾患または障害に個体が罹患するかどうか、あるいはそのような障害を発症する危険が個体にあるかどうかを決定するための、診断アッセイに関する。この障害としては、代謝障害、糖尿病、肥満、感染疾患、食欲不振、癌関連悪液質、および種々の脂質代謝異常 (dyslipidemias)、肥満に関連する代謝障害、代謝症候群X、ならびに慢性疾患および種々の癌に関連する消耗病が挙げられる。本発明はまた、個体が、ENDOXのタンパク質、核酸の発現または活性と関連した障害を発症する危険があるかどうかを決定するための予後的 (または予測的) アッセイを提供する。例えば、ENDOXの遺伝子における変異が、生物学的サンプルにおいてアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後的または予測的な目的に使用され得、これによってENDOXのタンパク質、核酸の発現または活性によって特徴付けられるかまたはそれらに関連した障害の発病の前に個体を予防的に処置し得る。

## 【0345】

本発明の別の局面は、個体におけるENDOXのタンパク質、核酸の発現あるいは活性を決定するための方法を提供し、これによって、その個体についての適切な治療的または予防的薬剤 (本明細書において「薬理ゲノミクス」とよばれる) を選択する。薬理ゲノミクスは、個体の遺伝型 (例えば、特定の薬剤に対して応答する個体の能力を決定するために試験された個体の遺伝型) に基づいて個体の治療的または予防的処置のための薬剤 (例えば、薬物) の選択を可能にする。

## 【0346】

本発明のなお別の局面は、臨床試験におけるENDOXの発現または活性に対する薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響をモニタリングすることに関する。

【0347】

これらおよび他の薬剤は、以下の節でさらに詳細に記載される。

【0348】

（診断アッセイ）

生物学的サンプルにおけるENDOXの存在または非存在を検出するための例示的な方法は、試験被験体から生物学的サンプルを得る工程、およびその生物学的サンプルをENDOXのタンパク質またはENDOXタンパク質をコードする核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）を検出し得る化合物もしくは薬剤と接触させ、その結果、ENDOXの存在が、その生物学的サンプルにおいて検出されるようにする、工程を包含する。ENDOXのmRNAもしくはゲノムDNAを検出するための薬剤は、ENDOX mRNAもしくはゲノムDNAにハイブリダイズし得る、標識された核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、全長のENDOXの核酸（例えば、配列番号1、3、5、7、9、22、25、28、31、35、46および48の核酸）もしくはその部分（例えば、少なくとも、15、30、50、100、250もしくは500ヌクレオチド長であり、ストリンジェントな条件下でENDOXのmRNAまたはゲノムDNAと特異的にハイブリダイズするに十分である、オリゴヌクレオチド）であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは本明細書において記載されている。

【0349】

ENDOXのタンパク質を検出するための薬剤は、ENDOXのタンパク質に結合し得る抗体であり、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナルであり得るか、またはより好ましくはモノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体またはそのフラグメント（例えば、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>）が使用され得る。用語「標識（された）」とは、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をそのプローブもしくは抗体に結合させる（すなわち、物理的に連結する）ことによってそのプローブまたは抗体を直接標識する

こと、ならびに、直接標識された別の試薬との反応性によってそのプローブもしくは抗体を間接的に標識することを包含することが意図される。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を用いた一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るようにビオチンを用いたDNAプローブの末端標識が挙げられる。用語「生物学的サンプル」とは、被験体から単離された、組織、細胞および生物学的流体、ならびに被験体に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を用いて、ENDO XのmRNA、タンパク質またはゲノムDNAを、生物学的サンプル中で、インビトロおよびインビボで検出し得る。例えば、ENDO XのmRNAの検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。ENDO Xのタンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素免疫測定法(ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光が挙げられる。ENDO XのゲノムDNAを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、ENDO Xのタンパク質の検出のためのインビボ技術としては、標識された抗ENDO X抗体を被験体に導入することが挙げられる。例えば、その抗体は、放射性マーカを用いて標識され得、被験体における放射性マーカの存在および位置は、標準的な画像化技術によって検出され得る。

#### 【0350】

1つの実施形態において、この生物学的サンプルは、その試験被験体からのタンパク質分子を含む。あるいは、この生物学的サンプルは、その試験被験体からのmRNA分子またはその試験被験体からのゲノムDNA分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、被験体から従来的手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。

#### 【0351】

別の実施形態において、本発明の方法はさらに、コントロール被験体からコントロール生物学的サンプルを得る工程、そのコントロールサンプルを、ENDO Xのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAを検出し得る化合物もしくは薬剤と接触させ、その結果、ENDO Xのタンパク質、mRNAもしくはゲノムD

NAの存在がその生物学的サンプルにおいて検出される、工程、およびそのコントロールサンプルにおけるENDOXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在と、その試験サンプルにおけるENDOXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在とを比較する工程を包含する。

【0352】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるENDOXの存在を検出するためのキットを包含する。例えば、このキットは、以下を備え得る：生物学的サンプルにおいてENDOXのタンパク質またはmRNAを検出し得る、標識された化合物もしくは薬剤；そのサンプルにおいてENDOXの量を決定するための手段；およびそのサンプルにおいて、標準と、ENDOXの量とを比較するための手段。この化合物または薬剤は、適切な容器内に包装され得る。このキットは、さらに、ENDOXのタンパク質または核酸を検出するためにキットを用いるための指示書を備え得る。

【0353】

(予後アッセイ)

本明細書において記載された診断方法をさらに利用して、ENDOXの異常発現または異常活性に関連した疾患もしくは障害を有するかまたはその発症の危険にある被験体を同定し得る。例えば、本明細書に記載されるアッセイ（例えば、上述の診断アッセイまたは下記のアッセイ）を利用して、ENDOXのタンパク質、核酸の発現または活性に関連する障害を有するかまたはその発症の危険に有る被験体を同定し得る。あるいは、この予後アッセイを利用して、疾患または障害を有するかまたはその発症の危険に有る被験体を同定し得る。従って、本発明は、ENDOXの異常発現または異常活性に関連する疾患もしくは障害を同定するための方法を提供し、ここで、試験サンプルは、被験体から得られ、そしてENDOXのタンパク質または核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）が検出され、ここで、ENDOXのタンパク質または核酸の存在は、ENDOXの異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を有するかまたはその発症の危険にある被験体についての診断指標である。本明細書において使用される「試験サンプル」とは、目的の被験体から得られた生物学的サンプルをいう。例えば、試験

サンプルは、生物学的流体（例えば、血清）、細胞サンプル、または組織であり得る。

#### 【0354】

さらに、本明細書に記載される予後アッセイを使用して、被験体が薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補）が投与されてENDOXの異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を処置し得るか否かを決定し得る。例えば、そのような方法を用いて、被験体が障害について薬剤を用いて有効に処置され得るか否かを決定し得る。従って、本発明は、ENDOXの異常発現または異常活性に関連する障害についての薬剤を用いて被験体が有効に処置され得るか否かを決定するための方法を提供し、ここで、試験サンプルが得られ、そしてENDOXのタンパク質または核酸が検出される（例えば、ここで、ENDOXのタンパク質または核酸の存在は、ENDOXの異常発現または異常活性に関連する障害を処置するために薬剤を投与し得る被験体についての診断指標である）。

#### 【0355】

本発明の方法はまた、ENDOXの遺伝子における遺伝的損傷を検出し、それによって、その損傷遺伝子を有する被験体が異常な細胞増殖および/または分化によって特徴付けられる障害についての危険に有るか否かを決定するためにも使用され得る。種々の実施形態において、本発明の方法は、その被験体からの細胞のサンプルにおいて、ENDOXのタンパク質をコードする遺伝子の完全性に影響を与える変更の少なくとも1つあるいはENDOXの遺伝子の誤発現によって特徴付けられる、遺伝的損傷の存在または非存在を検出する工程を包含する。例えば、そのような遺伝的損傷は、以下の少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：(i) ENDOXの遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；(ii) ENDOXの遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；(iii) ENDOXの遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、(iv) ENDOXの遺伝子の染色体再配列；(v) ENDOXの遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルにおける変化、(vi) ENDOXの遺伝子の異常改変（例えば、ゲノムDNAのメチル化パターンの異常改変）、(vii) ENDOXの遺伝

子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、(v i i i) ENDOXのタンパク質の非野生型レベル、(i x) ENDOXの遺伝子の対立遺伝子の欠失、ならびに(x) ENDOXのタンパク質の不適切な翻訳後修飾。本明細書において記載されるように、当該分野において、多数の公知のアッセイ技術が存在し、これらは、ENDOXの遺伝子における損傷を検出するために使用され得る。好ましい生物学的サンプルは、従来手段によって被験体から単離された末梢血白血球サンプルである。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプルが使用され得、これには、例えば、頬粘膜細胞が挙げられる。

#### 【0356】

特定の実施形態において、損傷の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)におけるプローブ/プライマーの使用を包含する(例えば、米国特許第4,683,195号および同4,683,202号を参照のこと)(例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR)、あるいは、連結連鎖反応(LCR)(例えば、Landegranら(1988)Science 241:1077-1080;およびNakazawaら(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:360-364)を参照のこと。後者は、ENDOXの遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る)(Abravayaら(1995)Nucl.Acids Res 23:675-682を参照のこと)。この方法は、患者から細胞のサンプルを収集する工程、核酸(例えば、ゲノム、mRNAまたはその両方)をそのサンプルの細胞から単離する工程、ENDOXの遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと、その核酸サンプルとをENDOXの遺伝子(存在する場合)のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で、接触させる工程、ならびに増幅産物の存在もしくは非存在を検出する工程、またはその増幅産物の長さを検出する工程およびその大きさをコントロールサンプルと比較する工程を包含し得る。PCRおよび/またはLCRは、本明細書に記載される変異を検出するために使用される技術のいずれかとともに予備的増幅工程として使用されるために所望され得ることが認識される。

#### 【0357】

代替的な増幅方法としては、以下が挙げられる：自己維持配列複製 (Guatelliら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅系 (Kwoh、ら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Qレプリカーゼ (Lizardiら、1988、BioTechnology 6:1197)、または他の任意の核酸増幅方法、それに続く、当業者に周知な技術を用いたその増幅された分子の検出。これらの検出スキームは、そのような分子が非常に極少数で存在する場合、核酸分子の検出のために特に有用である。

#### 【0358】

代替の実施形態において、サンプル細胞からのENDOXの遺伝子における変異は、制限酵素切断パターンにおける変化によって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールのDNAが単離され、増幅され(必要に応じて)、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼを用いて消化され、そしてフラグメント長の大きさがゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルDNAとコントロールDNAとの間のフラグメント長の大きさにおける差違は、そのサンプルDNAにおける変異を示す。さらに、配列特異的なリボザイムの使用(例えば、米国特許第5,493,531号を参照のこと)を使用して、リボザイム切断部位の発生または喪失によって特定の変異の存在についてスコア付けし得る。

#### 【0359】

他の実施形態において、ENDOXにおける遺伝的変異は、サンプル核酸およびコントロール核酸(例えば、DNAまたはRNA)を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイに対してハイブリダイズさせることによって同定され得る(例えば、Croninら(1996) Human Mutation 7:244-255; Kozalら(1996) Nat. Med. 2:753-759を参照のこと)。例えば、ENDOXにおける遺伝的変異は、Croninら(前出)に記載のように光生成DNAプローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。手短には、第一のプローブのハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよびコントロールにおける長いストレッチのDNAを通して走査して、連続的に重複するプローブの直線アレイを作成するこ

とによってその配列の間の塩基変化を同定し得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程の後に、検出される全ての改変体または変異体に相補的な、より小さな特化されたプローブアレイを用いて、特定の変異の特徴付けを可能にする第二のハイブリダイゼーションアレイが続く。各変異アレイは、一方が野生型遺伝子に対して相補的であり、そして他方が変異遺伝子に対して相補である、並行プローブセットから構成される。

#### 【0360】

なお別の実施形態において、当該分野で公知の種々の配列決定反応のいずれかを使用して、ENDOX遺伝子を直接配列決定し得、そしてサンプルのENDOX配列と対応する野生型(コントロール)配列とを比較することによって、変異を検出し得る。配列決定反応の例としては、MaximおよびGilbert(1977)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:560またはSanger(1977)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463によって開発された技術に基づくものが挙げられる。診断アッセイを実施する場合、種々の自動化配列決定手順のいずれかを利用し得ることもまた意図される(例えば、Naeverら、(1995)BioTechniques 19:448を参照のこと)。これらには、質量分析法による配列決定法(例えば、PCT国際公開番号WO 94/16101;Cohenら(1996)Adv.Chromatography 36:127-162;およびGriffinら(1993)Appl.Biochem.Biotechnol. 38:147-159を参照のこと)が含まれる。

#### 【0361】

ENDOX遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、切断薬剤からの保護を使用して、RNA/RNAもしくはRNA/DNAのヘテロ二重鎖におけるミスマッチ塩基を検出する方法が挙げられる(例えば、Myersら(1985)Science 230:1242を参照のこと)。一般に、「ミスマッチ切断」の当該分野の技術は、野生型のENDOX配列を含む(標識された)RNAまたはDNAを、組織サンプルから得られた潜在的な変異体RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成されるヘテロ二重鎖を提供す

る工程によって始まる。この二本鎖の二重鎖を、二重鎖の一本鎖領域（例えば、そのコントロール鎖とサンプルの鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するもの）を切断する薬剤を用いて処理する。例えば、RNA/DNA二重鎖を、RNaseを用いて処理し得、そしてDNA/DNAハイブリッドを、そのミスマッチ領域を酵素的に消化するために、S1ヌクレアーゼを用いて処理し得る。他の実施形態において、DNA/DNAまたはRNA/DNAのいずれかの二重鎖を、ミスマッチ領域を消化するために、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウム、およびピペリジンを用いて処理し得る。次いで、そのミスマッチ領域の消化後、得られた材料を変性ポリアクリルアミドゲル上で、大きさで分離して、変異の部位を決定する。例えば、Cottonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397; Saleebaら(1992) Methods Enzymol 217:286-295を参照のこと。1つの実施形態において、コントロールのDNAまたはRNAは、検出のために標識され得る。

#### 【0362】

なお別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、二本鎖DNAにおけるミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質（いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素）を、細胞のサンプルから得られたENDOX cDNAにおける点変異を検出およびマッピングするために規定された系において使用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチでAを切断し、そしてHeLa細胞からのチミジンDNAグリコシダーゼは、G/TミスマッチでTを切断する(Hsuら(1994) Carcinogenesis 15:1657~1662)。例示的な実施形態に従って、ENDOXの配列（例えば、野生型ENDOXの配列）に基づくプローブは、試験細胞由来のcDNAまたは他のDNA産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、DNAミスマッチ修復酵素を用いて処理され、そしてその切断産物は、もしあれば、電気泳動プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第5,459,039号を参照のこと。

#### 【0363】

他の実施形態において、電気泳動の移動度における変化は、ENDOXの遺伝

子における変異を同定するために使用される。例えば、一本鎖配座多型 (SSCP) は、変異体と野生型核酸との間の電気泳動の移動度における差異を検出するために使用され得る (Oritaら (1989) Proc Natl Acad Sci USA: 86: 2766、Cotton (1993) Mutat Res 285: 125~144; Hayashi (1992) Genet Anal Tech Appl 9: 73~79を参照のこと)。サンプルおよびコントロール ENDOX の核酸の一本鎖 DNA フラグメントは、変性され、そして再生させる。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変化し、電気泳動の移動度において得られる変化は、1つの塩基変化さえも検出し得る。DNA フラグメントは、標識され得るか、または標識されたプローブを用いて検出され得る。アッセイの感度は、(DNA よりもむしろ) RNA を使用することによって増強され得、この二次構造は、配列中の変化に対してより感受的である。1つの実施形態において、本発明の方法は、ヘテロ二重鎖分析を利用して、電気泳動の移動度における変化に基づいて二本鎖のヘテロ二重鎖分子を分離する (Keenら (1991) Trends Genet 7: 5)。

#### 【0364】

なお別の実施形態において、一定勾配の変性剤を含有するポリアクリルアミドゲルにおける変異体または野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を使用してアッセイされる (Myersら (1985) Nature 313: 495)。DGGE が分析の方法として使用される場合、DNA を改変して、例えば、PCR により約 40 bp の高融点 GC リッチ DNA の GC クランプを付加することによって、完全には変性されないことを確実にする。さらなる実施形態において、温度勾配は、コントロールおよびサンプル DNA の移動度における差異を同定するために、変性剤勾配の代わりに使用される (Rosenbaum および Reissner (1987) Biophys Chem 265: 12753)。

#### 【0365】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: 選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅

、または選択的プライマー伸長。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーは、既知の変異が中心的に配置されるように調製され得、次いで、完全なマッチが見出される場合にのみハイブリダイゼーションを許容する条件下で標的DNAにハイブリダイズされる(Saikiら(1986)Nature 324:163; Saikiら(1989)Proc Natl Acad Sci USA 86:6230)。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズする膜に付着され、そして標識された標的DNAとハイブリダイズされる場合に、PCR増幅された標的DNAまたは多くの異なる変異にハイブリダイズされる。

#### 【0366】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と合わせて使用され得る。特異的増幅についてのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心において(その結果、増幅は、差次的ハイブリダイゼーションに依存する)(Gibbsら(1989)Nucl. Acids Res 17:2437~2448)かもしくは適切な条件下でミスマッチがポリメラーゼ伸長を妨害または減少し得る、1つのプライマーの極端な3'末端で、目的の変異を保有し得る(Prossner(1993)Tibtech 11:238)。さらに、変異の領域において新規な制限部位を導入することは、切断に基づく検出を行うために望ましくあり得る(Gaspariniら(1992)Mol Cell Probes 6:1)。特定の実施形態において、増幅はまた、増幅用のTaqリガーゼを使用して実施され得ることが予測される(Barany(1991)Proc Natl Acad Sci USA 88:189)。このような場合において、連結は、5'配列の3'末端に完全なマッチが存在する場合にのみ生じ、それを増幅の存在または非存在を探索することによって特定の部位で公知の変異の存在を検出することを可能にする。

#### 【0367】

本明細書中に記載される方法は、例えば、本明細書中に記載される少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含む、予めパッケージングされた診断キットを利用することによって実施され得、これは、例えば、ENDO Xの遺伝子を

含む疾患または疾病の症状または家族履歴を示す患者を診断するための臨床的設定において簡便に使用され得る。

【0368】

さらに、ENDOXが発現される任意の細胞型または組織（好ましくは、末梢白血球）は、本明細書中に記載される予後アッセイにおいて利用され得る。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプル（例えば、頬粘膜細胞を含む）が、使用され得る。

【0369】

（薬理ゲノム学（Pharmacogenomics））

ENDOXの活性（例えば、ENDOXの遺伝子発現）に対する刺激性または阻害性の影響を有する因子、または調節因子は、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定されるように、障害（この障害としては、代謝性障害、糖尿病、肥満症、感染性疾患、食欲不振、癌関連悪質液、および種々の脂肪代謝異常症（dyslipidemia）、肥満症に関連する代謝障害、代謝X症候群ならびに慢性疾患および種々の癌に関連する消耗障害が挙げられる）を処置（予防的または治療的に）するために個体に投与され得る。このような処置と合わせて、個体の薬理ゲノム学（すなわち、個体の遺伝子型と外来化合物または薬物に対するその個体の応答との間の関係についての研究）が、考慮され得る。治療剤の代謝における差異は、薬理的に活性な薬物の用量と血中濃度との間の関係を変更することによって、重篤な毒性または治療の失敗をもたらし得る。従って、個体の薬理ゲノム学は、個体の遺伝子型の考慮に基づく予防的または治療的処置のために有効な薬剤（例えば、薬物）の選択を許容する。このような薬理ゲノム学は、さらに、適切な投薬量および治療剤レジメンを決定するために使用され得る。従って、ENDOXのタンパク質の活性、ENDOXの核酸の発現、あるいは個体におけるENDOXの遺伝子の変異含量が決定されて、それによって個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。

【0370】

薬理ゲノム学は、罹患された人において変更された薬物の性質および異常な作用に起因する薬物への応答において臨床的に有意な遺伝性バリエーションを扱う

。例えば、Eichelbaum、Clin Exp Pharmacol P  
hystol, 1996, 23:983~985およびLinder、Clin  
Chem, 1997, 43:254~266を参照のこと。一般に、2つの型  
の薬理ゲノム学状態が、区別され得る。遺伝的状态は、薬物が身体に作用する方  
法を変更する1つの因子として伝達されたか(変更された薬物作用)、または遺  
伝的状态は、身体が薬物に作用する方法を変更する1つの因子として伝達された  
(変更された薬物代謝)。これらの薬理ゲノム学状態は、稀な欠損としてかまた  
は多型としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロ  
ゲナーゼ(G6PD)欠損は、一般的な遺伝性酵素病であり、この主な臨床的合  
併症は、酸化剤薬物(抗マラリア剤、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン)  
の摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

#### 【0371】

例示的な実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および期間  
の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素(例えば、N-アセチルトランス  
フェラーゼ2(NAT2)およびシトクロムP450酵素CYP2D6およびC  
YP2C19)の遺伝的多型の発見は、幾人かの患者が予期される薬物効果を得  
ないか、または薬物の標準的かつ安全な用量を摂取した後に過大な薬物応答およ  
び深刻な毒性を示さないことについての説明を提供した。これらの多型は、集団  
において2つの表現型(高い代謝能を持つ人(extensive metabol  
olizer)(EM)および低い代謝能を持つ人(poor metabol  
izer)(PM))で表現される。PMの罹患率は、異なる集団の間で異なる  
。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は高度に多型であり、そしていくら  
かの変異がPMにおいて同定されており、この全ては機能的CYP2D6の非存  
在に至る。CYP2D6およびCYP2C19の低い代謝能を持つ人は、彼らが  
標準的な用量を受けの場合に、かなり頻繁に過大な薬物応答および副作用を経験  
する。代謝産物が活性な治療的部分である場合、そのCYP2D6形成代謝産物  
であるモルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果について実証されるよう  
に、PMは治療的応答を示さない。他の極端なものは、標準的な用量に応答しな  
い、いわゆる超迅速な代謝能を持つ人である。最近、超迅速な代謝の基準となる

分子は、CYP2D6 遺伝子増幅に起因していることが同定されている。

#### 【0372】

従って、ENDOXのタンパク質の活性、ENDOXの核酸の発現、あるいは個体におけるENDOXの遺伝子の変異内容を決定されて、それによって、その個体の治療的および予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。さらに、薬理ゲノム学の研究を使用して、個体の薬物応答性の表現型の同定に対して薬物代謝酵素をコードする多型対立遺伝子の遺伝子型決定に適用し得る。この知見は、用量または薬物選択に適用される場合、有害な反応または治療の失敗を回避し得、従って、被験体をENDOXの調節因子（例えば、本明細書中に記載される例示的なスクリーニングアッセイの1つによって同定される調節因子）を用いて処置する場合に治療的または予防的効率を増強し得る。

#### 【0373】

（臨床試験の間の効果のモニタリング）

ENDOXの発現または活性（例えば、異常な細胞増殖および/または分化を調節する能力）に対する薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響をモニタリングすることは、基本的なスクリーニングにおいてのみならず、臨床試験においてもまた適用され得る。例えば、ENDOXの遺伝子発現、タンパク質レベルを増加するため、またはENDOXの活性をアップレギュレートするために、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定される薬剤の効力は、減少したENDOXの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートしたENDOXの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。あるいは、ENDOXの遺伝子発現、タンパク質レベルを減少、またはENDOXの活性をダウンレギュレートするためのスクリーニングアッセイによって決定される薬剤の効力は、増加したENDOXの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートしたENDOXの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。このような臨床試験において、ENDOXの発現または活性、および好ましくは、例えば細胞性増殖または免疫障害に関与している他の遺伝子が、「読み出し（read out）」マーカーまたは特定の細胞の免疫応答のマーカーとして使用され得る。

## 【0374】

例えば、限定の目的ではないが、ENDOXを含む遺伝子（これは、ENDOXの活性（例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイにおいて同定される）を調節する薬剤（例えば、化合物、薬物または低分子）を用いる処置によって細胞内で調節される）が、同定され得る。従って、細胞性増殖障害に対する薬剤の効果を研究するために、例えば、臨床試験において、細胞が単離され得、そしてRNAが調製され得、そしてENDOXおよびこの障害に関与する他の遺伝子の発現のレベルについて分析され得る。遺伝子発現のレベル（すなわち、遺伝子発現パターン）は、本明細書中に記載されるように、ノーザンブロット分析もしくはRT-PCRによるか、あるいは産生されるタンパク質の量を測定することによるか、本明細書中に記載されるような方法の1つによるか、あるいはENDOXまたは他の遺伝子の活性のレベルを測定することによって、定量され得る。この方法において、この遺伝子発現パターンは、この薬剤に対する細胞の生理学的応答の指標であるマーカーとして、作用し得る。従って、この応答状態は、この薬剤を用いる個体の処置の前に、そして処置の間の種々の時点で、決定され得る。

## 【0375】

1つの実施形態において、本発明は、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、低分子、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される他の薬物候補物）を用いて被験体の処置の効力をモニタリングするための方法を提供し、これは、以下の工程を包含する：(i) 薬剤の投与の前に、被験体から投与前サンプルを得る工程；(ii) この投与前サンプルにおいて、ENDOXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現のレベルを検出する工程；(iii) この被験体から1つ以上の投与後サンプルを得る工程；(iv) この投与後サンプルにおいて、ENDOXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを検出する工程；(v) この投与前サンプルにおけるENDOXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを、この投与後サンプルにおけるENDOXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNA

の発現または活性のレベルと比較する工程；ならびに(vi)これによって、この被験体に対する薬剤の投与を変更する工程。例えば、この薬剤の増加した投与は、検出されるよりも高いレベルにENDO Xの発現または活性を増加するために(すなわち、この薬剤の効力を増加するために)望ましくあり得る。あるいは、この薬剤の減少した投与は、検出されるよりも低いレベルにENDO Xの発現または活性を減少するために(すなわち、この薬剤の効力を減少するために)望ましくあり得る。

### 【0376】

#### (処置の方法)

本発明は、異常なENDO Xの発現または活性に関連する障害の危険性のある(すなわち疑いのある)か、またはこの障害を有する被験体を処置する予防的および治療的方法の両方を提供する。この障害としては、代謝性障害、糖尿病、肥満症、感染性疾患、食欲不振、癌関連悪質液、および種々の脂肪代謝異常症(dyslipidemia)、肥満症に関連する代謝障害、代謝X症候群ならびに慢性疾患および種々の癌に関連する消耗障害が挙げられる。これらの処置の方法を、以下でさらに完全に議論する。

### 【0377】

#### (疾患および障害)

(その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して)増加したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性をアンタゴナイズする(すなわち、低減または阻害する)治療剤を用いて処置され得る。活性をアンタゴナイズする治療剤は、治療的または予防的様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：(i)上述のペプチド、あるいはそのアナログ、誘導体、フラグメントまたはホモログ；(ii)上述のペプチドに対する抗体；(iii)上述のペプチドをコードする核酸；(iv)アンチセンス核酸および「機能不全性」である(すなわち、上述のペプチドのコード配列内の異種挿入物に起因する)核酸の投与が、相同組換えによって上述のペプチドの内因性機能を「ロックアウトする」ために利用される(例えば、Capecchi、1989、Science 244:128

8 ~ 1292を参照のこと) ; または ( v ) 上述のペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を変化させる、調節因子 ( すなわち、インヒビター、アゴニストおよびアンタゴニスト ( 本発明のさらなるペプチド模倣物または本発明のペプチドに対して特異的な抗体を含む ) ) 。

#### 【0378】

( その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して ) 減少したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を増加させる ( すなわち、活性に対するアゴニストである ) 治療剤を用いて処置され得る。活性をアップレギュレートする治療剤は、治療的または予防的様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない : 上述のペプチド、あるいはそのアナログ、誘導体、フラグメントまたはホモログ ; あるいはバイオアベイラビリティを増加させるアゴニスト。

#### 【0379】

増加したレベルまたは減少したレベルは、ペプチドおよび / または RNA を定量することによって、容易に検出され得る。この定量は、患者の組織サンプルを ( 例えば、生検組織から ) 入手し、そしてそのサンプルを、その発現したペプチドの RNA レベルまたはペプチドレベル、構造および / または活性 ( あるいは上述のペプチドの mRNA ) についてインビボでアッセイすることによる。当該分野において周知の方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない : イムノアッセイ ( 例えば、ウェスタンブロット分析、ドデシル硫酸ナトリウム ( SDS ) ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の免疫沈降、免疫細胞学などによる ) および / または mRNA の発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ ( 例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど ) 。

#### 【0380】

( 予防的方法 )

1 つの局面において、本発明は、被験体において、異常な ENDOX の発現または活性と関連する疾患または状態を、以下を調節する薬剤を被験体に投与することによって予防するための方法を提供する : ENDOX の発現、あるいは少な

くとも1つのENDOXの活性。異常なENDOXの発現または活性によって引き起こされるかまたはこれらに起因する、疾患にかかる危険がある被験体は、例えば、本明細書中に記載の診断アッセイまたは予後アッセイのいずれか、あるいはそれらの組み合わせによって、同定され得る。予防薬剤の投与は、疾患または障害が予防されるか、あるいはその進行を遅らせられるように、このENDOXの異常に特徴的な症状の発現の前に生じ得る。このENDOXの異常の型に依存して、例えば、ENDOXのアゴニスト薬剤、あるいはENDOXのアンタゴニスト薬剤が、その被験体を処置するために使用され得る。その適切な薬剤は、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイに基づいて、決定され得る。本発明の予防方法は、以下の小区分において、さらに議論される。

#### 【0381】

##### (治療方法)

本発明の別の局面は、治療目的のために、ENDOXの、発現または活性を調節する方法に関する。本発明の調節方法は、細胞を、その細胞に関する、ENDOXのタンパク質活性の活性のうちの1つ以上を調節する薬剤と接触させる工程を包含する。ENDOXのタンパク質活性を調節する薬剤は、本明細書中に記載されるような薬剤であり得る。そのような薬剤は、例えば、ENDOXタンパク質の、核酸、タンパク質、これらのタンパク質の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、ENDOXのペプチド模倣物、あるいは他の低分子である。1つの実施形態において、この薬剤は、ENDOXのタンパク質活性のうちの1つ以上を刺激する。このような刺激薬剤の例としては、以下が挙げられる：その細胞に導入された、活性なENDOXのタンパク質、およびENDOXをコードする核酸分子。別の実施形態において、この薬剤は、ENDOXのタンパク質活性のうちの1つ以上を阻害する。このような阻害薬剤の例としては、ENDOXのアンチセンス核酸分子、および抗ENDOX抗体が挙げられる。これらの調節方法は、インビトロで（例えば、その薬剤とともにその細胞を培養することによって）、あるいはインビボで（例えば、被験体にその薬剤を投与することによって）、実施され得る。このように、本発明は、ENDOXの、タンパク質または核酸分子の、異常な発現または異常な活性によって特徴付けられる、疾患または障害に罹

患した個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、ENDOXの、発現または活性を調節する（例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする）、薬剤（例えば、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイによって同定される薬剤）あるいはそのような薬剤の組み合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、ENDOXの、タンパク質または核酸分子を、ENDOXの、低減したかまたは異常な、発現または活性を補償するための治療として、投与する工程を包含する。

#### 【0382】

ENDOXの活性の刺激は、ENDOXが異常にダウンレギュレートされている状況、および/あるいはENDOXの活性の増加が有益な効果を有するようである状況において、望ましい。このような状況の1つの例は、被験体が、異常な細胞増殖および/または細胞分化によって特徴付けられる障害（例えば、癌または免疫関連障害）を有する場合である。このような状況の別の例は、被験体が妊娠疾患（例えば、子癩前症）を有する場合である。

#### 【0383】

（治療剤の生物学的効果の決定）

本発明の種々の実施形態において、適切なインビトロまたはインビボアッセイを実施して、特定の治療剤の効果およびその投与が罹患組織の処置を示すか否かを決定する。

#### 【0384】

種々の特定の実施形態において、インビトロアッセイが患者の障害に關与する代表的な細胞型で行われ、所定の治療剤がこの細胞型に対して所望の効果を発揮したか否かを決定し得る。治療において使用する化合物は、ヒト被験体において試験する前に適切な動物モデル系において試験され得る。これらの動物モデル系としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなど。同様に、インビボ試験については、当該分野で公知の任意の動物モデル系が、ヒト被験体に対する投与の前に使用され得る。

#### 【0385】

（本発明の組成物の予防的用途および治療的用途）

本発明のENDO X核酸およびタンパク質は、以下が挙げられるがこれらに限られない種々の障害に関連する潜在的な予防的適用および治療適用において、有用である：代謝性障害、糖尿病、肥満症、感染性疾患、食欲不振、癌関連悪質液、および種々の脂肪代謝異常症(dyslipidemia)、肥満症に関連する代謝障害、代謝X症候群ならびに慢性疾患および種々の癌に関連する消耗障害。

#### 【0386】

一例として、本発明のENDO Xタンパク質をコードするcDNAは、遺伝子治療において有用であり得、そしてこのタンパク質は、それを必要とする被験体に投与される場合に、有用であり得る。非限定的な例として、本発明の組成物は、以下を罹患する患者の処置のために効力を有する：代謝障害、糖尿病、肥満症、感染性疾患、食欲不振、癌関連悪質液、および種々の脂肪代謝異常症。

#### 【0387】

ENDO Xタンパク質をコードする新規核酸および本発明のENDO Xタンパク質の両方、またはこれらのフラグメントはまた、これらの核酸またはタンパク質の存在または量が評価される診断適用において、有用であり得る。さらなる用途は、抗菌分子としてであり得る(すなわち、いくらかのペプチドは、抗菌特性を有することが見出された)。これらの材料は、さらに、治療方法または診断方法において使用するための、本発明の新規物質に免疫特異的に結合する抗体の生成において、有用である。

#### 【0388】

(実施例)

以下の実施例は、本発明の種々の局面の非限定的な例のつもりで例示する。

#### 【0389】

ヒトアシルCoA結合タンパク質(ACBP)/ジアゼパム結合インヒビター(DBI)をコードする遺伝子に関連する新規なヒト遺伝子のファミリーは、発現される配列およびゲノムDNA配列の分析によって同定された。実施例6を参照のこと。ヒトファミリーは、7つの新規なENDO遺伝子および3つの公知のENDO遺伝子からなり、これらはすべて、20アミノ酸の高度に保存性のドメ

インを含む。ACBP/DBIは、生物のエネルギー代謝に影響する生物学的に活性な18アミノ酸ペプチド(ODN)を産生するためにプロセスされる。他のファミリーのメンバーの生物学的なプロセッシングが、他の代謝調節ペプチドを導くことが予期される。

#### 【0390】

それぞれのヒトファミリーメンバーの保存性ドメインから誘導される合成ペプチドは、代謝の研究において、そしてウサギにおけるポリクローナル抗体を作製するために使用された。ヒトおよびラットのファミリーのメンバーのそれぞれの保存性ドメインからの合成ペプチドを、種々のマウス系統に注射した。注射されたペプチドは、脂肪保存、筋質量、インシュリン分泌、グルコース利用および血清脂質レベル(トリグリセリドおよびコレステロール)を生じる生物エネルギー代謝における独特の変化を誘発する。実施例1を参照のこと。

#### 【0391】

コンセンサス配列は、特定の代謝効果を有する全長タンパク質および個々のペプチドから誘導され得る。実施例2および3を参照のこと。これらのヒトペプチド、非ヒト種由来のペプチド、コンセンサス配列に基づく合理的な変化またはコンビナトリアル変化によって誘導される変異ペプチド、全長タンパク質と相互作用する抗体および小分子、ペプチド、プロセッシング酵素ならびに/あるいはレセプターは、代謝障害の処置において重要な治療的価値を有し得る。実施例1および4を参照のこと。これらの障害には、食欲不振、癌関連悪液質、肥満、I型およびII型糖尿病および種々の異脂肪血症が挙げられる。本発明はまた、種々の癌の型についてのマーカーとして有用である。実施例5を参照のこと。

#### 【0392】

(実施例1 AKRマウスにおけるペプチド誘発代謝効果)

AKR(肥満および糖尿病傾向)マウスおよびC57B1/6(コントロール)マウスにおける代謝パラメーターに対する、ヒトおよびラットのエンドゼピン(endozepine)から誘導された代謝調節ペプチド(MRP)の毎日のip用量(14日間)の効果を決定するために研究を行った。この実施例は、AKRマウスに対するこのペプチドの効果を要約する。血清コレステロール、トリ

グリセリド、インシュリンおよびグルコースは、体重、体重変化、肝臓の相対的な器官の重さ生殖尾腹脂肪パッド、膵臓および腸間膜組織の重さ、四頭筋の重さ、食物および水の摂取とともにモニターされた。組織病理学的分析を、選択された組織サンプルにおいて行った。

### 【0393】

ペプチドをAKRマウスとC57B1/6マウスの両方に注射した。AKRマウスは、コントロールC57B1/6マウスより重く、そしてより高い血清グルコースレベル（特に操作にตอบสนองして）を有する。このように、AKRマウスは、ヒト集団において一般的な肥満およびII型糖尿病の形態についての多遺伝子性のモデルとして役立つ。表29は、AKRマウスにおける各MRPによって誘発される代謝効果を要約する。MRPおよびODNにおいて見出されるアミノ酸から無作為化された配列を有するペプチドは、1% DMSO中で示された用量で、腹腔内注射によって与えられた。コントロール動物は、操作されないか、1% DMSOを注射されるか、またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）を注射された。表29のデータは、示される場合、雄性および雌性について別々に記録し、そうでなければ、両方の性について組み合わせられる。血清グルコースに対するベースライン（注射前）からの変化を、mg/dlで報告する。インシュリンは、ミクロU/mlであり、腸間膜（雄性および雌性）脂肪、子宮脂肪（雌性）および四頭筋の「相対」測定は、体重のパーセントとして記録される。他の発見は、雄性および雌性の両方について一致した発見を表す。統計的に有意な発見（ $p < 0.05$ ）は、増加について赤（または暗いグレー）（MRP 1<sub>18</sub>、MRP 2<sub>20</sub>、MRP 3<sub>18</sub>、MRP 4<sub>18</sub>、MRP 5<sub>20</sub>、MRP 7<sub>20</sub>、およびMRP 10<sub>20</sub>）についてグルコース増加；ならびにMRP 1<sub>20</sub>、およびMRP 10<sub>20</sub>について相対的筋肉の増加）、ならびに減少について青緑（または明るいグレー）（MRP 1<sub>20</sub>、MRP 4<sub>20</sub>、およびMRP 6<sub>20</sub>）についてグルコース減少；MRP 1<sub>20</sub>、MRP 1<sub>18</sub>、MRP 2<sub>20</sub>、MRP 3<sub>18</sub>、MRP 4<sub>18</sub>、MRP 8<sub>20</sub>、MRP 10<sub>20</sub>およびMRP 1<sub>18</sub>（ラット）について最終インシュリンの減少；MRP 1<sub>20</sub>、MRP 5<sub>20</sub>、MRP 10<sub>20</sub>およびMRP 1<sub>18</sub>（ラット）について相対的脂肪割合の減少；ならびにMRP 2<sub>20</sub>、およびMRP 7<sub>20</sub>について相対的筋肉の減少）を影をつけ

た。

#### 【0394】

別の試験グループを、試験された各ペプチド、ビヒクルコントロールおよび非操作グループについて確立した。各試験グループは、5匹の雄性および5匹の雌性AKRマウス（ペプチドに付き10匹）からなる。マウスを移動した後に2日間慣らせた。マウスの体重を量り、グループに分けた。ケージあたりの食物の重さおよび水の容積を測定し記録した。

#### 【0395】

マウスをさらに5日間慣らせた。注射前日（-2）に、グルコース測定は、グルコメーター（glucometer）（Johnson & Johnson; One touch Sure Step）を使用して行った。血液サンプルは、最初に、尾部静脈からの血液の液滴を得るおよそ5分前に、加熱ランプ下でマウスを加熱することによって得た。種々のペプチドの投薬は、日（0）において始めた。ペプチドを、表29に記す以外は、同一に調製し、同じ濃度（1% DMSOとともにPBS中0.05mg/ml、10ml/kgの投薬容量）で投薬した。ストックのペプチド溶液を、必要であれば、1~2分間超音波処理しながら、DMSO 0.5ml中の2.5mgのペプチドを溶解し、続いて各バイアルに滅菌PBS 0.5mlを添加することによって調製した。投薬溶液は、毎週、24.5mlの滅菌PBSへの0.5mlのペプチドストック溶液の添加によって調製した。全ての投薬溶液を、全研究を通して冷蔵し続けた。

#### 【0396】

マウスの体重を量り、そして14日の連続的な日の間、種々のペプチドまたはビヒクルの毎日のip注射を与えた。それぞれの7日の食物の重さおよび水の容積を測定し、そしてケージにつき記録した。血液グルコース測定（グルコメーターによる）もまた行い、各7日に記録した。血液グルコース測定を、8:00および10:00amに行い、動物に、9:00および11:00amに毎日投薬した。

#### 【0397】

14日に、剖検および血液回収の1時間前に、マウスに、最終用量の種々のペ

ブチドまたはビヒクルを注射した。血液（ヘパリン処理した血漿）を、心臓または眼窩の穿刺によって得た。血漿化合物、グルコースおよびインシュリンならびに最終のグルコメーターの読みを、グルコメーターの読みを較正／確認するのに同じ時間で行った。動物を解剖し、そして組織学的なサンプル調製のためのホルマリン中に配置した。腸間膜脂肪および膵臓、肝臓、四頭筋および尾腹脂肪パッドを除去し、そして各動物について重さを測定した。この研究は、ENDOXペブチドが種々の代謝機能を調節するためにそして代謝障害を処置するために使用され得ることを示す。

【0398】

【表49】

表 29

| ペプチド<br>名称                  | 用量<br>(mg/kg)<br>(ビヒクル) | Δ ウェイト<br>(M/F)            | 最終体重<br>(M/F)          | 相対脂肪<br>(膵臓/腎臓)        | 相対<br>筋肉<br>(M/F)      | 他の発見                          |
|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------|
| MRP1 <sub>10</sub>          | 0.5<br>DMSO             | -2.0 (-1.3%)               | 1.78±0.23<br>1.70±0.22 | 2.02±0.16<br>1.82±0.15 | 0.68±0.04<br>0.65±0.02 |                               |
| MRP1 <sub>10</sub><br>(ODN) | 0.5<br>DMSO             | +2.4 (+1.8%)               | 1.71±0.21<br>1.70±0.21 | 1.76±0.08<br>1.44±0.21 | 0.72±0.02<br>0.65±0.02 | コレステロール<br>トリグリセリド            |
| MRP2 <sub>10</sub>          | 0.5<br>DMSO             | +2.4 (+1.8%)               | 1.70±0.30<br>1.70±0.30 | 1.72±0.15<br>1.24±0.25 | 0.67±0.02<br>0.67±0.02 | コレステロール<br>トリグリセリド<br>ICPK 膵臓 |
| MRP3 <sub>10</sub>          | 0.5<br>PBS              | -3.6 (-3%)<br>+32.6 (+26%) | 3.70±0.32<br>4.28±0.98 | 1.95±0.10<br>1.74±0.27 | 0.73±0.03<br>0.63±0.02 | 膵臓                            |
| MRP3 <sub>10</sub>          | 0.5<br>DMSO             |                            | NR<br>1.57±0.49        | 2.01±0.04<br>1.53±0.22 | 0.66±0.03<br>0.63±0.02 |                               |
| MRP4 <sub>10</sub>          | 0.1<br>DMSO             |                            | 3.33±0.33<br>2.40±0.17 | 2.00±0.16<br>1.56±0.22 | 0.76±0.04<br>0.61±0.05 |                               |
| MRP4 <sub>10</sub>          | 0.5<br>DMSO             |                            | 3.33±0.33<br>2.40±0.17 | 1.73±0.09<br>1.16±0.16 | 0.68±0.04<br>0.63±0.02 | コレステロール<br>膵臓 ICPK            |
| MRP5 <sub>10</sub>          | 0.5<br>DMSO             |                            | 2.46±0.32<br>2.40±0.43 | 1.63±0.10<br>1.20±0.16 | 0.77±0.07<br>0.64±0.03 |                               |
| MRP6 <sub>10</sub>          | 0.5<br>DMSO             |                            | 2.95±0.35<br>2.70±0.80 | 2.04±0.12<br>1.42±0.18 | 0.79±0.07<br>0.74±0.05 |                               |
| MRP7 <sub>10</sub>          | 0.5<br>DMSO             |                            | 2.35±0.44<br>1.88±0.51 | 1.70±0.08<br>1.47±0.36 | 0.67±0.02<br>0.67±0.02 | コレステロール<br>トリグリセリド<br>ICPK 膵臓 |
| MRP8 <sub>10</sub>          | 0.5<br>DMSO             | +30.6 (+26%)               | 1.70±0.36<br>1.64±0.37 | 1.66±0.25<br>1.99±0.45 | 0.74±0.06<br>0.62±0.02 | コレステロール<br>トリグリセリド            |
| MRP9 <sub>10</sub>          | 0.5<br>DMSO             | +28.6 (+22%)               | 4.08±1.72<br>2.60±0.44 | 1.74±0.09<br>1.24±0.14 | 0.70±0.03<br>0.67±0.04 | コレステロール                       |
| MRP10 <sub>2</sub>          | 0.5<br>DMSO             | +21.4 (+16%)               | 1.77±0.33<br>1.70±0.33 | 1.12±0.10<br>1.03±0.10 | 0.80±0.04<br>0.70±0.02 | ICPK                          |
| MRP1 <sub>10</sub><br>(Rat) | 0.5<br>DMSO             | +7.8 (+6%)<br>+17.2        | 1.69±0.37<br>1.69±0.37 | 1.70±0.08<br>1.65±0.08 | 0.79±0.06<br>0.71±0.04 |                               |
| Rando                       | 0.5<br>DMSO             | +49.4 (+40%)               | 1.42±0.52<br>0.62±0.12 | 1.70±0.08<br>1.70±0.09 | 0.68±0.03<br>0.67±0.03 |                               |
| Vehic                       | PBS                     | +8.8 (+6%)<br>+25.1        | 3.92±0.35<br>3.58±0.22 | 1.89±0.15<br>2.50±0.32 | 0.70±0.04<br>0.78±0.05 |                               |
| Vehic                       | DMSO                    | +40.2 (+30%)               | 2.72±0.62<br>0.74±0.20 | 1.77±0.08<br>1.31±0.15 | 0.73±0.03<br>0.63±0.04 |                               |

## (実施例2 Clustal W整列)

表30は、10全てのヒトエンドゼピンのClustal W整列を示す。このファミリーは、2つのクラスのポリペプチド(約90アミノ酸の7短いポリペプチドおよび3長いポリペプチドであり、それらのN末端において他のファミリーのメンバーと相同性の領域を含む)からなる。これらのC末端におけるより長

い形態間の相同性はない。この整列および系統発生距離は、このファミリーが、遺伝子重複、融合および独立した進化によって進化し得たことを示唆する。

【0399】

【表50】

表 30

参照配列:

|                    |     |   |     |
|--------------------|-----|---|-----|
| Endo1_MRP-6        | 1   | .....TASITPC                            | 22  |
| Endo8_MRP-1_ACBP_  | 1   | .....MWQDLWLLPPASANPG                   | 35  |
| Endo7_MRP-9        | 1   | .....MSQAFKAKK                          | 17  |
| Endo3_MRP-3        | 1   | .....MAKPISTKNTKISRHWHA                 | 53  |
| Endo4_MRP-4        | 1   | .....MLLLFVCLFFIK                       | 27  |
| Endo2_MRP-5        | 1   | .....MSQCAFQNYTE                        | 19  |
| Endo5_MRP-7        | 1   | .....MAIQE                              | 19  |
| Endo9_MRP-2_PECI_  | 1   | .....MRASQKDFENSMNC                     | 20  |
| Endo10_MRP-10_ELP_ | 1   | MASBFLPAGAITGDSGGELSSGDDSGEVEFPHSPEIEET | 58  |
| Endo6_MRP-8        | 1   | .....MFQFHAGSWE                         | 59  |
| Endo1_MRP-6        | 23  | ..PVBEQ                                 | 77  |
| Endo8_MRP-1_ACBP_  | 38  | ..KPSDE                                 | 90  |
| Endo7_MRP-9        | 18  | ..KPADG                                 | 72  |
| Endo3_MRP-3        | 54  | ..KPADG                                 | 110 |
| Endo4_MRP-4        | 28  | ..KPADG                                 | 82  |
| Endo2_MRP-5        | 20  | ..KPADG                                 | 74  |
| Endo5_MRP-7        | 20  | ..KPADG                                 | 75  |
| Endo9_MRP-2_PECI_  | 21  | ..DPQNS                                 | 75  |
| Endo10_MRP-10_ELP_ | 59  | ..VASRE                                 | 113 |
| Endo6_MRP-8        | 60  | SFCSTNE                                 | 116 |
| Endo1_MRP-6        | 79  | AAKVEELTK                               | 89  |
| Endo8_MRP-1_ACBP_  | 91  | YAKVEELKK                               | 104 |
| Endo7_MRP-9        | 73  | DINKVEERNK                              | 86  |
| Endo3_MRP-3        | 111 | AAKVEELKK                               | 138 |
| Endo4_MRP-4        | 93  | AAKVEELTK                               | 96  |
| Endo2_MRP-5        | 75  | AAKVEELTK                               | 88  |
| Endo5_MRP-7        | 76  | AAKVEELTK                               | 86  |
| Endo9_MRP-2_PECI_  | 76  | VDLSSLS                                 | 135 |
| Endo10_MRP-10_ELP_ | 114 | AVAKKDP                                 | 189 |
| Endo6_MRP-8        | 117 | VEEKK                                   | 176 |

表 31 の続き

|                    |     |   |     |
|--------------------|-----|---|-----|
| Endo1_MRP-6        | *** | .....   | *** |
| Endo8_MRP-1_ACBP_  | *** | .....   | *** |
| Endo7_MRP-9        | *** | .....   | *** |
| Endo3_MRP-3        | *** | .....   | *** |
| Endo4_MRP-4        | *** | .....   | *** |
| Endo2_MRP-5        | *** | .....   | *** |
| Endo5_MRP-7        | *** | .....   | *** |
| Endo9_MRP-2_PECI_  | 136 | EIMRALKAAASKDSSITVLTONGDYSSQNDLTNFTDIPPGOVEEKAKNNVLLREFVGC    | 195 |
| Endo10_MRP-10_ELP_ | 170 | NIDHITKAIKSKNVDVNVKDEEGRALLHWACDRGHKELVTVLLQHRADINCQDNEGQTAL  | 229 |
| Endo6_MRP-8        | 177 | VLTSFPNAKTVNGKAESSDSQAESEEEEAGEEVKGAEHSDNDKMMKKSADHKNLEIVT    | 236 |
| Endo1_MRP-6        | *** | .....   | *** |
| Endo8_MRP-1_ACBP_  | *** | .....   | *** |
| Endo7_MRP-9        | *** | .....   | *** |
| Endo3_MRP-3        | *** | .....   | *** |
| Endo4_MRP-4        | *** | .....   | *** |
| Endo2_MRP-5        | *** | .....   | *** |
| Endo5_MRP-7        | *** | .....   | *** |
| Endo9_MRP-2_PECI_  | 196 | FIDFPKPLIAYVNOPAVQISVTLLGLFDAYYASDRATFHTPFSLGQSPGECSSYTFPKI   | 255 |
| Endo10_MRP-10_ELP_ | 230 | HYABACEFLDIYELLQSGADPTLRDQDQGLPEEVTQCKTVBLVLQRHTTOKA-----     | 292 |
| Endo6_MRP-8        | 237 | NOYDKDGFYQDIQNDIHASSSLNORSTEEVKPIDENLQGTOKSAVCIHQQINDDHVEDVT  | 296 |
| Endo1_MRP-6        | *** | .....   | *** |
| Endo8_MRP-1_ACBP_  | *** | .....   | *** |
| Endo7_MRP-9        | *** | .....   | *** |
| Endo3_MRP-3        | *** | .....   | *** |
| Endo4_MRP-4        | *** | .....   | *** |
| Endo2_MRP-5        | *** | .....   | *** |
| Endo5_MRP-7        | *** | .....   | *** |
| Endo9_MRP-2_PECI_  | 256 | MSPAKATEMLIFGKLTAGEACAGQLVTEVFPDSTFQKEVWTRLKAFAKLPPNALRISKE   | 315 |
| Endo10_MRP-10_ELP_ | *** | .....   | *** |
| Endo6_MRP-8        | 297 | GIQHLTSDSDSE-VYCDSEMQFGQEEESLDSFTSNNQPFQYYLGGHSSQPMENSQFREDIQ | 355 |
| Endo1_MRP-6        | *** | .....   | *** |
| Endo8_MRP-1_ACBP_  | *** | .....   | *** |
| Endo7_MRP-9        | *** | .....   | *** |
| Endo3_MRP-3        | *** | .....   | *** |
| Endo4_MRP-4        | *** | .....   | *** |
| Endo2_MRP-5        | *** | .....   | *** |
| Endo5_MRP-7        | *** | .....   | *** |
| Endo9_MRP-2_PECI_  | 318 | VIRKREKELHAVNAEECNVLQGRWLBDLECTNAVYVNFLSRKSKL-                | 359 |
| Endo10_MRP-10_ELP_ | *** | .....   | *** |
| Endo6_MRP-8        | 358 | VPPGNQNIQNMQVVAVEQKGEVKHGGEDGRNNSGAPHREKRGGETDFSNVRRGRGHRMO   | 415 |
| Endo1_MRP-6        | *** | .....   | *** |
| Endo8_MRP-1_ACBP_  | *** | .....   | *** |
| Endo7_MRP-9        | *** | .....   | *** |
| Endo3_MRP-3        | *** | .....   | *** |
| Endo4_MRP-4        | *** | .....   | *** |
| Endo2_MRP-5        | *** | .....   | *** |
| Endo5_MRP-7        | *** | .....   | *** |
| Endo9_MRP-2_PECI_  | *** | .....   | *** |
| Endo10_MRP-10_ELP_ | *** | .....   | *** |
| Endo6_MRP-8        | 416 | HLSEGTKGRQVGBGGDGERWGSDRGSRGSLNEQIALVLMRLQEDMQNVLQRLQKLETFTA  | 475 |
| Endo1_MRP-6        | *** | .....   | *** |
| Endo8_MRP-1_ACBP_  | *** | .....   | *** |
| Endo7_MRP-9        | *** | .....   | *** |
| Endo3_MRP-3        | *** | .....   | *** |
| Endo4_MRP-4        | *** | .....   | *** |
| Endo2_MRP-5        | *** | .....   | *** |
| Endo5_MRP-7        | *** | .....   | *** |
| Endo9_MRP-2_PECI_  | *** | .....   | *** |
| Endo10_MRP-10_ELP_ | *** | .....   | *** |
| Endo6_MRP-8        | 476 | AKSSTSTLQTAPQPTSSQRP6WWPFEMSPGVLTFAIIWPFIAQWLVLVYLYYQRRRR     | 530 |

(実施例3 代謝のコンセンサス配列 - 調節ペプチド)

MRPのすべておよびいくつかのサブセットのペプチド(AKRマウスにおいて類似の代謝効果を有する)は、表29に同定される。これらは、表31に同定

されるコンセンサス配列を同定するために整列され得る。一般のおよび好ましいコンセンサス配列は、検査により推論される。20アミノ酸モチーフにおけるそれぞれの位置での大部分の保存性のアミノ酸は、太字で印刷される。そのアミノ酸が特定の代謝サブセットにおいて不変である場合、下線も引かれる。特定の位置におけるアミノ酸が非常に可変である場合、「X」によって表される。少数のアミノ酸が特定の位置において見出される場合、これらは、[括弧]内に含まれる。「一般的な」コンセンサス配列は、類似の代謝効果を有し得るペプチド配列において大部分の可変性について可能である。「好ましい」コンセンサス配列は、検査されたペプチドサブセットにおいて見出されるアミノ酸に限定される。特定のサブセットのペプチドは、コレステロール低下の性質、脂肪質量減少、インシュリン低下、グルコース低下、グルコース上昇および筋肉質量構築の性質と関連して同定された。

【0400】

【表51】

表 31

代謝系71170のコンセンサ配列

1-調節ペプチド

グローバル配列:

|              |   |                      |    |
|--------------|---|----------------------|----|
| Endo8-MRP1   | 1 | QATVGDINTERPGMLDFTGR | 20 |
| Endo3-MRP3   | 1 | RATVGNIKTERPGMDFKGR  | 20 |
| Endo2-MRP5   | 1 | QAVIGNINEECSEMLDKGR  | 20 |
| Endo5-MRP7   | 1 | QAIIGDINIEYLQMLDFKGR | 20 |
| Endo4-MRP4   | 1 | QAIIGDINACPGMLDKGR   | 20 |
| Endo7-MRP9   | 1 | QATVHDLTEWFRMLDKGR   | 20 |
| Endo10-MRP10 | 1 | QVKVGNCTPQPSFFDFEGR  | 20 |
| Endo9-MRP2   | 1 | QATEGPCNIPKPGVFDLIR  | 20 |
| Endo6-MRP8   | 1 | QATEGPCKESTRPGFWDFIR | 20 |
| Endo1-MRP6   | 1 | QATGDCDIPGPPASLDFGR  | 20 |

グローバルコンセンサ配列:

QAT[V/I/E]G[D/N/P][L/L/C][N/K][L/L/M/T][E/S/P][K/R]PGMLD[L/F]KG[K/R] (西列番号 37)

20270-11 - 他下ペプチド:

|            |   |                      |    |
|------------|---|----------------------|----|
| Endo5-MRP7 | 1 | QAIIGDINIEYLQMLDFKGR | 20 |
| Endo7-MRP9 | 1 | QATVHDLTEWFRMLDKGR   | 20 |
| Endo9-MRP2 | 1 | QATEGPCNIPKPGVFDLIR  | 20 |
| Endo6-MRP8 | 1 | QATEGPCKESTRPGFWDFIR | 20 |

20270-11 - 他下コンセンサ配列:

General QAT[E/V/I]G[D/P][C/L][N/K]X[E/X]XP[G/R][M/X][L/X]D[L/X]XG[K/R] (西列番号 38)  
Preferred QATEG[DP]C[KRN][AITVFLM]X[KR]PG[AITVFLM][WAITVFLM]D[PAITVFLM]IX[KR] (西列番号 39)

【表 1】の続き

脂肪 - 低下ペア外

|              |   |                      |    |
|--------------|---|----------------------|----|
| Endo8-MRP1   | 1 | QATVGDINTERPGMLDFTGK | 20 |
| Endo2-MRP5   | 1 | QAVIGNINTECEMLDLKGG  | 20 |
| Endo10-MRP10 | 1 | QMKVGNCHTPKPSFFDFEGK | 20 |

脂肪 - 低下コンセンサス配列 :

General QAX[VI]GNIN[T/I]EXPXML[DE]FXGK (配列番号 40)  
 Preferred Q[AITVFLM]X[AITVFLM]G[DEN]XNXEXXX [AITVFLM][DE]XXGK  
 (配列番号 41)

脂肪 - 低下ペア外 :

|              |   |                      |    |
|--------------|---|----------------------|----|
| Endo8-MRP1   | 1 | QATVGDINTERPGMLDFTGK | 20 |
| Endo3-MRP3   | 1 | RATVGNIKTERPGMVDKGGK | 20 |
| Endo4-MRP4   | 1 | QATVGDINIACPGMLDLKGG | 20 |
| Endo10-MRP10 | 1 | QMKVGNCHTPKPSFFDFEGK | 20 |
| Endo9-MRP2   | 1 | QATEPCMPKPSFFDLIN    | 20 |
| Endo6-MRP8   | 1 | QATEPCKLSRPGFWQPIER  | 20 |

脂肪 - 低下コンセンサス配列 :

QATVGD[N/P][I/C]N[T/I/M]X[R/K]P[G/M/X]XD[F/L]XG[K/R] (配列番号 42)

グルコース - 低下ペア外 :

|            |   |                      |    |
|------------|---|----------------------|----|
| Endo8-MRP1 | 1 | QATVGDINTERPGMLDFTGK | 20 |
| Endo4-MRP4 | 1 | QATVGDINIACPGMLDLKGG | 20 |
| Endo1-MRP6 | 1 | QATCCDCDPOEPASVYVRE  | 20 |

グルコース - 低下コンセンサス配列 :

QATVGD[I/C]NIXX[P/G/P][M/A][L/S]DXX[G/A][K/R] (配列番号 43)

グルコース - 上昇ペア外 :

|              |   |                      |    |
|--------------|---|----------------------|----|
| Endo2-MRP5   | 1 | QAVIGNINTECEMLDLKGG  | 20 |
| Endo5-MRP7   | 1 | QAVIGNINTEYLEMDFKGG  | 20 |
| Endo3-MRP3   | 1 | RATVGNIKTERPGMVDKGGK | 20 |
| Endo9-MRP2   | 1 | QATEPCMPKPSFFDLIN    | 20 |
| Endo10-MRP10 | 1 | QMKVGNCHTPKPSFFDFEGK | 20 |

グルコース - 上昇ペア外 :

QAXXG[N/D/P][I/C]N[T/I/M][E/P]X[P/X][G/X][M/X]XD[F/L][K/X]GK (配列番号 44)

筋肉質量 上昇ペア外 :

|              |   |                      |    |
|--------------|---|----------------------|----|
| Endo8-MRP1   | 1 | QATVGDINTERPGMLDFTGK | 20 |
| Endo10-MRP10 | 1 | QMKVGNCHTPKPSFFDFEGK | 20 |

筋肉の塊に生じるコンセンサス配列 :

【0401】

【化4】

一般 QXXVGXXNTX(R/K)PXXXDFXGK  
 良好 Q[AITVFLM]XVG[DEN]XNTX[RK]PXX[AITVFLM]DFXGK (配列番号45)

(実施例4：腸間膜脂肪細胞サイズにおける影響)

図1は、各パネルの下に示された薬剤での処置の後に、雄性AKRマウスに固定された腸間膜脂肪細胞の6枚の顕微鏡写真からなる。上段パネル(A-C)において、大きな脂肪細胞が優勢であり、一方、下段パネルにおいて(D-F)において、小さな脂肪細胞が優勢である。これは、特定の沈着物が、特定の処置に反応して沈着する特定の脂肪細胞の質量の減少に対応する。特定の脂肪細胞沈着物の質量に影響を与えるMRPのサブセット、および他の代謝パラメータで影響を有するMRPのサブセットが存在する。

【0402】

(実施例5：遺伝子発現、クローニングおよび抗体産生の要旨)

表32は、各エンドゼピンから合成される、エンドゼピンファミリ(EndoX)および対応する生物活性代謝制御ペプチド(MRP-#)のメンバーを列挙する。さらに、この遺伝子が最も高度に発現される組織が、全RNAを使用するリアルタイム定量RTQS-PCR(TaqMan)、およびテンプレートとしてds cDNAを使用する伝統的なPCRによる結果から示される。種々のエンドゼピンのコード領域に対応するPCR産物を、記載されるようにクローニングの目的のために増幅した。抗ペプチド抗体を、各ヒトの合成20個のアミノ酸ペプチドについてウサギにおいて産生した。決定された(ELISA)抗ペプチドタイターを示す。

【0403】

【表52】

表 32

| エンドゼピン名                                      | 生物活性<br>ペプチド名   | 生物活性ペプチド配列            | 遺伝子発現分布                 |                      |  |                                       | ポリクローナル<br>抗血清産物 |
|--|-----------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|--|---------------------------------------|------------------|
|  |                 |                       | TagMan- 主要組織            |                      | 従来の RT-PCR                             |                                       |                  |
|  |                 |                       | 正常組織                    | がん組織                 | 正常組織<br>分布                             | 70-エントンのための<br>または70-エントンされ<br>た物理的産物 |                  |
| End01  | MFP-6           | QAVTGDSDIIPGPRSDVRAR  | 肝臓<br>内皮細胞              | 複数の<br>CA            | 脳<br>心臓<br>肝臓<br>膵臓<br>骨格筋<br>小腸       | はい                                    | 利用可能な<br>抗体      |
| End02  | MFP-5           | QAVTGMINTDSEPGGLACK   | 脳<br>脾臓                 | 70-CA<br>肺 CA        | 脂肪<br>骨髄<br>胎児の脳<br>胎児の肝臓              | はい                                    | 利用可能な<br>抗体      |
| End03  | MFP-3           | RAVVGNIKTERPGWDFRER   | 脂肪<br>骨格筋               | 胸部CA                 | 脂肪<br>脳<br>肝臓<br>心臓<br>膵臓<br>骨格筋<br>小腸 | はい                                    | 2000             |
| End04  | MFP-4           | QAVTGDINTALPGRLDGRK   | 造血                      | 低い発現                 | 肝臓                                     | はい                                    | 利用可能な抗体          |
| End05  | MFP-7           | QAVTGDINTENTGNDFRGRK  |                         |                      |  |                                       | 利用可能な抗体          |
| End06  | MFP-8           | QAVTGPCKLSEPGFNDFRGRK | 骨格筋                     | 複数のCA                | 肝臓<br>膵臓<br>筋肉                         | はい                                    | 13,000           |
| End07  | MFP-9           | QAVTGDINTDPRRLDGRK    | 脂肪                      | 肝臓CA                 | 脂肪<br>胎児の脳<br>胎児の肝臓                    | はい                                    | 12,000           |
| End08<br>(ACEP / DBI /<br>CCK-RR)            | MFP-1           | QAVTGDINTDPRRLDGRK    | 心臓<br>骨格筋<br>肝臓<br>内皮細胞 | 胸部CA<br>70-CA<br>黒色腫 | 脳<br>肝臓                                | はい                                    | 14,000           |
| End09<br>(PECI<br>(D2, D3 エノイル<br>CoA イリラーゼ) | MFP-2           | QAVTGPCKLSEPGFNDFRGRK |                         |                      | 脳<br>肝臓<br>骨格筋                         | はい                                    | 3,000            |
| End10<br>(ELP)                               | MFP-10          | QAVTGDINTDPRRLDGRK    |                         |                      | 胎児の脳<br>胎児の肝臓<br>骨髄                    | はい                                    | 10,000           |
| 16-マー  |                 |                       |                         |                      |  |                                       |                  |
| End08<br>(ACEP / DBI /<br>CCK-RR)            | MFP-16<br>(ODN) | QAVTGDINTDPRRLDGRK    |                         |                      |  |                                       |                  |
| End08<br>P&I ODN                             | MFP-16L         | QAVTGDINTDPRRLDGRK    |                         |                      |  |                                       |                  |
| End03  | MFP-3S          | RAVVGNIKTERPGWDFRER   |                         |                      |  |                                       |                  |

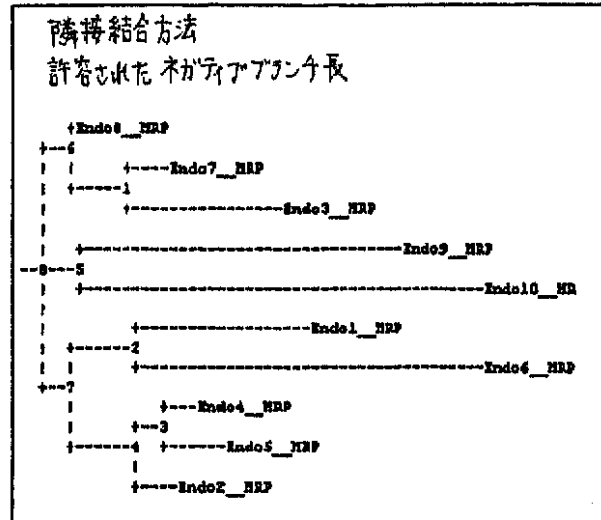
(実施例6：新規および公知のエンドゼピンの中の系統発生関係)

表33は、種々の全長エンドゼピンおよび各エンドゼピン内でコードされたMRPの関連性を示す。この距離を、隣接結合距離を計算するプログラム「Phy lip」(インプット配列の相対的関連性を記載するための方法)によって計算する。

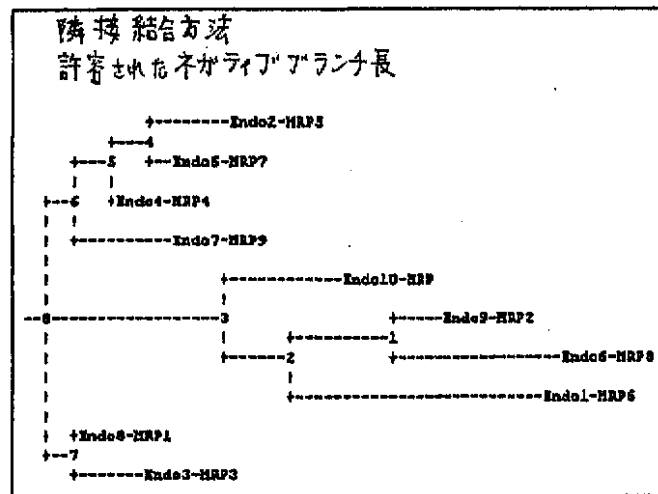
【0404】

【表53】

表 33  
完全タンパク質



代謝-制御マツド配列のみ



(実施例7：他のタンパク質中の関連するペプチドの同定)

表34および35は、特定のコンセンサスモチーフをどのように使用して、同一の代謝パラメータの制御に関連し得る、他の動物種中のポリペプチドを同定し得るかを例示する。このGenBankデータベースを、2つの一般的なコンセンサス配列を使用して調査し、第1の配列は、筋肉の塊の構築物と関連し(表34)、そして第2の配列は、脂肪の塊の減少と関連する(表35)。各ペプチドと同一のコンセンサス配列は、ボールドフォントで示されている。複数の種由来

の多くのポリペプチドは、コンセンサス配列との0、1または2個のミスマッチで同定された。最も高度の類似性は、他の種由来のACBPにおいて見出された。これはまた、図1に見られるが、定向進化配列は、ヒトエンドゼピンファミリーの10個のメンバーのうち6個について見出され得ることを例示する。

【0405】

【表54】

表34  
筋肉を産するモノ-7

Pattern Submitted: 'qxxvgyxxntx(kr)pxxxdfxgk'  
Database Analyzed: Non-Redundant Composite \*  
Matching Sequences To Show: Top 50  
Mismatches Allowed: 3  
Allow Insertions/Deletions: no  
Allow matches to database ambiguities: no

Database contains 553,883 sequences.  
Reporting all 29 matching sequences (did not trigger cutoff of 50 matches).  
There are 4 equivalence classes of equally good matches.

SWISSPROT-ACC:P07107 ACYL-COA-BINDING PROTEIN (ACBP) (DIAZEPAM BINDING INHIBITOR) (DBI) (ENDOZEPINE) (EP) - Bos taurus (Bovine), 86 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                     |
|--------------|----------------|-----------------------------------|
| 0            | 33-52          | IYSHYKQATVGDINTERPGMLDFKGGKAKWDAW |

SWISSPROT-ACC:P07108 ACYL-COA-BINDING PROTEIN (ACBP) (DIAZEPAM BINDING INHIBITOR) (DBI) (ENDOZEPINE) (EP) - Homo sapiens (Human), 86 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                    |
|--------------|----------------|----------------------------------|
| 0            | 33-52          | IYGHYKQATVGDINTERPGMLDFTGKAKWDAW |

SPTREMBL-ACC:Q9VLS4 CG8498 PROTEIN - Drosophila melanogaster (Fruit fly), 90 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                      |
|--------------|----------------|------------------------------------|
| 0            | 35-54          | LYSLYKQATVGDICNTDKPGFLDFKGGKAKWEAW |

SPTREMBL-ACC:Q9PRL8 ACYL-COENZYME A BINDING PROTEIN, ACBP - Gallus gallus (Chicken), 86 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                     |
|--------------|----------------|-----------------------------------|
| 0            | 33-52          | VYSHYKQATVGDVNTDRPGMLDFKGGKAKWDAW |

REMTREMBL-ACC:CAA44618 ACYL-COA-BINDING PROTEIN /DIAZEPAM-BINDING INHIBITOR - synthetic construct, 87aa

| # Mismatches | Match Position | Match Context                     |
|--------------|----------------|-----------------------------------|
| 0            | 34-53          | IYSHYKQATVGDINTERPGMLDFKGGKAKWDAW |

UniProtKB:Q9H018 endozepine [validated] - human, 87 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                    |
|--------------|----------------|----------------------------------|
| 0            | 34-53          | IYGHYKQATVGDINTERPGMLDFTGKAKWDAW |

pir-id:S63593 acyl-coenzyme A-binding protein - turtle, 86 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                     |
|--------------|----------------|-----------------------------------|
| 0            | 33-52          | IYSHFKQATVGDINTERPGFLDFKGGKAKWDAW |

pir-id:S63594 acyl-coenzyme A-binding protein - mallard, 86 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                     |
|--------------|----------------|-----------------------------------|
| 0            | 33-52          | VYSHYKQATVGDVNTDRPGMLDFKGGKAKWDAW |

P11786 ACYL-COA-BINDING PROTEIN (ACBP) (DIAZEPAM BINDING INHIBITOR) (DBI) (ENDOZEPINE) (EP) - Mus musculus (Mouse), 86 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                     |
|--------------|----------------|-----------------------------------|
| 1            | 33-52          | IYSHFKQATVGDVNTDRPGLLDLKGGKAKWDSW |

SWISSPROT-ACC:P12026 ACYL-COA-BINDING PROTEIN (ACBP) (DIAZEPAM BINDING INHIBITOR) (DBI) (ENDOZEPINE) (EP) [CONTAINS: DBI(32-86)] = Sus scrofa (Pig), 86 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                     |
|--------------|----------------|-----------------------------------|
| 1            | 33-52          | IYSHYKQATVGDINTERPGILDLKGGKAKWDAW |

【0406】

【表55】

## 表35

他のタンパク質中で関連するペプチドの同定  
脂質低下モチーフ

Pattern Submitted: 'gax[vl]gnin[ti]expxml[de]fxgk'  
Database Analyzed: Non-Redundant Composite \*  
Matching Sequences To Show: Top 50  
Mismatches Allowed: 3  
Allow Insertions/Deletions: no  
Allow matches to database ambiguities: no

Database contains 553,883 sequences.  
Reporting all 14 matching sequences (did not trigger cutoff of 50 matches).  
There are 3 equivalence classes of equally good matches.

SWISSPROT-ACC:P07107 ACYL-COA-BINDING PROTEIN (ACBP) (DIAZEPAM BINDING INHIBITOR) (DBI) (ENDOZEPINE) (EP) - Bos taurus (Bovine), 86 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                     |
|--------------|----------------|-----------------------------------|
| 1            | 33-52          | IYSHYKQATVGDINTERPGMLDFKGRKAKWDAW |

SWISSPROT-ACC:P07108 ACYL-COA-BINDING PROTEIN (ACBP) (DIAZEPAM BINDING INHIBITOR) (DBI) (ENDOZEPINE) (EP) - Homo sapiens (Human), 86 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                     |
|--------------|----------------|-----------------------------------|
| 1            | 33-52          | IYGHYKQATVGDINTERPGMLDFTGRKAKWDAW |

RENTREMBL-ACC:CAA44618 ACYL-COA-BINDING PROTEIN /DIAZEPAM-BINDING INHIBITOR - synthetic construct, 87aaaa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                     |
|--------------|----------------|-----------------------------------|
| 1 3          | 4-53           | IYSHYKQATVGDINTERPGMLDFKGRKAKWDAW |

pir-id:NZHU endozepine [validated] - human, 87 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                     |
|--------------|----------------|-----------------------------------|
| 1            | 34-53          | IYGHYKQATVGDINTERPGMLDFTGRKAKWDAW |

SWISSPROT-ACC:P45882 ACYL-COA-BINDING PROTEIN (ACBP) (DIAZEPAM BINDING INHIBITOR) (DBI) (ENDOZEPINE) (EP) - Anas platyrhynchos (Domestic duck), 103 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                      |
|--------------|----------------|------------------------------------|
| 2            | 50-69          | LYGPHYKQATVGDINIECPGMLDLKGRKAKWEAW |

pir-id:S63593 acyl-coenzyme A-binding protein - turtle, 86 aa.

| # Mismatches | Match Position | Match Context                     |
|--------------|----------------|-----------------------------------|
| 2            | 33-52          | IYSHFKQATVGDINTERPGFLDFKGRKAKWDAW |

(実施例8:複数の種中の定向進化遺伝子産物)

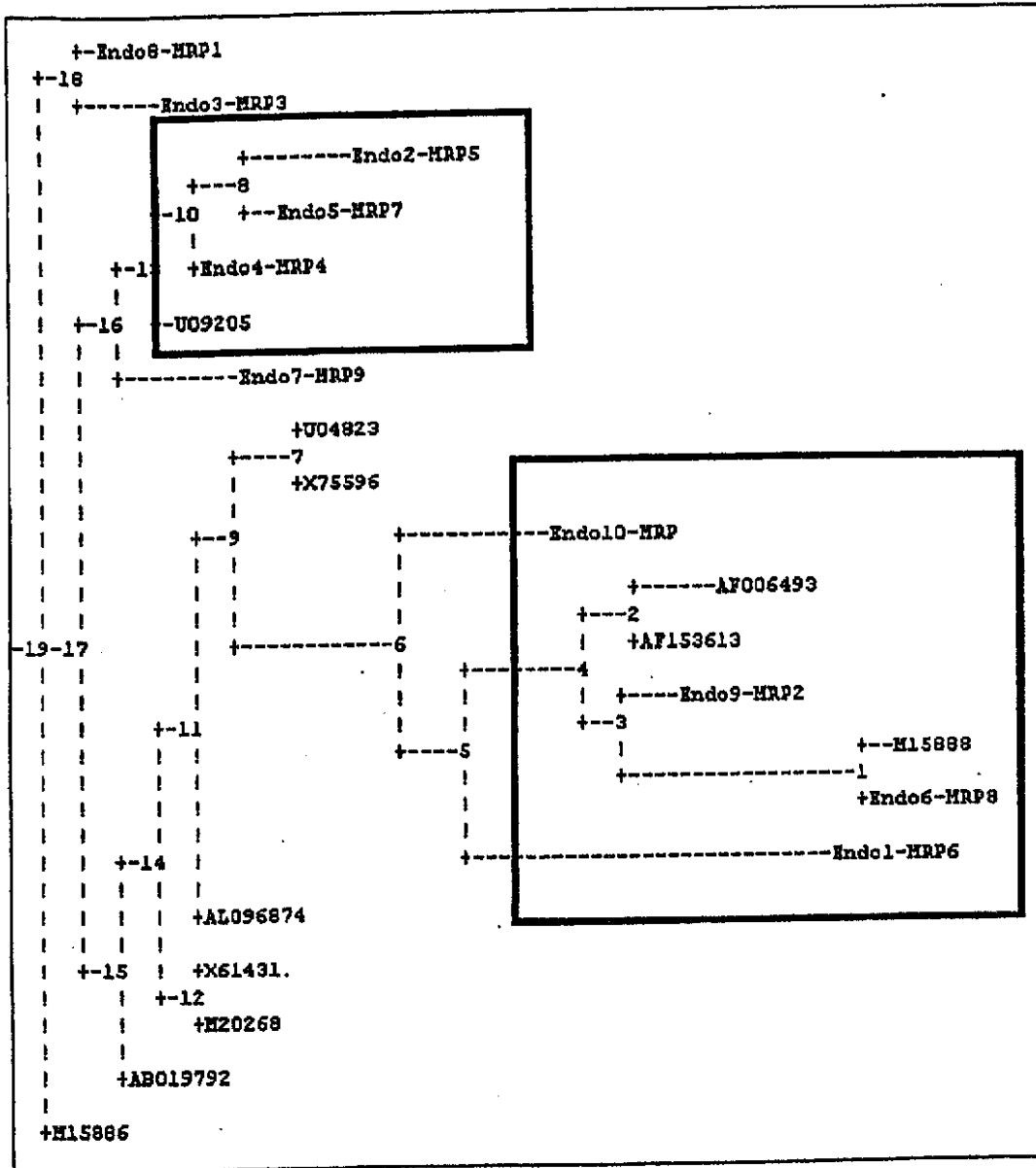
表36は、多様な種にわたるMRPモチーフの高度の保存を例示する。ヒトMRP配列を使用して、関連する配列についてGenBankを調査した。高度の類似性を有する11の他の配列を同定した。20個のアミノ酸MRPドメインの

中心にあるより大きなペプチドを使用することにより、さらなるポリペプチドを同定する。他の種由来の11のエントリーは、それらの取得番号によって示される。カエルからヒトまでの範囲の種由来の同定された21個のペプチドのセットを、PHYLI P、PILEUPおよびClustal Wアルゴリズムによって10個のヒトペプチドのセットに対するそれらの関係について試験した。表36に見られ得るように、他のヒト配列よりもいくらかのヒト配列に類似している非ヒトペプチドが存在する。このことは、ペプチド含有遺伝子が、進化において初期にエネルギー代謝において分岐路を生じて、それに続いたことを示唆する。

【0407】

【表56】

表 36  
複数の種における定向進化遺伝子産物  
PHYLIP



実施例 37 はまた、多様な種にわたる MRP モチーフの高度な保存を例示する

【0408】

【表57】

表 37

| PILEUP      | CLUSTAL W    |
|-------------|--------------|
| U09205      | M15888       |
| endo4mrp4   | Endo8-MRP1   |
| endo2mrp5   | Endo3-MRP3   |
| endo5mrp7   | Endo2-MRP5   |
| U04823      | Endo5-MRP7   |
| X75598      | Endo4-MRP4   |
| AL096874    | U09205       |
| m15888      | U04823       |
| endo8mrp1   | X75598       |
| X61431      | AL096874     |
| m20288      | X61431       |
| AB019792    | M20288       |
| endo3mrp3   | AB019792     |
| endo7mrp9   | Endo7-MRP9   |
| m15888      | Endo10-MRP10 |
| endo6mrp8   | AF006493     |
| af006493    | AF153613     |
| af153613    | Endo8-MRP2   |
| endo8mrp2   | M15888       |
| endo10mrp10 | Endo8-MRP8   |
| endo1mrp6   | Endo1-MRP8   |

(実施例9：エンドゼピンクローニング配列のPCR産物)

各ヒトエンドゼピンのクローニング配列を、複雑な方法を試験するために多数の発現ベクターにクローニングし、ここで、これらの分泌タンパク質および生物学的に活性なMRPは、エネルギー代謝に影響を与える。cDNAのいくらかを、組換えタンパク質を調製するために細菌中でクローニングした。タンパク質の完全なセットを、細菌、酵母およびヒトの細胞中において発現させ、これらの個々の生物化学的活性、タンパク質 - タンパク質相互作用、および単離された細胞または全動物におけるエネルギー代謝をどのように調節するかを研究した。この目的のための物理学的DNA分子を、上記(表29)のような種々の組織からPCRによって産生し、そしてエチジウムブロミド染色アガロースゲル(図2)において見出し得る。Endo1~4、および6~10についての個々のPCR産物は、配列(ここで、隣接クローニング配列の42bpを含む)から推定されるような予想されるサイズである。

【0409】

(他の実施形態)

本発明は、その詳細な説明と組合せて記載されるが、上記の記載は、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲を例示することを意図し、制限す

ることを意図しない。他の局面、利点、および改良は、以下の特許請求の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

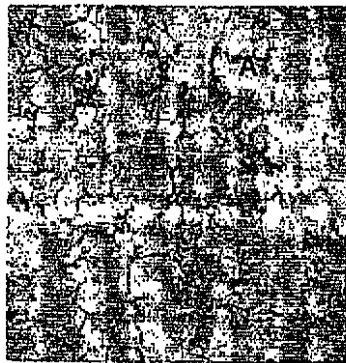
図1は、処置に応じたマウスにおける腸間膜の脂肪貯蔵を示す (de o i c t i n g) 顕微鏡写真を示す。

【図2】

図2は、エンドゼピンコード配列のPCR産物を示す。

【図1】

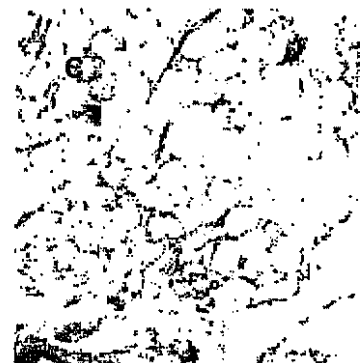
腸間膜脂肪



AKR ビヒクル



AKR MRP3



AKR MRP6



AKR MRP4



AKR MRP1

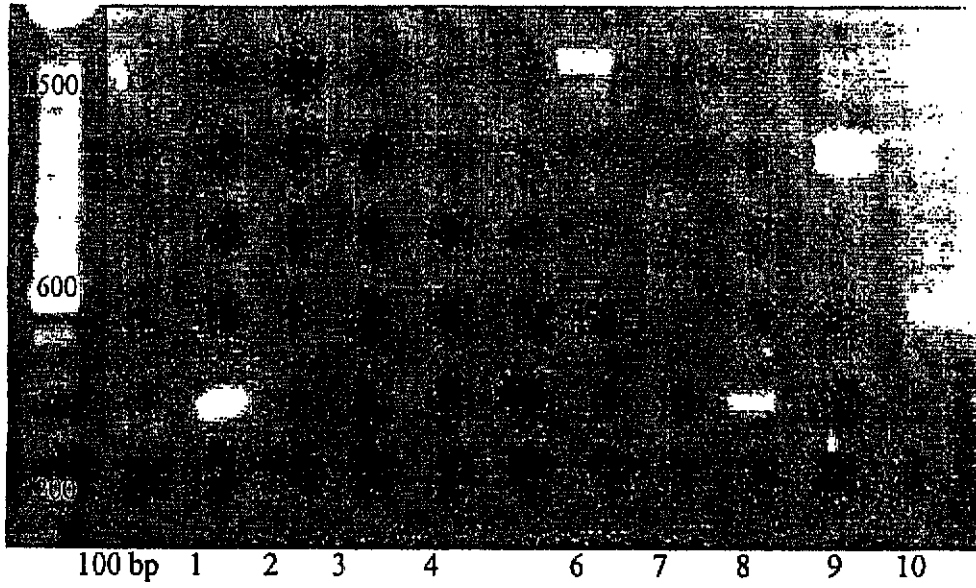


AKR MRP1 (ファット)

【図2】

インドセビンコード配列のPCR産物

・ インドセビン cDNAコードセグメント



## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |   |  |
|---|---|--|
|   |   | International Application No<br>PCT/US 00/41077                                |
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12Q1/68 A61K38/17 G01N33/50<br>G01N33/53   |   |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 C12N C07K C12Q A61K G01N  |   |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |   |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EMBL, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE  |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |   |  |
| Category *  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
| X   | DATABASE EM_EST [Online]<br>EMBL;<br>ID AA877351, AC AA877351,<br>30 March 1998 (1998-03-30)<br>NATIONAL CANCER INSTITUTE, CANCER GENOME<br>ANATOMY PROJECT (CGAP): "nr01c12.s1<br>NCI CGAP Co10 Homo sapiens cDNA clone<br>IMAGE:1160566 3' similar to TR:009035<br>009035 DIAZEPAM BINDING INHIBITOR-LIKE 5<br>;, mRNA sequence."<br>XP002168205<br>cited in the application<br>the whole document<br>---<br>-/-- | 1-49   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.  |   | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"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<br>"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.<br>"Z" document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>2 October 2001   |   | Date of mailing of the international search report<br>15. 10. 01               |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016  |   | Authorized officer<br>van de Kamp, M   |

7

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/41077

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| X  | <p>DATABASE EM_HTG [Online]<br/>EMBL;<br/>ID HSDA109B7, AC AL121672,<br/>30 September 1999 (1999-09-30)<br/>BURTON J: "Human DNA sequence ***<br/>SEQUENCING IN PROGRESS *** from clone<br/>RP6-109B7"<br/>XP002168206<br/>cited in the application<br/>page 11, nucleotides 41434-41999<br/>---</p>   | 5-11                  |
| A  | <p>PUSCH W ET AL: "Rat endozepine-like<br/>peptide (ELP): cDNA cloning, genomic<br/>organization and tissue-specific<br/>expression"<br/>GENE,<br/>vol. 235, no. 1-2,<br/>22 July 1999 (1999-07-22), pages 51-57.<br/>XP004174738<br/>ISSN: 0378-1119<br/>abstract<br/>figure 1B<br/>---</p>   | 1,5,9-49              |
| X  | <p>DATABASE EM_HUM [Online]<br/>EMBL;<br/>ID AC005736, AC AC005736,<br/>2 October 1998 (1998-10-02)<br/>RICKE D O ET AL.: "Homo sapiens chromosome<br/>16, BAC clone 462G18 (LANL), complete<br/>sequence"<br/>XP002179058<br/>cited in the application<br/>page 14, nucleotides 10914-11483<br/>---</p>   | 5-11                  |
| A  | <p>DATABASE EM_EST [Online]<br/>EMBL;<br/>ID AA843364, AC AA843364,<br/>10 March 1998 (1998-03-10)<br/>NATIONAL CANCER INSTITUTE, CANCER GENOME<br/>ANATOMY PROJECT (CGAP): "aj12h06.s1<br/>Soares_parathyroid_tumor_NbHPA Homo<br/>sapiens cDNA clone IMAGE:1390139 3'<br/>similar to gb:M15887 ACYL-COA-BINDING<br/>PROTEIN (HUMAN);, mRNA sequence"<br/>XP002179059<br/>the whole document<br/>---<br/>-/--</p> | 1,5,9-11              |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 00/41077

| D.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| X  | DATABASE EM_HTG [Online]<br>EMBL;<br>ID AC008434, AC AC008434,<br>4 August 1999 (1999-08-04)<br>DOE JOINT GENOME INSTITUTE: "Homo sapiens<br>chromosome 5 clone CTC-325J23, WORKING<br>DRAFT SEQUENCE, 9 unordered pieces"<br>XP002179060<br>pages 10-11, nucleotides 36678-36951<br>---  | 5-11                  |
| X  | WO 86 04239 A (ONCOGEN)<br>31 July 1986 (1986-07-31)<br>the whole document<br>page 14, line 21-29<br>page 24<br>page 44, line 1-17<br>claims 1-39<br>---  | 1-49                  |
| X  | DATABASE EM_EST [Online]<br>EMBL;<br>ID HSZZ11676, AC AA306540,<br>18 April 1997 (1997-04-18)<br>ADAMS M D ET AL.: "EST177491 Jurkat<br>T-cells VI Homo sapiens cDNA 5' end<br>similar to similar to diazepam binding<br>inhibitor"<br>XP002179061<br>the whole document<br>---   | 1-49                  |
| X  | MARQUARDT H ET AL.: "Complete amino acid<br>sequences of bovine and human endozepines"<br>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,<br>vol. 261, no. 21,<br>25 July 1986 (1986-07-25), pages<br>9727-9731, XP002048474<br>abstract<br>figure 3<br>---  | 1-49                  |
| X  | GRAY P W ET AL.: "Cloning and expression<br>of cDNA for human diazepam binding<br>inhibitor, a natural ligand of an<br>allosteric regulatory site of the<br>gamma-aminobutyric acid type A receptor"<br>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF<br>SCIENCES OF USA,<br>vol. 83, no. 19,<br>1 October 1986 (1986-10-01), pages<br>7547-7551, XP002048475<br>ISSN: 0027-8424<br>abstract<br>figures 1,5<br>---<br>-/-- | 1-49                  |

7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/41077

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                           |
|--|--|---------------------------|
| Category °   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.     |
| X  | US 5 945 033 A (YEN RICHARD C K)<br>31 August 1999 (1999-08-31)<br>example 22<br>column 35, line 5,6<br>column 75-76   | 1                         |
| A  | ---<br>SWINNEN J V ET AL.: "A human gene<br>encoding diazepam-binding<br>inhibitor/acyl-CoA-binding protein:<br>transcription and hormonal regulation in<br>the androgen-sensitive human prostatic<br>adenocarcinoma cell line LNCaP"<br>DNA AND CELL BIOLOGY,<br>vol. 15, no. 3, 1 March 1996 (1996-03-01),<br>pages 197-208, XP002048471<br>ISSN: 1044-5498<br>abstract<br>figures 4-6 | 21,27,<br>31,35,<br>44-47 |
| A  | ---<br>WO 98 06847 A (INCYTE PHARMA INC ;AU YOUNG<br>JANICE (US); GOLI SURYA K (US); HILLMA)<br>19 February 1998 (1998-02-19)<br>the whole document<br>figure 2  | 1,5,<br>12-49             |
| A  | ---<br>LEPRINCE J ET AL.: "Structure-activity<br>relationships of a series of analogues of<br>the octadecaneuropeptide ODN on calcium<br>mobilization in rat astrocytes"<br>JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY,<br>vol. 41, no. 23,<br>5 November 1998 (1998-11-05), pages<br>4433-4438, XP002168203<br>abstract<br>page 4433, left-hand column, line 1<br>-right-hand column, line 16       | 1,18-49                   |
| A  | ---<br>TONON M-C ET AL.: "Endozepines:<br>Endogenous ligands for benzodiazepine<br>receptors."<br>MÉDECINE/SCIENCES,<br>vol. 10, no. 4, April 1994 (1994-04),<br>pages 433-443, XP001004825<br>the whole document  | 1,18-49                   |
| A  | ---<br>KNUDSEN J ET AL.: "The function of<br>acyl-CoA-binding protein (ACBP)/diazepam<br>binding inhibitor (DBI)"<br>MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY,<br>vol. 123, no. 1-2,<br>9 June 1993 (1993-06-09), pages 129-138,<br>XP001002412<br>the whole document   | 1,18-49                   |
|  | ---<br>-/--  |                           |

7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/41077

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |  |
|--|--|--|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                            |
| A  | <p>VENTURINI I ET AL.: "Diazepam binding inhibitor and total cholesterol plasma levels in cirrhosis and hepatocellular carcinoma"<br/>REGULATORY PEPTIDES,<br/>vol. 74, no. 1,<br/>24 April 1998 (1998-04-24), pages 31-34,<br/>XP001002501<br/>abstract<br/>page 33, right-hand column, line 24-32<br/>---</p>              | 15-27,<br>29-31,<br>33-35,<br>37,40,<br>43-47,49 |
| A  | <p>REDDY D S ET AL.: "The role of GABA-A and mitochondrial diazepam-binding inhibitor receptors on the effects of neurosteroids on food intake in mice"<br/>PSYCHOPHARMACOLOGY,<br/>vol. 137, no. 4, June 1998 (1998-06),<br/>pages 391-400, XP001002418<br/>abstract<br/>---</p>  | 26-37  |
| A  | <p>HERZIG K H ET AL: "Diazepam binding inhibitor is a CCK releasing peptide in the intestine"<br/>GUT,<br/>vol. 37, no. SUPPL. 02, 1995, page A70<br/>XP000647825<br/>ISSN: 0017-5749<br/>the whole document<br/>---</p>   | 26-49  |
| A  | <p>WO 97 15671 A (UNIV DUKE ;UNIV TEXAS (US))<br/>1 May 1997 (1997-05-01)<br/>examples 5,6<br/>---</p>   | 26-49  |
| P,X  | <p>IVELL R ET AL: "Progressive inactivation of the haploid expressed gene for the sperm-specific endozepine-like peptide (ELP) through primate evolution"<br/>GENE,<br/>vol. 255, no. 2,<br/>19 September 2000 (2000-09-19), pages<br/>335-345, XP004217648<br/>ISSN: 0378-1119<br/>abstract<br/>figures 1,4,5<br/>-----</p> | 1,5,<br>9-11,19,<br>20                           |

7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 00/41077**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:  
Although claims 26-37, 48 and 49 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.
2.  Claims Nos.:  
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:
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:

see additional sheet

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.:  
1-49 (all partially) concerning inventions 1, 3, 7 and 8
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.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-49 (all partially)

An isolated polypeptide (END01) comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NOs 2, 15, 47 and 49, or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules (relating to SEQ ID NOs 1, 46 and 48), vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

2. Claims: 1-49 (all partially)

An isolated polypeptide (END02) comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NOs 4 and 16, or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules (relating to SEQ ID NO 3) vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

3. Claims: 1-49 (all partially)

An isolated polypeptide (END03) comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NOs 6, 17 and 18, or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules (relating to SEQ ID NO 5) vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

4. Claims: 1-49 (all partially)

An isolated polypeptide (END04) comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NOs 8, 19 and 20, or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules (relating to SEQ ID NO 7) vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

5. Claims: 1-49 (all partially)

An isolated polypeptide (END05) comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NOs 10 and 21, or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules (relating to SEQ ID NO 9) vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 218

and kits.

6. Claims: 1-49 (all partially)

An isolated polypeptide (END06) comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NOs 23 and 24, or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules (relating to SEQ ID NO 22) vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

7. Claims: 1-49 (all partially)

An isolated polypeptide (END07) comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NOs 26 and 27, or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules (relating to SEQ ID NO 25) vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

8. Claims: 1-49 (all partially)

An isolated polypeptide (END08) comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NOs 29 and 30, or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules (relating to SEQ ID NO 28) vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

9. Claims: 1-49 (all partially)

An isolated polypeptide (END09) comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NOs 32 and 33, or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules (relating to SEQ ID NO 31) vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

10. Claims: 1-49 (all partially)

An isolated polypeptide (END010) comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NOs 35 and 36, or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules (relating to SEQ ID NO 34) vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

and kits.

## 11. Claims: 1,2,4,5,6,7,11-49 (all partially)

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NO:37 or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules, vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

## 12. Claims: 1,2,4,5,6,7,11-49 (all partially)

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NO:38 or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules, vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

## 13. Claims: 1,2,4,5,6,7,11-49 (all partially)

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NO:39 or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules, vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

## 14. Claims: 1,2,4,5,6,7,11-49 (all partially)

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NO:40 or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules, vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

## 15. Claims: 1,2,4,5,6,7,11-49 (all partially)

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NO:41 or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules, vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

## 16. Claims: 1,2,4,5,6,7,11-49 (all partially)

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NO:42 or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules, vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

## 17. Claims: 1,2,4,5,6,7,11-49 (all partially)

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NO:43 or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules, vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

## 18. Claims: 1,2,4,5,6,7,11-49 (all partially)

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NO:44 or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules, vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

## 19. Claims: 1,2,4,5,6,7,11-49 (all partially)

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence according to SEQ ID NO:45 or variants thereof. Corresponding nucleic acid molecules, vectors and cells containing them, antibodies, methods for testing, screening, identifying, modulating, treating and preventing, and pharmaceutical compositions and kits.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/41077

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |            |
|--|------------------|-------------------------|------------------|------------|
| WO 8604239                             | A                | 31-07-1986              | US 4714683 A     | 22-12-1987 |
|  |                  |                         | US 4806492 A     | 21-02-1989 |
|  |                  |                         | AU 589598 B2     | 19-10-1989 |
|  |                  |                         | AU 5359586 A     | 13-08-1986 |
|  |                  |                         | EP 0210233 A1    | 04-02-1987 |
|  |                  |                         | ES 551233 D0     | 16-05-1987 |
|  |                  |                         | ES 8705897 A1    | 01-08-1987 |
|  |                  |                         | ES 557400 D0     | 01-07-1988 |
|  |                  |                         | ES 8802538 A1    | 16-10-1988 |
|  |                  |                         | JP 3169892 A     | 23-07-1991 |
|  |                  |                         | JP 3155787 A     | 03-07-1991 |
|  |                  |                         | JP 3169896 A     | 23-07-1991 |
|  |                  |                         | JP 3163098 A     | 15-07-1991 |
|  |                  |                         | JP 3172183 A     | 25-07-1991 |
|  |                  |                         | JP 3193800 A     | 23-08-1991 |
|  |                  |                         | JP 3178999 A     | 02-08-1991 |
|  |                  |                         | JP 3164183 A     | 16-07-1991 |
|  |                  |                         | JP 6004672 B     | 19-01-1994 |
|  |                  |                         | JP 62501841 T    | 23-07-1987 |
|  |                  |                         | MX 163576 B      | 03-06-1992 |
|  |                  |                         | PT 81916 A ,B    | 01-02-1986 |
|  |                  |                         | WO 9313089 A1    | 08-07-1993 |
|  |                  |                         | WO 8604239 A1    | 31-07-1986 |
|  |                  |                         | US 4876367 A     | 24-10-1989 |
|  |                  |                         | US 5011777 A     | 30-04-1991 |
| US 4963485 A                           | 16-10-1990       |                         |                  |            |
| US 4777270 A                           | 11-10-1988       |                         |                  |            |
| US 5945033                             | A                | 31-08-1999              | US 5616311 A     | 01-04-1997 |
|  |                  |                         | US 5308620 A     | 03-05-1994 |
|  |                  |                         | US 5725804 A     | 10-03-1998 |
|  |                  |                         | AT 147976 T      | 15-02-1997 |
|  |                  |                         | DE 69124357 D1   | 06-03-1997 |
|  |                  |                         | DE 69124357 T2   | 10-07-1997 |
|  |                  |                         | DK 495187 T3     | 11-08-1997 |
|  |                  |                         | EP 0495187 A1    | 22-07-1992 |
|  |                  |                         | ES 2097783 T3    | 16-04-1997 |
|  |                  |                         | GR 3022703 T3    | 31-05-1997 |
| WO 9806847                             | A                | 19-02-1998              | US 5734038 A     | 31-03-1998 |
|  |                  |                         | AU 4151597 A     | 06-03-1998 |
|  |                  |                         | EP 0920506 A1    | 09-06-1999 |
|  |                  |                         | JP 2000517175 T  | 26-12-2000 |
|  |                  |                         | WO 9806847 A1    | 19-02-1998 |
| WO 9715671                             | A                | 01-05-1997              | AU 708857 B2     | 12-08-1999 |
|  |                  |                         | AU 1117997 A     | 15-05-1997 |
|  |                  |                         | CA 2238940 A1    | 01-05-1997 |
|  |                  |                         | EP 0862631 A1    | 09-09-1998 |
|  |                  |                         | JP 2000515721 T  | 28-11-2000 |
|  |                  |                         | NO 981857 A      | 24-06-1998 |
|  |                  |                         | WO 9715671 A1    | 01-05-1997 |

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号                  | F I     | テ-マ-コ-ト' (参考) |           |
|---------------------------|-----------------------|---------|---------------|-----------|
| A 6 1 P                   | 3/04                  | A 6 1 P | 3/08          | 4 C 0 8 5 |
|                           | 3/06                  |         | 3/10          | 4 C 0 8 6 |
|                           | 3/08                  |         | 7/00          | 4 H 0 4 5 |
|                           | 3/10                  |         | 35/00         |           |
|                           | 7/00                  |         | 43/00         | 1 1 1     |
|                           | 35/00                 | C 0 7 K | 14/47         |           |
|                           | 43/00                 |         | 16/18         |           |
| C 0 7 K                   | 14/47                 | C 1 2 N | 1/15          |           |
|                           | 16/18                 |         | 1/19          |           |
| C 1 2 N                   | 1/15                  |         | 1/21          |           |
|                           | 1/19                  | C 1 2 Q | 1/02          |           |
|                           | 1/21                  |         | 1/68          | A         |
|                           | 5/10                  | G 0 1 N | 33/53         | D         |
| C 1 2 Q                   | 1/02                  |         |               | M         |
|                           | 1/68                  |         | 33/566        |           |
| G 0 1 N                   | 33/53                 | C 1 2 P | 21/08         |           |
|                           |                       | C 1 2 N | 15/00         | Z N A A   |
|                           | 33/566                |         | 5/00          | A         |
| // C 1 2 P                | 21/08                 | A 6 1 K | 37/02         |           |
| (31)優先権主張番号               | 6 0 / 1 7 4 , 5 0 5   |         |               |           |
| (32)優先日                   | 平成12年1月4日(2000.1.4)   |         |               |           |
| (33)優先権主張国                | 米国( U S )             |         |               |           |
| (31)優先権主張番号               | 6 0 / 1 8 3 , 8 5 9   |         |               |           |
| (32)優先日                   | 平成12年2月22日(2000.2.22) |         |               |           |
| (33)優先権主張国                | 米国( U S )             |         |               |           |
| (31)優先権主張番号               | 6 0 / 1 9 0 , 7 4 0   |         |               |           |
| (32)優先日                   | 平成12年3月20日(2000.3.20) |         |               |           |
| (33)優先権主張国                | 米国( U S )             |         |               |           |
| (31)優先権主張番号               | 6 0 / 1 9 1 , 1 3 3   |         |               |           |
| (32)優先日                   | 平成12年3月22日(2000.3.22) |         |               |           |
| (33)優先権主張国                | 米国( U S )             |         |               |           |
| (31)優先権主張番号               | 6 0 / 2 0 6 , 0 0 6   |         |               |           |
| (32)優先日                   | 平成12年5月19日(2000.5.19) |         |               |           |
| (33)優先権主張国                | 米国( U S )             |         |               |           |
| (31)優先権主張番号               | 6 0 / 2 1 5 , 6 8 4   |         |               |           |
| (32)優先日                   | 平成12年6月30日(2000.6.30) |         |               |           |
| (33)優先権主張国                | 米国( U S )             |         |               |           |
| (31)優先権主張番号               | 6 0 / 2 1 9 , 4 9 0   |         |               |           |
| (32)優先日                   | 平成12年7月20日(2000.7.20) |         |               |           |
| (33)優先権主張国                | 米国( U S )             |         |               |           |
| (31)優先権主張番号               | 6 0 / 2 2 7 , 0 7 2   |         |               |           |
| (32)優先日                   | 平成12年8月22日(2000.8.22) |         |               |           |
| (33)優先権主張国                | 米国( U S )             |         |               |           |
| (31)優先権主張番号               | 0 9 / 6 7 9 , 4 6 0   |         |               |           |
| (32)優先日                   | 平成12年10月4日(2000.10.4) |         |               |           |
| (33)優先権主張国                | 米国( U S )             |         |               |           |

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

- (72)発明者 マジウムデーラ, クムド  
 アメリカ合衆国 コネチカット 06905,  
 スタンフォード, シルバー ヒル レ  
 ーン 140
- (72)発明者 アイゼン, アンドリュー  
 アメリカ合衆国 メリーランド 20850,  
 ロックビル, セイント ジェイムズ  
 ロード 12412
- (72)発明者 バーネット, コリーン  
 アメリカ合衆国 フロリダ 32060, ゲ  
 イネスビル, エヌダブリュー 43アール  
 ディー ストリート ピーナンバ-253  
 4830
- (72)発明者 スパダーナ, スティーブン ケイ.  
 アメリカ合衆国 コネチカット 06037,  
 バーリン, ディアフィールド ドライ  
 ブ 261

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 CA04 FA02  
HA01 HA14 HA15  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ43  
QR55 QR62 QS32 QS33 QS34  
4B064 AG27 CA10 DA05 DA06 DA07  
DA13  
4B065 AB01 BA02 CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08  
BA20 BA21 BA23 CA18 DC50  
NA14 ZA512 ZB262 ZC022  
ZC032 ZC332 ZC352  
4C085 AA13 BB11  
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01  
MA04 NA14 ZA51 ZA70 ZB26  
ZC02 ZC33 ZC35  
4H045 AA10 AA11 AA30 CA40 DA76  
EA27 EA28 EA50 EA51

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 编码内松样多肽的多核苷酸和内切 -   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2003527831A</a>   | 公开(公告)日 | 2003-09-24 |
| 申请号            | JP2001528588  | 申请日     | 2000-10-05 |
| [标]申请(专利权)人(译) | CURAGEN CORP  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | Kyurajen公司  |         |            |
| [标]发明人         | プラヤーガスーディルダスケイ<br>シムケッツリチャードエイ<br>マジユムデールクムド<br>アイゼンアンドリユー<br>バーネットコリーン<br>スパダーナスティーブンケイ  |         |            |
| 发明人            | プラヤーガ, スーディルダスケイ.<br>シムケッツ, リチャードエイ.<br>マジユムデール, クムド<br>アイゼン, アンドリユー<br>バーネット, コリーン<br>スパダーナ, スティーブンケイ.   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/08 A61P3/10 A61P7/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/566  |         |            |
| CPC分类号         | A61K38/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/08 A61P3/10 A61P7/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47  |         |            |
| FI分类号          | A61K31/7088 A61K39/395.D A61K48/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/08 A61P3/10 A61P7/00 A61P35/00 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02  |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/FA02 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/DA05 4B064/DA06 4B064/DA07 4B064/DA13 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA512 4C084/ZB262 4C084/ZC022 4C084/ZC032 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/BB11 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA51 4C086/ZA70 4C086/ZB26 4C086/ZC02 4C086/ZC33 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 |         |            |
| 優先権            | 60/157786 1999-10-05 US<br>60/164164 1999-11-09 US<br>60/174505 2000-01-04 US<br>60/183859 2000-02-22 US<br>60/190740 2000-03-20 US<br>60/191133 2000-03-22 US<br>60/206006 2000-05-19 US<br>60/215684 2000-06-30 US<br>60/219490 2000-07-20 US<br>60/227072 2000-08-22 US<br>09/679460 2000-10-04 US   |         |            |

摘要(译)

本文公开了编码内啡肽样多肽的新型人核酸序列。还公开了由这些核酸序列编码的多肽，以及与该多肽免疫特异性结合的抗体，以及上述多肽，多核苷酸或抗体的衍生物，变体，变体或片段。它 本发明进一步公开了用于诊断，治疗和预防疾病的治疗，诊断和研究方法，所述疾病包括新型人内啡肽样核酸和蛋白质。