

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-512852

(P2004-512852A)

(43) 公表日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/19	A 6 1 K 31/19	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 4
A 6 1 K 31/711	A 6 1 K 31/711	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 337 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-543661 (P2002-543661)	(71) 出願人	503156792 キセノン ジェネティックス インコーポ レイテッド XENON GENETICS INC. カナダ国 V5Z 4H5 プリティッシ ュ コロンビア州 パンクーバー ウェス ト シックス アベニュー 520 ナン バー501
(86) (22) 出願日	平成13年11月19日 (2001.11.19)	(74) 代理人	100068755 弁理士 恩田 博宣
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月19日 (2003.5.19)	(74) 代理人	100105957 弁理士 恩田 誠
(86) 国際出願番号	PCT/CA2001/001632		
(87) 国際公開番号	W02002/040666		
(87) 国際公開日	平成14年5月23日 (2002.5.23)		
(31) 優先権主張番号	60/248,589		
(32) 優先日	平成12年11月17日 (2000.11.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪により制御される遺伝子、その使用およびそれを調節する化合物

(57) 【要約】

本発明は、脂肪により制御される遺伝子を特定する方法と、特定された遺伝子およびそれらのタンパク質を用いることにより疾患の治療に使用する組成物を決定する際に引き続き該遺伝子を使用することに関する。特定された組成物は、脂肪により制御される遺伝子の発現を制御するか、またはそれらのタンパク質産物の活性を調節する。新規なミトコンドリア担体タンパク質であるMETPおよび脂肪応答性転写因子であるFTF1のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が教示される。血漿糖タンパク質A1BGのヌクレオチド配列が教示される。ヒトGPATおよびラットGLOLのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が教示される。ヒトMETP、GLOL、FTF1、SCD、GPATおよびA1BGの制御配列が教示される。SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、FTF1、GLOL、A1GB、Spot-14、 Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼおよびMETPについて、多価不飽和脂肪酸制御機能が教示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 配列番号 1 を含む配列と、
- (b) 配列番号 3 を含む配列と、
- (c) 配列番号 6 を含む配列と、
- (d) 配列番号 11 を含む配列と、
- (e) 配列番号 13 を含む配列と、
- (f) 配列番号 16 を含む配列と、
- (g) 配列番号 18 を含む配列と、
- (h) 配列番号 24 を含む配列と、
- (i) (a) ~ (h) のいずれかの配列と少なくとも 80% 相同である配列と、
- (j) (a) ~ (h) のいずれかの配列と少なくとも 90% 相同である配列と、
- (k) (a) ~ (h) のいずれかの配列と少なくとも 95% 相同である配列と、
- (l) (a) ~ (h) のいずれかの配列と少なくとも 98% 相同である配列と、
- (m) (a) ~ (h) のいずれかの配列と少なくとも 99% 相同である配列と、
- (n) ストリンジェントな条件下で (a) ~ (m) のいずれかとハイブリッド形成する配列と、
- (o) (a) ~ (m) のいずれかの機能的誘導体である配列とからなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドセグメント。

【請求項 2】

cDNA である請求項 1 に記載の単離ポリヌクレオチドセグメント。

【請求項 3】

適切なベクター中に請求項 1 に記載のポリヌクレオチドセグメントを含むベクター。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドセグメントと異種である宿主細胞中に前記セグメントを含む宿主細胞。

【請求項 5】

- (a) 請求項 1 に記載のセグメントのヌクレオチドの少なくとも 15 個の連続した塩基を有する配列と、
- (b) 請求項 1 に記載のセグメントのヌクレオチドの少なくとも 30 個の連続した塩基を有する配列と、
- (c) 請求項 1 に記載のセグメントのヌクレオチドの少なくとも 50 個の連続した塩基を有する配列とからなる群から選択される単離ポリヌクレオチドフラグメント。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のポリヌクレオチドセグメントと異種であるベクター中に含まれた前記セグメントを含むベクター。

【請求項 7】

タグを含むか、またはタグをコードする請求項 3 または 6 に記載のベクター。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のセグメントによりコードされるポリヌクレオチドとほぼ同じ生物学的機能または活性を保有するポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドセグメント。

【請求項 9】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 前記セグメントを有する対照動物および前記セグメントを有する試験動物を選択する工程と、
- (b) 前記試験動物を化合物を用いて処理する工程と、
- (c) 前記対照動物と前記試験動物との間の、前記セグメントの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

【請求項 10】

前記動物が哺乳類である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記哺乳類がラットである請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 請求項 4 に記載の宿主細胞を選択する工程と、
- (b) 前記宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、
- (c) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、
- (d) 前記試験群と前記対照群との間の、前記セグメントの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

10

【請求項 13】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 請求項 4 に記載の宿主細胞、その一部またはその単離ポリヌクレオチドを有する試験群および対照群を選択する工程と、
- (b) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、
- (c) 前記試験群と前記対照群との間の、前記セグメントの産物または前記セグメントの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法。

【請求項 14】

- (a) 配列番号 2 を含む配列と、
- (b) 配列番号 4 を含む配列と、
- (c) 配列番号 7 を含む配列と、
- (d) 配列番号 12 を含む配列と、
- (e) 配列番号 14 を含む配列と、
- (f) 配列番号 17 を含む配列と、
- (g) 配列番号 25 を含む配列と、
- (h) (a) ~ (g) のいずれかの配列と少なくとも 80 % 相同である配列と、
- (i) (a) ~ (g) のいずれかの配列と少なくとも 90 % 相同である配列と、
- (j) (a) ~ (g) のいずれかの配列と少なくとも 95 % 相同である配列と、
- (k) (a) ~ (g) のいずれかの配列と少なくとも 98 % 相同である配列と、
- (l) (a) ~ (g) のいずれかの配列と少なくとも 99 % 相同である配列とからなる群から選択される単離ポリペプチドを含む単離ポリペプチドセグメント。

20

30

【請求項 15】

請求項 14 に記載のポリペプチドセグメントと異種である宿主細胞中に前記セグメントを含む宿主細胞。

【請求項 16】

請求項 14 に記載のセグメントのポリペプチドの生産に十分な条件下で請求項 15 に記載の宿主細胞を培養する工程からなる前記ポリペプチドを生産するプロセス。

【請求項 17】

請求項 14 に記載のポリペプチドとほぼ同じ生物学的機能または活性を保有するポリペプチド配列を含む単離ポリペプチドセグメント。

40

【請求項 18】

請求項 14 に記載のポリペプチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 前記セグメントを有する対照動物と前記セグメントを有する試験動物とを選択する工程と、
- (b) 前記試験動物を化合物を用いて処理する工程と、
- (c) 前記対照動物と前記試験動物との間の、前記セグメントの発現産物または前記セグメントの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法。

50

【請求項 19】

前記動物が哺乳類である請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記哺乳類がラットである請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

請求項 14 に記載のポリペプチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 請求項 15 に記載の宿主細胞を選択する工程と、
- (b) 前記宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、
- (c) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、
- (d) 前記試験群と前記対照群との間の、前記セグメントの発現産物または前記セグメントの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法。

10

【請求項 22】

請求項 14 に記載のポリペプチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 請求項 15 に記載の宿主細胞、その一部またはその単離ポリペプチドを有する試験群および対照群を選択する工程と、
- (b) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、
- (c) 前記試験群と前記対照群との間の、前記セグメントの産物または前記セグメントの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法。

20

【請求項 23】

- (a) 配列番号 5 を含む配列と、
- (b) 配列番号 10 を含む配列と、
- (c) 配列番号 15 を含む配列と、
- (d) 配列番号 20 を含む配列と、
- (e) 配列番号 21 を含む配列と、
- (f) 配列番号 26 を含む配列と、
- (g) (a) ~ (f) のいずれかの配列と少なくとも 80 % 相同である配列と、
- (h) (a) ~ (f) のいずれかの配列と少なくとも 90 % 相同である配列と、
- (i) (a) ~ (f) のいずれかの配列と少なくとも 95 % 相同である配列と、
- (j) (a) ~ (f) のいずれかの配列と少なくとも 98 % 相同である配列と、
- (k) (a) ~ (f) のいずれかの配列と少なくとも 99 % 相同である配列と、
- (l) ストリンジェントな条件下で (a) ~ (k) のいずれかとハイブリッド形成する配列とからなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドセグメント。

30

【請求項 24】

ゲノム DNA である請求項 23 に記載の単離ポリヌクレオチドセグメント。

【請求項 25】

適切なベクター中に請求項 23 に記載のポリヌクレオチドセグメントを含むベクター。

【請求項 26】

請求項 23 に記載のポリヌクレオチドセグメントと異種である宿主細胞中に前記セグメントを含む宿主細胞。

40

【請求項 27】

請求項 23 に記載のポリヌクレオチドセグメントに作動可能なように連結された遺伝子によりコードされるポリペプチドの生産に十分な条件下で請求項 26 に記載の宿主細胞を培養する工程からなる、前記ポリペプチドを生産するプロセス。

【請求項 28】

- (a) 請求項 23 に記載のセグメントのヌクレオチドの少なくとも 15 個の連続した塩基を有する配列と、
- (b) 請求項 23 に記載のセグメントのヌクレオチドの少なくとも 30 個の連続した塩基

50

を有する配列と、

(c) 請求項 23 に記載のセグメントのヌクレオチドの少なくとも 50 個の連続した塩基を有する配列とからなる群から選択される単離ポリヌクレオチドフラグメント。

【請求項 29】

請求項 28 に記載のポリヌクレオチドセグメントと異種であるベクター中に含まれた前記セグメントを含むベクター。

【請求項 30】

請求項 23 に記載のセグメントによりコードされるポリヌクレオチドとほぼ同じ生物学的機能または活性を保有するポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドセグメント。

10

【請求項 31】

請求項 23 に記載のポリヌクレオチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

(a) 前記セグメントを有する対照動物および前記セグメントを有する試験動物を選択する工程と、

(b) 前記試験動物を化合物を用いて処理する工程と、

(c) 前記対照動物と前記試験動物との間の、前記セグメントに作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

【請求項 32】

前記動物が哺乳類である請求項 31 に記載の方法。

20

【請求項 33】

前記哺乳類がラットである請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

請求項 23 に記載のポリヌクレオチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

(a) 請求項 26 に記載の宿主細胞を選択する工程と、

(b) 前記宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、

(c) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、

(d) 前記試験群と前記対照群との間の、前記セグメントに作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

30

【請求項 35】

請求項 23 に記載のポリヌクレオチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

(a) 請求項 26 に記載の宿主細胞、その一部またはその単離ポリヌクレオチドを有する試験群および対照群を選択する工程と、

(b) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、

(c) 前記試験群と前記対照群との間の、前記セグメントに作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

【請求項 36】

請求項 1、14 または 23 のいずれか 1 項に記載のセグメントを調節する化合物と医薬として許容可能な担体とを含む、脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害を治療するための組成物。

40

【請求項 37】

前記障害が P U F A 障害である請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記障害が、湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 39】

小有機分子、ペプチド、ポリペプチド、アンチセンス分子、オリゴヌクレオチド、ポリヌ

50

クレオチド、脂肪酸、ならびにそれらの機能的誘導体および化学的誘導体からなる群から選択される請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 40】

脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害を治療するための請求項 36 に記載の組成物の使用。

【請求項 41】

P U F A 障害を治療するための請求項 40 に記載の組成物の使用。

【請求項 42】

前記障害が、湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項 41 に記載の使用。

【請求項 43】

対象における脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害の存在または素因を診断する方法であって、前記対象の組織試料由来の請求項 1 または 23 に記載のセグメント中の生殖系列における配列を野生型の前記セグメントの生殖系列における配列と比較することからなる、前記対象における請求項 1 または 23 に記載のセグメント中の生殖系列における変化の検出を含み、前記対象の生殖系列における配列の変化が前記障害の存在または素因を示す方法。

10

【請求項 44】

前記障害は P U F A 障害である請求項 43 に記載の障害の存在または素因を診断する方法。

【請求項 45】

前記障害が、湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項 44 に記載の障害の存在または素因を診断する方法。

20

【請求項 46】

前記比較が、免疫プロット法、免疫細胞化学、エライザ、DNA フィンガープリント法、*i n s i t u* ハイブリッド形成法、ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、ラジオイムノアッセイ、免疫放射線検定法および免疫酵素検定法からなる群から選択される方法により実施される請求項 43～45 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 47】

対象における脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害の存在または素因を診断する方法であって、前記対象の組織試料由来の請求項 14 に記載のポリペプチドの配列を野生型の前記ポリペプチドの配列と比較することからなり、前記野生型と比較したときの前記対象の配列の変化が脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる前記障害の存在または素因を示す方法。

30

【請求項 48】

前記障害は P U F A 障害である請求項 47 に記載の障害の存在または素因を診断する方法。

【請求項 49】

前記障害が、湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項 48 に記載の障害の存在または素因を診断する方法。

40

【請求項 50】

前記比較が、プロット法、免疫細胞化学、エライザ、DNA フィンガープリント法、ラジオイムノアッセイ、免疫放射線検定法、免疫酵素検定法およびポリペプチド微量検定法からなる群から選択される方法により実施される請求項 47～49 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 51】

S C D 1、S C D 2、S C D、G 6 P D、G P A T、F A S、C O M T、A p o A - 1、I N S I G 1、G L O L、S p o t - 14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイル C o A イソメラーゼからなる群から選択されるポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

50

- (a) 前記ポリヌクレオチドを有する対照動物と前記ポリヌクレオチドを有する試験動物とを選択する工程と、
- (b) 前記試験動物を化合物を用いて処理する工程と、
- (c) 前記対照動物と前記試験動物との間の、前記ポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

【請求項 5 2】

前記動物が哺乳類である請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記哺乳類がラットである請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、Ap o A-1、INSIG1、GLOL、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼからなる群から選択されるポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 前記ポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドと異種である宿主細胞を選択する工程と、
- (b) 前記宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、
- (c) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、
- (d) 前記試験群と前記対照群との間の、前記ポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

10

20

【請求項 5 5】

SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、Ap o A-1、INSIG1、GLOL、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼからなる群から選択されるポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 前記ポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドと異種である宿主細胞、その一部またはその単離ポリヌクレオチドを有する試験群および対照群を選択する工程と、
- (b) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、
- (c) 前記試験群と前記対照群との間の、前記ポリヌクレオチドの産物または前記ポリヌクレオチドの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法。

30

【請求項 5 6】

SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、Ap o A-1、INSIG1、GLOL、ALBG、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼからなる群から選択されるポリペプチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 前記ポリペプチドを有する対照動物と前記ポリペプチドを有する試験動物とを選択する工程と、
- (b) 前記試験動物を化合物を用いて処理する工程と、
- (c) 前記対照動物と前記試験動物との間の、前記ポリペプチドの発現産物または前記ポリペプチドの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法。

40

【請求項 5 7】

前記動物が哺乳類である請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記哺乳類がラットである請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、Ap o A-1、INSIG1、GLOL、ALBG、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼからなる群から選択されるポリペプチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 前記ポリペプチドを含み、前記ポリペプチドと異種である宿主細胞を選択する工程

50

と、

- (b) 前記宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、
- (c) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、
- (d) 前記試験群と前記対照群との間の、前記ポリペプチドの発現産物または前記ポリペプチドの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法。

【請求項 60】

S C D 1、S C D 2、S C D、G 6 P D、G P A T、F A S、C O M T、A p o A - 1、I N S I G 1、G L O L、A 1 B G、S p o t - 1 4 および Δ^3 、 Δ^2 エノイル C o A イソメラーゼからなる群から選択されるポリペプチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 前記ポリペプチドを含み、前記ポリペプチドと異種である宿主細胞、その一部またはその単離ポリペプチドを有する試験群および対照群を選択する工程と、
- (b) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、
- (c) 前記試験群と前記対照群との間の、前記ポリペプチドの産物または前記ポリペプチドの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法。

【請求項 61】

G 6 P D、F A S、C O M T、A p o A - 1、I N S I G 1、S p o t - 1 4 および Δ^3 、 Δ^2 エノイル C o A イソメラーゼからなる群から選択される遺伝子の制御領域であるヒトポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 前記ヒトポリヌクレオチドを有する対照動物と前記ヒトポリヌクレオチドを有する試験動物とを選択する工程と、
- (b) 前記試験動物を化合物を用いて処理する工程と、
- (c) 前記対照動物と前記試験動物との間の、前記ヒトポリヌクレオチドに作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

【請求項 62】

前記動物が哺乳類である請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

前記哺乳類がラットである請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

G 6 P D、F A S、C O M T、A p o A - 1、I N S I G 1、S p o t - 1 4 および Δ^3 、 Δ^2 エノイル C o A イソメラーゼからなる群から選択される遺伝子の制御領域であるヒトポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 前記ヒトポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドと異種である宿主細胞を選択する工程と、
- (b) 前記宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、
- (c) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、
- (d) 前記試験群と前記対照群との間の、前記ヒトポリヌクレオチドに作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

【請求項 65】

G 6 P D、F A S、C O M T、A p o A - 1、I N S I G 1、S p o t - 1 4 および Δ^3 、 Δ^2 エノイル C o A イソメラーゼからなる群から選択される遺伝子の制御領域であるヒトポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

- (a) 前記ヒトポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドと異種である宿主細胞、その一部またはその単離ポリヌクレオチドを有する試験群および対照群を選択する工程と、
- (b) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、
- (c) 前記試験群と前記対照群との間の、前記ヒトポリヌクレオチドと作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

【請求項 66】

S C D 1、S C D 2、S C D、G 6 P D、G P A T、F A S、C O M T、A p o A - 1、

10

20

30

40

50

INSIG1、GLOL、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるコード配列のポリヌクレオチドを調節する化合物と医薬として許容可能な担体とを含む、脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害を治療するための組成物。

【請求項67】

SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、GLOL、ALBG、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるポリペプチドを調節する化合物と医薬として許容可能な担体とを含む、脂肪酸障害を治療するための組成物。

【請求項68】

G6PD、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択される制御領域を調節する化合物と医薬として許容可能な担体とを含む、脂肪酸障害を治療するための組成物。 10

【請求項69】

前記障害がPUFA障害である請求項66～68のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項70】

前記障害が、湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項69に記載の組成物。

【請求項71】

前記化合物が小有機分子、ペプチド、ポリペプチド、アンチセンス分子、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、脂肪酸、ならびにそれらの機能的誘導体および化学的誘導体からなる群から選択される請求項66～68のいずれか1項に記載の組成物。 20

【請求項72】

脂肪酸障害を治療するための請求項66～68のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項73】

PUFA障害を治療するための請求項72に記載の組成物の使用。

【請求項74】

前記障害が湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項73に記載の使用。

【請求項75】

対象における脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害の存在または素因を診断する方法であって、前記対象の組織試料由来のSCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、GLOL、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるコード配列を表すポリヌクレオチドの生殖系列における配列を野生型の該ポリヌクレオチドの生殖系列における配列と比較することからなる、前記対象における前記ポリヌクレオチド中の生殖系列における変化の検出を含み、前記対象の生殖系列における変化が前記障害の存在または素因を示す方法。 30

【請求項76】

対象における脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害の存在または素因を診断する方法であって、前記対象の組織試料由来のG6PD、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択される制御領域を表すヒトポリヌクレオチドの生殖系列における配列を野生型の該ヒトポリヌクレオチドの生殖系列における配列と比較することからなる、前記対象における前記ポリヌクレオチド中の生殖系列における変化の検出を含み、前記対象の生殖系列における変化が前記障害の存在または素因を示す方法。 40

【請求項77】

前記障害がPUFA障害である請求項75または76に記載の障害の存在または素因を診断する方法。

【請求項78】

前記障害が湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項 77 に記載の障害の存在または素因を診断する方法。

【請求項 79】

前記比較が免疫プロット法、免疫細胞化学、エライザ、DNA フィンガープリント法、in situ ハイブリッド形成法、ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、ラジオイムノアッセイ、免疫放射線検定法および免疫酵素検定法からなる群から選択される方法により実施される請求項 75～78 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 80】

対象における脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害の存在または素因を診断する方法であって、前記対象の組織試料由来の SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、GLOL、ALBG、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイル CoA イソメラーゼからなる群から選択されるポリペプチドの配列を該ポリペプチドの野生型の配列と比較することからなり、前記野生型と比較したときの前記対象の配列の変化が脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる前記障害の存在または素因を示す方法。 10

【請求項 81】

前記障害が PUFA 障害である請求項 80 に記載の障害の存在または素因を診断する方法。 20

【請求項 82】

前記障害が湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項 81 に記載の障害の存在または素因を診断する方法。

【請求項 83】

前記比較が免疫プロット法、免疫細胞化学、エライザ、DNA フィンガープリント法、ラジオイムノアッセイ、免疫放射線検定法、免疫酵素検定法およびポリペプチド微量検定法からなる群から選択される方法により実施される請求項 80～82 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 84】

脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、 30

(a) SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、FTF1、GLOL、ALBG、Spot-14、 Δ^3 、 Δ^2 エノイル CoA イソメラーゼおよび METP またはそれらの制御領域の配列からなる群から選択される遺伝子をとともに有する対照動物および試験動物を選択する工程と、

(b) 前記試験動物を化合物を用いて処理する工程と、

(c) 前記対照動物と前記試験動物との間の、前記遺伝子の発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

【請求項 85】

前記動物が哺乳類である請求項 84 に記載の方法。 40

【請求項 86】

前記哺乳類がラットである請求項 85 に記載の方法。

【請求項 87】

前記障害が PUFA 障害である請求項 84～86 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 88】

前記障害が湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、 50

(a) SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、FTF1、GLOL、ALGB、Spot-14、 Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼおよびMETPまたはそれらの制御領域の配列からなる群から選択される遺伝子を含む宿主細胞を選択する工程と、

(b) 前記宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、

(c) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、

(d) 前記試験群と前記対照群との間の、前記遺伝子の発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

【請求項90】

前記障害がPUFA障害である請求項89に記載の方法。

10

【請求項91】

前記障害が湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項90に記載の方法。

【請求項92】

脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害の存在または素因を検出する方法であって、対象における請求項1に記載のポリヌクレオチドセグメントから選択される遺伝子の発現産物の発現のレベルを予備測定した発現対照レベルを基準として測定することからなり、前記対照と比較したときの前記発現産物の発現の変化が脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる障害の存在または素因を示す方法。

【請求項93】

20

脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる障害の存在または素因を検出する方法であって、対象におけるSCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14、 Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼ、FTF1、GLOL、ALGBおよびMETPからなる群から選択される遺伝子の発現産物の発現のレベルを予備測定した発現対照レベルを基準として測定することからなり、前記対照と比較したときの前記発現産物の発現の変化が脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる障害の存在または素因を示す方法。

【請求項94】

前記障害がPUFA障害である請求項92または93に記載の方法。

【請求項95】

30

前記障害が湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項94に記載の方法。

【請求項96】

前記方法が免疫ブロット法、免疫細胞化学、エライザ、in situハイブリッド形成、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、ラジオイムノアッセイ、免疫放射線検定法、免疫酵素検定法ならびにポリヌクレオチドおよびポリペプチド微量検定法からなる群から選択される請求項92～95のいずれか1項に記載の方法。

【請求項97】

請求項14に記載のポリペプチドまたはその免疫原性の部分に免疫反応性を有する抗体。

【請求項98】

40

FTF1、GLOLおよびMETPからなる群から選択されるポリペプチドまたはその免疫原性の部分に免疫反応性を有する抗体。

【請求項99】

請求項14に記載のポリペプチドまたはFTF1、GLOLおよびMETPからなる群から選択されるポリペプチドについて培地をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項97または98に記載の抗体をマーカー分子で標識して結合体を形成させること、

(b) 前記結合体を前記培地に曝露させること、および

(c) 前記培地中において前記結合体と生体分子との間に前記ポリペプチドの存在を示す結合が存在するかどうかを判定することからなる方法。

50

【請求項 100】

請求項 14 に記載のポリペプチドまたは F T F 1、G L O L および M E T P からなる群から選択されるポリペプチドについて培地をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 97 または 98 に記載の抗体を前記培地に曝露させること、

(b) 前記抗体をマーカー分子に曝露させること、および

(c) 前記培地中において前記マーカー分子と生体分子との間に前記ポリペプチドの存在を示す結合が存在するかどうかを判定することからなる方法。

【請求項 101】

前記化合物が請求項 97 または 98 に記載の抗体からなる請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 102】

前記組成物が S C D 1、S C D 2、S C D、G 6 P D、G P A T、F A S、C O M T、A p o A - 1、I N S I G 1、A 1 G B、S p o t - 14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイル C o A イソメラーゼに対する抗体からなる群から選択される請求項 66 ~ 68 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 103】

脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる障害を治療するための請求項 101 または 102 に記載の組成物の使用。

【請求項 104】

前記障害が P U F A 障害である請求項 103 に記載の使用。

【請求項 105】

前記障害が湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項 104 に記載の使用。

【請求項 106】

脂肪により制御された遺伝子またはタンパク質を特定する方法であって、

(a) 動物種を選択し、それらを試験群と対照群とに分けること、

(b) 試験群と対照群とに脂肪非含有飼料を所定の期間与えること、

(c) その後、試験群に高度に精製された多価不飽和脂肪酸を経腸的または非経口的に第 2 の所定の期間与えること、

(d) その後、対照群および試験群から組織を摘出すること、

(e) 対照群の組織由来の R N A を試験群の組織由来の R N A と比較し、対照群と試験群との間で異なるレベルで発現された R N A を選択すること、および

(f) 選択された R N A と関連する遺伝子またはタンパク質を決定することからなる方法。

【請求項 107】

前記動物がラットである請求項 106 に記載の方法。

【請求項 108】

前記所定の期間が少なくとも 2 週間である請求項 106 に記載の方法。

【請求項 109】

前記第 2 の所定の期間が少なくとも 2 週間である請求項 106 に記載の方法。

【請求項 110】

前記比較がディファレンシャル・ディスプレイ法およびノーザンブロット法による請求項 106 に記載の方法。

【請求項 111】

M E T P、G L O L、F T F 1、A 1 B G、S C D、G P A T、G 6 P D、F A S、C O M T、A p o A - 1、I N S I G 1、S p o t - 14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイル C o A イソメラーゼからなる群から選択される遺伝子の制御領域である、2 つまたはそれ以上のヒトポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

(a) 前記ヒトポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドと異種である 2 つまたはそれ以上の宿主細胞を選択する工程と、

(b) 前記宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、

(c) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、
(d) 前記試験群と前記対照群との間の、前記ヒトポリヌクレオチドと作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

【請求項 112】

METP、GLOL、FTF1、A1BG、SCD、GPAT、G6PD、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoA イソメラーゼからなる群から選択される遺伝子の制御領域である、2つまたはそれ以上のヒトポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、

(a) 前記ヒトポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドと異種である2つまたはそれ以上の宿主細胞、その一部またはその単離ポリヌクレオチドを有する試験群および対照群を選択する工程と、

(b) 前記試験群を化合物を用いて処理する工程と、

(c) 前記試験群と前記対照群との間の、前記ヒトポリヌクレオチドと作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法。

【請求項 113】

METP、GLOL、FTF1、A1BG、SCD、GPAT、G6PD、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoA イソメラーゼからなる群から選択される遺伝子の2つまたはそれ以上のヒトポリヌクレオチド制御領域を調節する化合物と医薬として許容可能な担体とを含む、脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害を治療するための組成物。

【請求項 114】

前記障害がPUFA障害である請求項 113 に記載の組成物。

【請求項 115】

前記障害が湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項 114 に記載の組成物。

【請求項 116】

前記化合物が小有機分子、ペプチド、ポリペプチド、アンチセンス分子、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、脂肪酸、ならびにそれらの機能的誘導体および化学的誘導体からなる群から選択される請求項 113～115 のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 117】

脂肪酸により変化する遺伝子にかかわる障害を治療するための請求項 113 に記載の組成物の使用。

【請求項 118】

PUFA障害を治療するための請求項 117 に記載の組成物の使用。

【請求項 119】

前記障害が、湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項 118 に記載の使用。

【請求項 120】

脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる障害の存在または素因を検出する方法であって、対象におけるヒトSCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14、 Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoA イソメラーゼ、FTF1、GLOL、A1BG および METP からなる群から選択される遺伝子の2つまたはそれ以上の発現産物の発現レベルを予備測定した発現対照レベルを基準として測定することからなり、前記対照と比較したときの前記発現産物の発現の変化が脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる障害の存在または素因を示す方法。

【請求項 121】

前記障害がPUFA障害である請求項 120 に記載の方法。

【請求項 122】

10

20

30

40

50

前記障害が、湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記方法が免疫ブロット法、免疫細胞化学、エライザ、*in situ* ハイブリッド形成法、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、ラジオイムノアッセイ、免疫放射線検定法および免疫酵素検定法、ならびにポリヌクレオチドおよびポリペプチド微量検定法からなる群から選択される請求項 1 2 0 ～ 1 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

請求項 9 ～ 1 3、1 8 ～ 2 2、3 1 ～ 3 5、5 1 ～ 6 5、8 4 ～ 9 1 または 1 1 1 ～ 1 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法により特定される化合物。 10

【請求項 1 2 5】

脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害を治療するための請求項 1 2 4 に記載の化合物の使用。

【請求項 1 2 6】

前記障害が P U F A 障害である請求項 1 2 5 に記載の化合物の使用。

【請求項 1 2 7】

前記障害が、湿疹、心血管障害、炎症、体重異常、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択される請求項 1 2 6 に記載の使用 20

【請求項 1 2 8】

心血管障害が高トリグリセリド血症、異常脂質血症、アテローム動脈硬化症、冠動脈疾患、脳血管疾患および末梢血管疾患からなる群から選択される請求項 3 8、7 0、および 1 1 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 2 9】

心血管障害が高トリグリセリド血症、異常脂質血症、アテローム動脈硬化症、冠動脈疾患、脳血管疾患および末梢血管疾患からなる群から選択される請求項 4 2、7 4、1 1 9 および 1 2 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 3 0】

心血管障害が高トリグリセリド血症、異常脂質血症、アテローム動脈硬化症、冠動脈疾患、脳血管疾患および末梢血管疾患からなる群から選択される請求項 4 5、4 9、7 8、8 1、9 1、9 5、1 0 5 および 1 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 1 3 1】

炎症が副鼻腔炎、喘息、膵臓炎、骨関節症、慢性関節リウマチおよびざ瘡からなる群から選択される請求項 3 8、7 0 および 1 1 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 3 2】

炎症が副鼻腔炎、喘息、膵臓炎、骨関節症、慢性関節リウマチおよびざ瘡からなる群から選択される請求項 4 2、7 4、1 1 9 および 1 2 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 3 3】

炎症が副鼻腔炎、喘息、膵臓炎、骨関節症、慢性関節リウマチおよびざ瘡からなる群から選択される請求項 4 5、4 9、7 8、8 1、9 1、9 5、1 0 5 および 1 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 1 3 4】

体重異常が肥満、悪液質および食欲不振からなる群から選択される請求項 3 8、7 0 および 1 1 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 3 5】

体重異常が肥満、悪液質および食欲不振からなる群から選択される請求項 4 2、7 4、1 1 9 および 1 2 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 3 6】

体重異常が肥満、悪液質および食欲不振からなる群から選択される請求項 4 5、4 9、7 50

8、81、91、95、105および122のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、(a) その遺伝子が脂肪により制御される (fat regulated、以後「脂肪調節性」と称する) タンパク質の活性を調節 (モジュレート) する組成物、(b) 脂肪調節性遺伝子の活性を調節する組成物および (c) 脂肪調節性遺伝子の発現を効果的に制御する組成物を特定する方法、ならびにそのようにして特定された組成物に関する。

【0002】

(発明の背景)

多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の欠乏は、湿疹、心血管障害、炎症、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群および糖尿病のような多くの疾患と関連づけられている (ホロビン ディー エフ (Horrobin D. F.)、1990年、Pathophysiology and Roles in Clinical Medicine、ワイリー・リス (Wiley-Liss) [ニューヨーク所在] ならびにマッツァ ジーおよびドマー ビー ディー (Mazza G. and Domah B. D.) (編)、2000年、Herbs, Botanicals and Teas、テクノミックパブリシャーズ (Technomic Publishers) [ペンシルバニア州ランカスター所在])。食事へのPUFAの補給がこれらの多くの状態に対する療法として試みられた。そのような適用の成功の程度は著しく異なっていた。

【0003】

PUFAが糖尿病性神経障害の症状の一部を軽減し、矯正する可能性があることが認められている (ダインスら (Dines et al.)、1993年、Diabetologia、第36巻、1132~1138ページおよびコッターら (Cotter et al.)、1995年、Diabetic Neuropathy: New Concepts and Insights、エルセビイアサイエンス ビー ブイ (Elsevier Science B. V.) [アムステルダム所在]、115~120ページ)。研究者らは、n-3およびn-6脂肪酸族のシクロオキシゲナーゼ代謝物およびリポキシゲナーゼ代謝物の産生または変化がこれらの有益な効果の一部を担っていると推測している。カメロンら (Cameron et al.) (1993年、Br. J. Pharmacol.、第109巻、972~979ページ) およびダインスら (Dines et al.) (1996年、Prostaglandins Leukotr. Essent. Fatty Acids、第55巻、159~165ページ) はともに、血管拡張物質であるプロスタグランジンのレベルの増加または血管収縮物質でかつ血小板凝集性のプロスタグランジンの減少により、糖尿病性神経障害の症状が軽減される可能性があるかと仮定した。脂肪酸の薬物としての開発は、限られた成果しか上がらなかった。これは、一部には、経口投与された脂肪酸が多くの生体異物の薬物のようには挙動せず、その代謝が複雑であるからである。

【0004】

(発明の概要)

本発明は、(a) 配列番号1を含む配列と、(b) 配列番号3を含む配列と、(c) 配列番号6を含む配列と、(d) 配列番号11を含む配列と、(e) 配列番号13を含む配列と、(f) 配列番号16を含む配列と、(g) 配列番号18を含む配列と、(h) 配列番号24を含む配列と、(i) (a)~(h)のいずれかの配列と少なくとも80%相同である配列と、(j) (a)~(h)のいずれかの配列と少なくとも90%相同である配列と、(k) (a)~(h)のいずれかの配列と少なくとも95%相同である配列と、(l) (a)~(h)のいずれかの配列と少なくとも98%相同である配列と、(m) (a)~(h)のいずれかの配列と少なくとも99%相同である配列と、(n) ストリンジェントな条件下で (a)~(m)のいずれかとハイブリッド形成する配列と、(o) (a)~

(m) のいずれかの機能的誘導体である配列とからなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む、単離ポリヌクレオチドセグメント（単離されたポリヌクレオチド断片）を教示する。本発明は、本発明のポリヌクレオチドとほぼ同じ生物学的機能または活性を保有するポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドセグメントを含む。1実施形態では、単離ポリヌクレオチドセグメントはcDNAである。

【0005】

本発明は、(a) 配列番号2を含む配列と、(b) 配列番号4を含む配列と、(c) 配列番号7を含む配列と、(d) 配列番号12を含む配列と、(e) 配列番号14を含む配列と、(f) 配列番号17を含む配列と、(g) 配列番号25を含む配列と、(h) (a) ~ (g) のいずれかの配列と少なくとも80%相同である配列と、(i) (a) ~ (g) のいずれかの配列と少なくとも90%相同である配列と、(j) (a) ~ (g) のいずれかの配列と少なくとも95%相同である配列と、(k) (a) ~ (g) のいずれかの配列と少なくとも98%相同である配列と、(l) (a) ~ (g) のいずれかの配列と少なくとも99%相同である配列とからなる群から選択される単離ポリペプチドを含む単離ポリペプチドセグメントを教示する。 10

【0006】

本発明は、本発明のポリペプチドセグメントと異種である宿主細胞中に該セグメントを含む宿主細胞を含む。本発明はまた、本発明のセグメントのポリペプチドの生産に十分な条件下で本発明の宿主細胞を培養する工程からなる、該ポリペプチドを生産するプロセスも教示する。本発明は、本発明のセグメントのポリペプチドとほぼ同じ生物学的機能または活性を保有するポリペプチド配列を含む。 20

【0007】

本発明はまた、本発明のポリペプチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a) 該セグメントを有する対照動物と該セグメントを有する試験動物とを選択する工程と、(b) 前記試験動物を化合物を用いて処理する工程と、(c) 対照動物と試験動物との間の、該セグメントの発現産物または該セグメントの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法も教示する。動物は、哺乳類であってよい。哺乳類は、ラットであってよい。

【0008】

他の実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a) 本発明の宿主細胞を選択する工程と、(b) 宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、(c) 試験群を化合物を用いて処理する工程と、(d) 試験群と対照群との間の、該セグメントの発現産物または該セグメントの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法を教示している。 30

【0009】

他の実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a) 本発明の宿主細胞、その一部またはその単離ポリペプチドを有する試験群および対照群を選択する工程と、(b) 試験群を化合物を用いて処理する工程と、(c) 試験群と対照群との間の、該セグメントの発現産物または該セグメントの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法を含む。 40

【0010】

他の実施形態において、本発明は、(a) 配列番号5を含む配列と、(b) 配列番号10を含む配列と、(c) 配列番号15を含む配列と、(d) 配列番号20を含む配列と、(e) 配列番号21を含む配列と、(f) 配列番号26を含む配列と、(g) (a) ~ (f) のいずれかの配列と少なくとも80%相同である配列と、(h) (a) ~ (f) のいずれかの配列と少なくとも90%相同である配列と、(i) (a) ~ (f) のいずれかの配列と少なくとも95%相同である配列と、(j) (a) ~ (f) のいずれかの配列と少なくとも98%相同である配列と、(k) (a) ~ (f) のいずれかの配列と少なくとも99%相同である配列と、(l) ストリンジェントな条件下で (a) ~ (k) のいずれかと 50

ハイブリッド形成する配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドセグメントを教示する。単離ポリヌクレオチドセグメントはゲノムDNAであってよい。

【0011】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドセグメントを含むベクターも教示する。ベクターはそのセグメントと異種であってよい。該ベクターは、タグを含むか、またはタグをコードしてよい。本発明は、本発明のポリヌクレオチドセグメントと異種である宿主細胞中に該セグメントを含む宿主細胞を教示する。

【0012】

他の実施形態において、本発明は、(a) 本発明のセグメントのヌクレオチドの少なくとも15個の連続した塩基を有する配列と、(b) 本発明のセグメントのヌクレオチドの少なくとも30個の連続した塩基を有する配列と、(c) 本発明のセグメントのヌクレオチドの少なくとも50個の連続した塩基を有する配列とからなる群から選択される単離ポリヌクレオチドフラグメントを含む。

【0013】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a) 該セグメントを有する対照動物および該セグメントを有する試験動物を選択する工程と、(b) 試験動物を化合物を用いて処理する工程と、(c) 対照動物と試験動物との間の、該セグメントの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法を教示する。動物は、哺乳類であってよい。哺乳類は、ラットであってよい。

【0014】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a) 本発明の宿主細胞を選択する工程と、(b) 宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、(c) 試験群を化合物を用いて処理する工程と、(d) 試験群と対照群との間の、該セグメントの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法を教示する。

【0015】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドセグメントの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a) 本発明の宿主細胞、その一部またはその単離ポリヌクレオチドを有する試験群および対照群を選択する工程と、(b) 試験群を化合物を用いて処理する工程と、(c) 試験群と対照群との間の、セグメントの産物またはセグメントの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法をさらに教示する。

【0016】

他の実施形態において、本発明は、本発明のセグメントを調節する化合物と医薬として許容可能な担体とを含む、脂肪酸により制御される遺伝子(以後「脂肪酸調節性遺伝子」と称する)にかかわる障害を治療するための組成物を教示する。本発明は、脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害を治療するための本発明の組成物の使用をさらに教示する。

【0017】

本発明はまた、対象における脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害の存在または素因を診断する方法であって、対象の組織試料由来の本発明のセグメント中の生殖系列における配列を野生型のセグメントの生殖系列における配列と比較することからなる、対象における本発明のセグメント中の生殖系列における変化の検出を含み、対象の生殖系列における配列の変化が障害の存在または素因を示す方法も教示する。

【0018】

本発明は、対象における脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害の存在または素因を診断する方法であって、対象の組織試料由来の本発明のポリペプチドの配列を野生型のポリペプチドの配列と比較することからなり、野生型と比較したときの対象の配列の変化が脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる前記障害の存在または素因を示す方法を教示する。

【0019】

本発明は、SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、Ap

○A-1、INSIG1、GLOL、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a)該ポリヌクレオチドを有する対照動物と該ポリヌクレオチドを有する試験動物とを選択する工程と、(b)試験動物を化合物を用いて処理する工程と、(c)対照動物と試験動物との間の、該ポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法を教示している。

【0020】

本発明は、SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、GLOL、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a)該ポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドと異種である宿主細胞を選択する工程と、(b)宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、(c)試験群を化合物を用いて処理する工程と、(d)試験群と対照群との間の、該ポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法を教示する。

10

【0021】

本発明は、SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、GLOL、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a)該ポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドと異種である宿主細胞、その一部またはその単離ポリヌクレオチドを有する試験群および対照群を選択する工程と(b)試験群を化合物を用いて処理する工程と、(c)試験群と対照群との間の、該ポリヌクレオチドの産物または該ポリヌクレオチドの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法を教示する。

20

【0022】

本発明は、SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、GLOL、ALBG、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるポリペプチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a)該ポリペプチドを有する対照動物と該ポリペプチドを有する試験動物とを選択する工程と、(b)試験動物を化合物を用いて処理する工程と、(c)対照動物と試験動物との間の、該ポリペプチドの発現産物または該ポリペプチドの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法を教示する。

30

【0023】

本発明は、SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、GLOL、ALBG、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるポリペプチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a)該ポリペプチドを含み、該ポリペプチドと異種である宿主細胞を選択する工程と、(b)宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、(c)試験群を化合物を用いて処理する工程と、(d)試験群と対照群との間の、該ポリペプチドの発現産物または該ポリペプチドの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法を教示する。

40

【0024】

本発明は、SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、GLOL、ALBG、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるポリペプチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a)該ポリペプチドを含み、該ポリペプチドと異種である宿主細胞、その一部またはその単離ポリペプチドを有する試験群および対照群を選択する工程と、(b)試験群を化合物を用いて処理する工程と、(c)試験群と対照群との間の、該ポリペプチドの産物または該ポリペプチドの相対量または相対活性を測定する工程とからなる方法を教示する。

50

【0025】

本発明は、G6PD、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択される遺伝子の制御領域であるヒトポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a) 該ヒトポリヌクレオチドを有する対照動物と該ヒトポリヌクレオチドを有する試験動物とを選択する工程と、(b) 試験動物を化合物を用いて処理する工程と、(c) 対照動物と試験動物との間の、該ヒトポリヌクレオチドに作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法を教示する。

【0026】

本発明は、G6PD、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択される遺伝子の制御領域であるヒトポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a) 該ヒトポリヌクレオチドを含み、該ヒトポリヌクレオチドと異種である宿主細胞を選択する工程と、(b) 宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、(c) 試験群を化合物を用いて処理する工程と、(d) 試験群と対照群との間の、該ヒトポリヌクレオチドに作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法を教示する。 10

【0027】

本発明は、G6PD、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択される遺伝子の制御領域であるヒトポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a) 該ヒトポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドと異種である宿主細胞、その一部またはその単離ポリヌクレオチドを有する試験群および対照群を選択する工程と、(b) 試験群を化合物を用いて処理する工程と、(c) 試験群と対照群との間の、該ヒトポリヌクレオチドと作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法を教示する。 20

【0028】

本発明は、SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、GLOL、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるコード配列のポリヌクレオチドを調節する化合物と医薬として許容可能な担体とを含む、脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害を治療するための組成物を教示する。 30

【0029】

本発明は、SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、GLOL、ALBG、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるポリペプチドを調節する化合物と医薬として許容可能な担体とを含む、脂肪酸障害を治療するための組成物を教示する。

【0030】

本発明は、G6PD、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択される制御領域を調節する化合物と医薬として許容可能な担体とを含む、脂肪酸障害を治療するための組成物を教示する。 40

【0031】

別の実施形態では、本発明は、対象における脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害の存在または素因を診断する方法であって、対象の組織試料由来のSCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、GLOL、Spot-14 および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるコード配列を表すポリヌクレオチドの生殖系列における配列を野生型の該ポリヌクレオチドの生殖系列における配列と比較することからなる、該対象における該ポリヌクレオチド中の生殖系列における変化の検出を含み、対象の生殖系列における変化が前記障害の存在また 50

は素因を示す方法を教示する。

【0032】

本発明は、対象における脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害の存在または素因を診断する方法であって、対象の組織試料由来のG6PD、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択される制御領域を表すヒトポリヌクレオチド中の生殖系列における配列を野生型の該ヒトポリヌクレオチドの生殖系列における配列と比較することからなる、対象における該ヒトポリヌクレオチド中の生殖系列における変化の検出を含み、対象の生殖系列における変化が前記障害の存在または素因を示す方法も教示する。

【0033】

本発明は、対象における脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害の存在または素因を診断する方法であって、該対象の組織試料由来のSCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、GLOL、ALBG、Spot-14および Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼからなる群から選択されるポリペプチドの配列を該ポリペプチドの野生型の配列と比較することからなり、野生型と比較したときの対象の配列の変化が脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる前記障害の存在または素因を示す方法を教示する。

【0034】

本発明は、脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a)SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、FTF1、GLOL、ALBG、Spot-14、 Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼおよびMETPまたはそれらの制御領域の配列からなる群から選択される遺伝子とともに有する対照動物および試験動物を選択する工程と、(b)試験動物を化合物を用いて処理する工程と、(c)対照群と試験群との間の、該遺伝子の発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法を教示している。

【0035】

本発明は、脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a)SCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、FTF1、GLOL、ALBG、Spot-14、 Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼおよびMETPまたはそれらの制御領域の配列からなる群から選択される遺伝子を含む宿主細胞を選択する工程と、(b)宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、(c)試験群を化合物を用いて処理する工程と、(d)試験群と対照群との間の、該遺伝子の発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法も教示する。

【0036】

本発明は、脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害の存在または素因を検出する方法であって、対象における本発明のポリヌクレオチドセグメントから選択される遺伝子の発現産物の発現のレベルを予備測定した発現対照レベルを基準として測定することからなり、対照と比較したときの前記発現産物の発現の変化が脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる障害の存在または素因を示す方法を教示する。

【0037】

本発明は、脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる障害の存在または素因を検出する方法であって、対象におけるSCD1、SCD2、SCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14、 Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼ、FTF1、GLOL、ALBGおよびMETPからなる群から選択される遺伝子の発現産物の発現レベルを予備測定した発現対照レベルを基準として測定することからなり、対照と比較したときの発現産物の発現の変化が脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる障害の存在または素因を示す方法を教示する。

【0038】

他の実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその免疫原性の部分に免

10

20

30

40

50

疫反応性を有する抗体を教示する。複数の実施形態において、該抗体は F T F 1、G L O L および M E T P からなる群から選択されるポリペプチドまたはそれらの免疫原性の部分に免疫反応性を有する。

【0039】

本発明は、本発明のポリペプチド、または F T F 1、G L O L および M E T P からなる群から選択されるポリペプチドについて培地をスクリーニングする方法であって、(a) 本発明の抗体をマーカー分子で標識して結合体 (c o n j u g a t e) を形成させること、(b) 結合体を該培地に曝露させること、および (c) 該培地中において結合体と生体分子との間に該ポリペプチドの存在を示す結合が存在するかどうかを判定することからなる方法を教示する。

10

【0040】

本発明は、本発明のポリペプチド、または F T F 1、G L O L および M E T P からなる群から選択されるポリペプチドについて培地をスクリーニングする方法であって、(a) 本発明の抗体を該培地に曝露させること、(b) 該抗体をマーカー分子に曝露させること、および (c) 該培地中において前記マーカー分子と生体分子との間に該ポリペプチドの存在を示す結合が存在するかどうかを判定することからなる方法を教示する。

【0041】

本発明は、脂肪により制御された遺伝子またはタンパク質を特定する方法であって、(a) 動物種を選択し、それらを試験群と対照群とに分けること、(b) 試験群および対照群に脂肪非含有飼料を所定の期間与えること、(c) その後、試験群に高度に精製された多価不飽和脂肪酸を経腸的または非経口的に第2の所定の期間与えること、(d) その後、対照群および試験群から組織を摘出すること、(e) 対照群の組織由来の R N A を試験群の組織由来の R N A と比較し、試験群と対照群との間で異なるレベルで発現された R N A を選択すること、および (f) 選択された R N A に関連する遺伝子またはタンパク質を決定することからなる方法を教示する。所定の期間は少なくとも2週間であってよい。第2の所定の期間は少なくとも2週間である。比較は、ディファレンシャル・ディスプレイ法およびノーザンブロット法によって行うことができる。

20

【0042】

本発明は、M E T P、G L O L、F T F 1、A 1 B G、S C D、G P A T、G 6 P D、F A S、C O M T、A p o A - 1、I N S I G 1、S p o t - 1 4 および Δ^3 、 Δ^2 エノイル C o A イソメラーゼからなる群から選択される遺伝子の制御領域である、2つまたはそれ以上のヒトポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a) 該ヒトポリヌクレオチドと異種である、該ポリヌクレオチドを含む2つまたはそれ以上の宿主細胞を選択する工程と、(b) 宿主細胞をクローニングし、該クローンを試験群と対照群とに分ける工程と、(c) 試験群を化合物を用いて処理する工程と、(d) 試験群と対照群との間の、該ヒトポリヌクレオチドと作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法を教示する。

30

【0043】

本発明は、M E T P、G L O L、F T F 1、A 1 B G、S C D、G P A T、G 6 P D、F A S、C O M T、A p o A - 1、I N S I G 1、S p o t - 1 4 および Δ^3 、 Δ^2 エノイル C o A イソメラーゼからなる群から選択される遺伝子の制御領域である、2つまたはそれ以上のヒトポリヌクレオチドの活性を阻害または促進する化合物を特定する方法であって、(a) 該ヒトポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドと異種である2つまたはそれ以上の宿主細胞、その一部またはその単離ポリヌクレオチドを有する試験群と、対照群とを選択する工程と、(b) 試験群を化合物を用いて処理する工程と、(c) 試験群と対照群との間の、該ヒトポリヌクレオチドと作動可能なように連結されたポリヌクレオチドの発現産物の相対量を測定する工程とからなる方法を教示する。

40

【0044】

本発明は、M E T P、G L O L、F T F 1、A 1 B G、S C D、G P A T、G 6 P D、F A S、C O M T、A p o A - 1、I N S I G 1、S p o t - 1 4 および Δ^3 、 Δ^2 エノイ

50

ルC o A イソメラーゼからなる群から選択される遺伝子の2つまたはそれ以上のヒトポリヌクレオチド制御領域を調節する化合物と医薬として許容可能な担体とを含む、脂肪酸調節性遺伝子にかかわる障害を治療するための組成物を教示する。

【0045】

本発明は、脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる障害の存在または素因を検出する方法であって、対象におけるヒトSCD、G6PD、GPAT、FAS、COMT、ApoA-1、INSIG1、Spot-14、 Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼ、FTF1、GLOL、ALBGおよびMETPからなる群から選択される2つまたはそれ以上の遺伝子発現産物の発現レベルを予備測定した発現対照レベルを基準として測定することからなり、対照と比較したときの発現産物の発現の変化が脂肪酸により変化した遺伝子にかかわる障害の存在または素因を示す方法を教示する。 10

【0046】

本発明の比較または測定は、免疫ブロット法、免疫細胞化学、エライザ（enzyme-linked immunosorbent assay）、DNAフィンガープリント法、in situ ハイブリッド形成法、ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、ラジオイムノアッセイ、免疫放射線検定法および免疫酵素検定法からなる群から選択される方法により実施可能である。

【0047】

本発明の組成物は、小有機分子、ペプチド、ポリペプチド、アンチセンス分子、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、脂肪酸、本発明の抗体、ならびにそれらの機能的誘導体および化学的誘導体からなる群から選択してよい。 20

【0048】

本発明は、脂肪酸障害を治療するための本発明の組成物の使用を教示する。

障害は、PUFA障害であってよい。障害は、湿疹、心血管障害（高トリグリセリド血症、異常脂質血症、アテローム動脈硬化症、冠動脈疾患、脳血管疾患および末梢血管疾患を含むが、これらに限定されない）、炎症（副鼻腔炎、喘息、膵臓炎、骨関節症、慢性関節リウマチおよびざ瘡を含むが、これらに限定されない）、体重異常（肥満、悪液質および食欲不振を含むが、これらに限定されない）、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症からなる群から選択されてよい。

【0049】

（実施形態の詳細な説明）

ここで本発明を図面を参照しながら説明する。

脂肪酸が細胞膜および細胞内プロセスを維持するうえで重要であることは十分に立証されている。脂肪酸は、ヒトの疾患において重要であるが未だ十分には理解されていない役割を有するとも考えられている。脂肪酸の臨床的効果はそうのように定まっていないので、本発明者らは、脂肪酸がある種の疾患状態において特定の遺伝子を制御していると仮定した。現在までのところ、脂肪酸が遺伝子または遺伝子発現をどのように制御しているかについてはほとんど知られていない。

【0050】

本発明者らは、組織脂肪酸の変化を誘発するために、種々のPUFAを補給した脂肪非含有食事モデルを用いた。この食事モデルとディファレンシャル・ディスプレイ技術を用いることにより、本発明者らは脂肪酸によって制御される遺伝子を特定した。これらの特定された遺伝子の一部は新規のものであるが、一部はよく知られている。脂肪により制御を受ける（脂肪調節性）遺伝子を本発明者らが発見したことにより、ある種の疾患を脂肪酸を用いてより効果的に治療可能な理由がより十分に理解されている。したがって、本発明はヒトまたは哺乳類の脂肪酸代謝障害の治療用の化合物の開発を教示する。 40

【0051】

脂肪酸代謝を調節する薬物は、食事介入によって可能である以上に劇的な脂肪酸レベルの変化をもたらすはずである。これは、脂肪酸を薬物として用いた場合には可能でないと思われる有効な治療薬の開発を可能にする。

【0052】

(定義)

以下の例をあげた説明を、本明細書中で頻繁に使用される特定の用語の理解を容易にするために提供する。この説明は便宜的なものとして示されており、本発明を限定するものではない。

【0053】

「アゴニスト」は、他の分子の活性を増大させる薬物またはホルモンのような任意の分子または医薬作用物質を指す。

「アンタゴニスト」は、他の分子の活性を阻害または消失させる薬物またはホルモンのような任意の分子または医薬作用物質を指す。

10

【0054】

「化学的誘導体」。本明細書では、ある分子が別の分子の「化学的誘導体」であると言う場合は、その分子が通常その別の分子の一部ではない付加的で化学的な部分を有するときである。そのような部分により、分子の溶解性、吸収性、生物学的半減期などが改善される可能性がある。あるいはその部分により分子の毒性が低減され、分子の何らかの望ましくない副作用が除去または軽減されるなどの可能性がある。そのような作用をもたらし得る部分は、マックイーダブリュ (Mack E. W.)、1990年、Remington's Pharmaceutical Sciences、マックパブリッシングカンパニー社 (Mack Publishing Company)、米国ペンシルバニア州イーストン (Easton)、第13版に開示されている。そのような部分を分子に

20

【0055】

「組成物」には遺伝子、タンパク質、ポリヌクレオチド、ペプチド、化合物、薬物および薬理学的作用物質が含まれる。

「制御領域」は、遺伝子の転写の開始、終結を支援もしくは阻害、さもなければ調節することができる、またはそうするのに必要とされる核酸配列を指す。制御領域はプロモーター、エンハンサー、サイレンサーおよび／または他の調節要素を含み得る。制御領域は、単独でまたは独占的に転写を十分に開始、終結あるいは調節し得るか、またはし得ないが、他の核酸配列と協力してそのような調節に作用し得る核酸配列をも含む。

30

【0056】

「デサチュラーゼ」は、脂肪酸分子の炭化水素領域に二重結合を生成させることができる酵素である脂肪酸デサチュラーゼを指す。

本明細書における「障害」とは、構造または機能の混乱または異常を指す。障害は疾患を含む

【0057】

「薬物」。薬物にはタンパク質、ペプチド、変性ペプチド、条件設定された細胞培養液から精製された物質、有機分子、無機分子、抗体またはオリゴヌクレオチドを含むがこれらに限定されない。薬物は天然に存在してもよく、または合成的もしくは組換えにより生産可能である。

【0058】

「エンハンサー」は、特定の1つまたは複数の転写因子により結合されたときに、転写を促進または増大させるDNA調節要素からなる核酸配列である。さらに、エンハンサーは、特定の因子により結合されたとき遺伝子発現レベルの増大を誘発かつ達成するために、(プロモーターに対して上流または下流の) いずれかの方向に任意の位置で機能しうる。さらに、本発明によれば、エンハンサーは脂肪酸により制御される(脂肪酸調節性) 遺伝子の酵素活性を増大または促進し、および／または該遺伝子の転写を増大または促進する化合物(すなわち、試験化合物)も指す。

40

【0059】

「脂肪酸」は、長い飽和炭化水素鎖または1価もしくは多価不飽和炭化水素鎖と末端カルボキシル基とからなる化合物の種類である。

50

「機能的誘導体」。配列（タンパク質または核酸のいずれか）の「機能的誘導体」は、そのタンパク質配列または核酸配列の生物学的活性と本質的に類似した（機能上または構造上のいずれかの）生物学的活性を有する分子である。タンパク質の機能的誘導体は、特異的機能の発揮についての修飾の必要性に応じ、共有結合される糖質のような翻訳後修飾を含み得る。「機能的誘導体」という用語は分子の「フラグメント」、「セグメント」、「変異体」、「類縁体」、または「化学的誘導体」を含むことを意味する。

【0060】

「遺伝子」は、その配列が特定のタンパク質またはポリペプチド鎖の生産に必要な情報を含む核酸分子またはその一部を指す。ポリペプチドは、そのタンパク質の機能的活性が保持される限りはそのコード配列の全配列または任意の部分によりコードされ得る。遺伝子は、コード領域の前後の領域だけでなく個々のコードセグメント（エキソン）の間に介入する配列（イントロン）も含みうる。核酸構築物の「異種（の）」領域（すなわち、異種遺伝子）は、本来は該構築物の他の遺伝子成分に関連して認められない、より大きい核酸構築物内の識別可能なDNA部分である。したがって、異種遺伝子が哺乳類の脂肪酸調節性遺伝子をコードしているとき、該遺伝子には通常、供給源の生物体のゲノム内で構造ゲノムDNAに隣接していないプロモーターが隣接することになる。

【0061】

「宿主系」は、転写および／または転写を許容しまたは可能にする環境または条件を提供する細胞、組織、器官、生物体またはそれらの一部からなればよい。

「同一性」、「類似性」または「相同性または相同（な）」は、配列を比較することによって判定される2つ以上のポリヌクレオチド配列間の関係を指す。当技術分野では、同一性とは、状況に応じてそのような配列の文字列間の一致によって判定される、ポリヌクレオチド配列間の配列の類似性の程度も意味する。同一性と類似性はいずれも容易に計算し得る（レスク エー エム（Lesk A. M.）編、1988年、Computational Molecular Biology、オックスフォードユニバーシティプレス（Oxford University Press）、米国ニューヨーク）、スミスマーディー ダブリュ（Smith D. W.）編、1993年、Bioinformatics and Genome Project、アカデミックプレス（Academic Press）、米国ニューヨーク）、グリフィン エー エムおよびグリフィン エッチ ジー（Griffin A. M. and Griffin H. G.）編、1994年、Computer Analysis of Sequence Data, Part 1、フマナプレス（Humana Press）、米国ニュージャージー）、フォンハイネ ジー（vonHeijne G.）、1987年、Sequence Analysis in Molecular Biology、アカデミックプレス（Academic Press）、米国ニューヨーク）およびグリブスコフ エムおよびデベラウフ ジェー（Gribnikov M. and Devereux J.）編、1991年、Sequence Analysis Primer、エムストックトンプレス（M Stockton Press）、米国ニューヨーク）。2つのポリヌクレオチド配列間の同一性と類似性を測定する多くの方法が存在するが、両用語は当業者によく知られている（フォンハイネ ジー（von Heijne G.）、1987年、Sequence Analysis in Molecular Biology、アカデミックプレス（Academic Press）、米国ニューヨーク；グリブスコフ エムおよびデベラウフ ジェー（Gribnikov M. and Devereux J.）編、1991年、Sequence Analysis Primer、エムストックトンプレス（M Stockton Press）、米国ニューヨーク；およびカリロ エッチおよびリップマン ディー（Carillo H. and Lipman D.）、1988年、SLAM J. Applied Math.、第48巻、1073ページ）。配列間の同一性または類似性を測定するのに一般的に用いられている方法としては、カリロ エッチおよびリップマン ディー（Carillo H. and Lipman D.）、1988年、SLAM J. Applied Math.、第

10

20

30

40

50

48巻、1073ページに記載されている方法があるが、これに限定されない。同一性と類似性とを測定する方法は、コンピュータプログラムに組み込まれている。2つの配列間の同一性と類似性とを測定するコンピュータプログラムの方法としては、GCGプログラムパッケージ（デベラウフラ（Devereux et al.）、1984年、Nuc l. Acid Res.、第12巻、387～395ページ）、BLASTP、BLASTNおよびFASTA（アルチュールら（Altschul et al.）、1990年、J. Mol ec. Biol.、第215巻、403～410ページ）などがあるが、これらに限定されない。

【0062】

「単離（された）」は、その自然状態から「人に手により」変化した、すなわち、天然に存在するものの場合、変化した、もしくはその元の環境から除去された、またはその両方であることを意味する。例えば、その生来の状態で生きている生物体に自然に存在する天然のポリヌクレオチドは「単離されて」いないが、その生来の状態で共存する物質から分離された同じポリヌクレオチドは、この用語が本明細書において用いられているように「単離されて」いる。単離の一環として、または単離後に、そのようなポリヌクレオチドを例えば突然変異誘発のため、融合タンパク質を形成するため、また宿主内での増殖または発現のためにDNAのような他のポリヌクレオチドに結合することが可能である。単独またはベクターのような他のポリヌクレオチドに結合した単離ポリヌクレオチドは、培養中または丸ごとの生物体中の宿主細胞に導入可能である。培養中または丸ごとの生物体中の宿主細胞に導入されたとき、そのようなDNAは天然に存在する状態や環境中にはないため、この用語が本明細書で用いられているように、そのようなDNAは単離されていることになる。同様に、ポリヌクレオチドは、例えば培地製剤、ポリヌクレオチドを例えば細胞へ導入するための溶液、天然に存在しない組成物である化学反応または酵素反応の組成物または溶液のような、組成物中に存在しうるが、この場合にも単離ポリヌクレオチドは本明細書で用いられているようなこの用語の意味の範囲内にある。

10

20

【0063】

「変異」は遺伝物質中の何らかの検出可能な変化である。変異は、1つまたは複数のデオキシリボヌクレオチドの化学的もしくは生理学的構成、易変性、複製、表現型上の機能、または組換えに影響を与える何らかの検出可能で不自然な変化（またはその組合せ）でありうる；ヌクレオチドは付加され、欠失し、置換され、逆位となり、または逆位を伴ったり伴わずに新しい部位に転移されうる。変異は自然に起こり得るものであり、突然変異原の適用により、または部位特異的変異により実験的に誘発され得る。変異ポリペプチドは変異核酸分子から生じうる。

30

【0064】

「核酸構築物」は、ポリヌクレオチド配列を組み込むプラスミドまたはベクター（これらに限定されない）を含む遺伝要素を指す。例えば、核酸構築物は、異種遺伝子に作動可能のように連結されるプロモーターまたは制御領域からなるベクターであってよい。

【0065】

本明細書で用いられている「作動可能のように連結される」とは、プロモーターまたは制御領域の存在または変調がリポーター配列遺伝子などの異種遺伝子の転写に影響を及ぼすような、核酸構築物のプロモーターまたは制御領域と該異種遺伝子との連結を示す。作動可能のように連結された配列は、同じRNA転写物上で転写される2つの部分を含むこともある。したがって、プロモーターおよび「リポーター配列」のような2つの配列は、プロモーターにおいて開始する転写がリポーター配列のRNA転写物を生成させるならば、作動可能のように連結されている。

40

【0066】

「プラスミド」。本明細書で開示された開始プラスミドは、市販されているか、公的に入手可能であるか、または入手可能なプラスミドから周知の公開された手順の通常の使用により構築可能であるかのいずれかである。本発明に従って使用可能な多くのプラスミドならびにその他のクローニングベクターおよび発現ベクターは、当業者によく知られ容易に

50

使用できる。さらに、当業者は本発明における使用に適した他のプラスミドをいくらかでも容易に構築しうる。

【0067】

本発明の「ポリヌクレオチド」はmRNAのようなRNAの形態、または、例えばクローニングにより得られ、もしくは化学的合成技術かそれらの組合せにより生産されるcDNAおよびゲノムDNAなどのDNAの形態でありうる。DNAは二本鎖または一本鎖でありうる。一本鎖のポリヌクレオチドは、センス鎖としても知られるコード鎖でも、またはアンチセンス鎖とも呼ばれる非コード鎖でもよい。ポリヌクレオチドは一般に、非修飾のRNAもしくはDNA、または修飾RNAもしくはDNAでありうる、ポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを表す。従って、例えば本明細書において用いられるポリヌクレオチドは、特に、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖と二本鎖の領域または一本鎖、二本鎖および三本鎖の領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、一本鎖と二本鎖の領域の混合物であるRNA、DNAとRNAとからなり、一本鎖もしくはより一般には二本鎖もしくは三本鎖であるか、または一本鎖と二本鎖の領域の混合物であるハイブリッド分子を表す。さらに、本明細書において用いられるポリヌクレオチドは、RNAまたはDNAまたはRNAとDNAの両方からなる三本鎖の領域について言及する。そのような領域の鎖は同じ分子由来でも異なる分子由来でもよい。該領域には1つまたは複数の分子の全てが含まれうるが、より一般的にはいくつかの分子の一領域のみを意味する。三重らせん領域の分子の1つはオリゴヌクレオチドであることが多い。本明細書において用いられるように、ポリヌクレオチドという用語はDNAまたは1つもしくは複数の修飾塩基を含むDNAも含む。従って、DNAまたは安定性もしくはその他の理由で修飾された骨格を有するDNAは、本明細書中でその用語が意味するように「ポリヌクレオチド」である。さらに、DNAまたは（ちょうど2例を挙げると）イノシンのような例外的な塩基もしくはトリチル化塩基のような修飾塩基を含むDNAは、本明細書中でその用語が用いられているように「ポリヌクレオチド」である。当業者に知られた多くの有用な目的に役立つ、非常に多くの修飾がDNAおよびRNAに施されてきたことは理解されるであろう。本明細書中で用いられているように、ポリヌクレオチドという用語は、そのような化学的、酵素的または代謝的に修飾されたポリヌクレオチドの形態だけでなく、DNAの化学的形態ならびにウイルス、および単純な細胞と特に複雑な細胞などの細胞のRNAの特性も含む。ポリヌクレオチドはオリゴヌクレオチドと呼ばれることの多い短いポリヌクレオチドを含む。この二本鎖ヌクレオチド配列の転写により生じたRNAと、本発明の核酸分子のアンチセンス鎖または該核酸分子のオリゴヌクレオチドフラグメントとは、本発明の範囲内にあると考えられることも理解されるであろう。アンチセンス配列は、本発明の核酸分子の配列をその転写に関して正常な状態に対して反転することにより構築される。アンチセンス配列は開始コドンの前の領域または非保存領域を反転することにより構築されることが好ましい。アンチセンス配列は当技術分野で知られた手順を用いて化学合成および酵素的連結反応により構築可能である。

【0068】

「プロモーター」は、下流（3'方向）の遺伝子の転写を開始するためにRNAポリメラーゼを直接または間接的に結合することが可能なDNA調節要素からなる核酸配列を指す。本発明によれば、プロモーターの誘導が異種遺伝子の転写に影響を及ぼすように異種遺伝子に連結されうるヌクレオチド配列を含む、核酸構築物のプロモーターである。

【0069】

「精製（された）」。「精製された」タンパク質または核酸とは、組換えにより生産されたか、化学的に合成されたか、天然の供給源から精製されたかのいずれかの、一般に夾雑物を含まないタンパク質または核酸の調製物である。

【0070】

「組換え」は、組換えDNA技術により生成され、天然に存在する核酸配列とは異なる再結合された核酸配列、遺伝子もしくはそれらの断片（フラグメント）、またはそれらの新たな組合せを指す。

10

20

30

40

50

【0071】

「調節要素」は、異種遺伝子などの連結された1つまたは複数の遺伝子の発現を転写を介して調節するために、活性化転写調節タンパク質または1つもしくは複数の活性化転写調節タンパク質からなる複合体が結合する核酸配列の全体または一部からなるデオキシリボヌクレオチド配列を指す。

【0072】

「リポーター遺伝子」は、その産物が、宿主細胞または宿主系により他の状況では生産されないか、あるいは宿主細胞または宿主系において最小限または無視し得る量で生産され、宿主細胞または宿主系における転写活性のレベルを分析するためにリポーター遺伝子産物を定量的に測定できる様々な既知の方法により検出可能なポリペプチドまたはタンパク質である、核酸コード配列である。例としては、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、 β -ガラクトシダーゼ、分泌性胎盤アルカリホスファターゼおよび他の分泌性酵素の遺伝子などがある。

10

【0073】

「サイレンサー」は、標的遺伝子の制御領域内のサイレンサー配列の存在が、プロモーターにおける標的遺伝子の転写を、別個のDNAセグメントとしてのその作用により、あるいは、これらの遺伝要素に結合し、その結果標的遺伝子の発現に対して負の制御をもたらすトランス作用因子の作用により抑制するようなDNA制御領域の核酸配列または部分を指す。

【0074】

「ストリンジェントなハイブリッド形成条件」は、特異性を与えるために十分に厳密で、ミスマッチの数を低減し、許容できる速度で安定なハイブリッドの形成を可能にするために十分に融通の利く条件である。そのような条件は当業者に知られ、例えばサムブルックら (Sambrook et al.)、1989年、Molecular Cloning、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、米国ニューヨーク州コールドスプリングハーバー (Cold Spring Harbor)、またはオスベルら (Ausubel et al.)、1994年、Current Protocols in Molecular Biology、ジョン・ワイリーアンドサンズ (John Wiley & Sons)、ニューヨーク、に記載されている。単なる例として、短いヌクレオチドを用いたストリンジェントなハイブリッド形成は、0.01~0.1 pmol/mlのような高濃度のプローブを用いて T_M より5~10℃低い温度で実施することができる。「ストリンジェントな条件」という用語は、配列間に少なくとも95%、好ましくは97%の同一性が存在する場合に限りハイブリッド形成が起こることを意味することが好ましい。

20

30

【0075】

「タグ」は、例えば、市販の抗体により認識されるc-mycエピトープおよび/または6ヒスチジン残基の列を構成またはコードする、特定の短いアミノ酸配列またはそれをコードするオリゴヌクレオチド配列を指す。実際には、タグはタグ付きタンパク質のその後の識別および精製を容易にする。

40

【0076】

本明細書で用いている「タグ付きタンパク質」は、連結されたタグ配列を備えるタンパク質を指す。例えば、タグ付きタンパク質には、そのアミノ酸配列のカルボキシル末端でc-mycエピトープと6ヒスチジン残基とに連結された哺乳類の脂肪酸調節性ポリペプチドがある。

【0077】

本明細書で用いている「試験化合物」は、小分子 (例えば、小有機分子)、薬理化合物または薬理作用物質、ペプチド、タンパク質、抗体または抗体フラグメント、ならびにDNA配列およびRNA配列などの核酸配列を含む。

【0078】

50

「トランスフェクション」は、外来または異種のDNA（すなわち核酸構築物）がレシピエントの真核宿主細胞に導入される過程を指す。したがって、真核細胞においては、宿主細胞に外来DNAが獲得されることをトランスフェクションと称する。原核細胞および真核細胞（例えば、酵母および哺乳類細胞）において、導入されたDNAはプラスミドのような染色体外因子上に維持されるか、宿主ゲノムに組み込まれる可能性がある。真核細胞に関しては、安定にトランスフェクションされた細胞とは、導入されたDNAが染色体に組み込まれ、その結果、それが染色体複製により娘細胞に引き継がれる細胞である。この安定性は、導入DNAを含んだ娘細胞集団からなる細胞株または細胞クローンを、その真核細胞が樹立できることによって示される。

【0079】

「形質転換」は、外来または異種のDNA（すなわち核酸構築物）がレシピエントの原核宿主細胞に導入される過程を指す。したがって、原核細胞においては、宿主細胞に外来DNAが獲得されることを形質転換と称する。真核細胞における形質転換は、腫瘍化状態と類似した、真核細胞の培養中の無制限増殖状態への変化または形質転換を指す。原核細胞および真核細胞（例えば、酵母および哺乳類細胞）において、導入されたDNAはプラスミドのような染色体外因子上に維持されるか、宿主ゲノムに組み込まれる。原核細胞に関しては、安定に形質転換された細菌細胞とは、導入されたDNAが染色体に組み込まれ、その結果、それが染色体複製により娘細胞に引き継がれるものである。この安定性は、導入DNAを含んだ娘細胞集団からなる細胞株または細胞クローンを、その原核細胞が樹立できることによって示される。

【0080】

本明細書で用いている「トランスフェクション／形質転換」は、外来または異種のDNA（すなわち核酸構築物）が真核もしくは原核宿主細胞または宿主系に導入された過程を指す。

【0081】

ポリヌクレオチドの「変異体」は、他の基準となるポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なるポリヌクレオチドである。タンパク質または核酸の「変異体」は、そのタンパク質または核酸と構造および生物学的活性が実質的に同様な分子を指すことを意味する。したがって、2つの分子が共通の活性を有し、互いに置換し得るならば、一方の分子の組成や2次、3次または4次構造が他方の分子に認められるものと同一でないとしても、あるいはアミノ酸またはヌクレオチド配列が同一でないとしても、それらは、その用語が本明細書において用いられているとおりに変異体とみなされる。一般的に、その差異は限定されており、その結果基準の分子と変異体のヌクレオチド配列が全体的に非常に類似しており、かつ多くの領域において同一である。変異体のヌクレオチド配列の変化はサイレント変異であってもよい。すなわち、その変化は該ポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸を変化させなくてもよい。変化がこの種のサイレントな変化に限られる場合、変異体は基準の分子と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをコードすることになる。変異体のヌクレオチド配列の変化は、基準のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させることがある。そのようなヌクレオチドの変化は、基準の配列によりコードされるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにおけるアミノ酸の置換、付加、欠失、融合および切断をもたらすことがある。

【0082】

「ベクター」。クローニングするためにDNAを挿入することが可能なプラスミドもしくはファージDNAまたは他のDNA配列。ベクターは、宿主細胞内で自律的に複製することが可能であり、そのようなDNA配列を特定できる方法で切断可能な部位であって、かつそこにDNAを挿入し得る1つまたは少数のエンドヌクレアーゼ認識部位によってさらに特徴づけることが可能である。ベクターはさらに、ベクターで形質転換された細胞の識別における使用に適したマーカーを含めることが可能である。マーカーは、例えば、テトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性である。「クローニングベクター」という語が時には「ベクター」の代わりに使用される。

10

20

30

40

50

【0083】

前述のように、本発明者らは脂肪酸代謝に関連する遺伝子およびそれらのプロモーターをコードする、本明細書で「対象ポリヌクレオチド」と称する種々のDNA配列を特定し、配列を決定した。対象ポリヌクレオチドから産生または発現されるペプチドおよびポリペプチドを、本明細書では「対象ポリペプチド」と称する。

【0084】

本発明が対象ポリヌクレオチドまたは対象ポリペプチドとそれぞれ実質的な配列相同性を有するヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を含むことは理解できよう。「実質的な配列相同性を有する配列」という用語は、対象ポリヌクレオチドに対してわずかな、または重要でない配列上の変化を有するヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を意味する；すなわち、相同性配列は、実際の配列と実質的に同様に機能して実際の配列と実質的に同じポリペプチドを生産する。変化は、局所的な突然変異または構造上の変化に起因する可能性がある。本発明のDNA配列と85～90%の配列相同性を有する配列は、対象ポリヌクレオチドによりコードされるポリヌクレオチドと実質的に同じ生物学的機能または活性を保持する機能的な対象ポリペプチドを提供すると予想される。本発明のさらなる実施形態は、対象ポリヌクレオチドと全長にわたり少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド、およびそのようなポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドである。他の実施形態は、対象ポリヌクレオチドと全長にわたり少なくとも80%同一な領域を含むポリヌクレオチド、およびそのポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドである。これは、対象ポリヌクレオチドと全長にわたり少なくとも90%同一なポリヌクレオチドを含み、かつ少なくとも95%の相同性を有するポリヌクレオチドがこれらの実施形態に含まれる。さらに、少なくとも95%の相同性を有するもののうち、少なくとも97%を有するものは非常に好ましく、また、それらの中で少なくとも98%および少なくとも99%を有するものは特に非常に好ましく、少なくとも99%を有するものはより好ましい。

【0085】

(PUFAを補給した飼料を与えたラットの肝臓におけるディファレンシャルな(差次的)遺伝子発現)

本発明者らは、ディファレンシャル・ディスプレイ法(リアング ピーおよびパーディー エー ビー(Liang P. and Pardue A. B.)、1992年、Science、第257巻、967～971ページ)を用いて食事中的脂肪により調節または制御される遺伝子を特定した。雌のウィスター(Wistar)ラットの群に脂肪を含まない飼料を2週間与えた。2週間後に、1群(対照)を除くすべての群にさらに2週間にわたり高度に精製されたPUFAを補給した。ラットを屠殺し、組織を摘出して、ディファレンシャル・ディスプレイ法およびノーザンブロット法用のRNAを得た。ディファレンシャル・ディスプレイ法では、ラット肝から得られたmRNA集団を比較することにより、食事中的脂肪により制御された遺伝子が特定された。

【0086】

試験のために、ラットを6群に分け、脂肪を含まない飼料を14日間与えた。さらに2週間、各群に脂肪を含まない飼料を次の補給物とともに与えた。すなわち、第1群には補給物を与えず(脂肪非含有対照)、第2群にはリノール酸(LA、18:2n-6)、第3群にはγ-リノレン酸(GLA、18:3n-6)、第4群にはα-リノレン酸(ALA、18:3n-3)、第5群にはエイコサペンタエン酸(EPA、20:5n-3)、第6群にはドコサヘキサエン酸(DHA、22:6n-3)を与えた。脂肪酸は、実施例1に記載のように、5重量%の脂肪酸固有の濃度で飼料に加えて投与した。ラットに自由摂取させた。

【0087】

このディファレンシャル・ディスプレイ実験に用いたプロトコールは、Clontech Delta(登録商標) Differential Display Kit(クロンテック(Clontech)カタログ番号K1810-1)に基づき、かつ厳密に準拠したものである。各プライマーの組合せを各投与群の3匹のラット由来の逆転写cDNAと

ともに用い、すべての実験を独立して2回ずつ行った。

【0088】

発明者らの予備的なディファレンシャル・ディスプレイ試験では、対照群とLA投与群との間に差は示されなかった。これらの前試験および他の技術的理由から、本発明者らは、完全なディファレンシャル・ディスプレイ・スクリーニングに第1群（補給物なし、脂肪非含有対照）、第3群（GLA）および第6群（DHA）を選択した。

【0089】

ラット肝cDNAを、10種の任意のPプライマーと9種のアンカーTプライマーとの90種の組合せ、ならびにPプライマーのみの55種の組合せを用いて増幅した。対照、GLA、DHA試料を、各プライマー対ごとに3つずつ、合計9つ調製した。一般的に、5つのプライマー対についての反応を同時に行った。これらの試料をポリアクリルアミドゲル上で一緒に泳動した。実験を繰り返し、結果を検証した。合計2610の個別反応を行い、分析した。両実験で差次的に発現したバンドのみをさらに解析した。

10

【0090】

（結果）

ディファレンシャル・ディスプレイ・ゲルの検査から、少なくとも2回の独立した実験で差次的に発現したと思われる144個のバンドが明らかにされた。各実験には、飼料群1、3および6の各々から3匹のラットを用いた。PプライマーおよびTプライマーのPCR産物である合計84個の特有なバンドと、増幅反応物に存在する2つのプライマーのうちの1つだけを用いた増幅反応から明らかに生じたさらに60個の複製バンドが特定された。144個の差次的に表示されたヒットのうちの100個を、TAクローニング法を用いてpCRII（インビトロゲン（Invitrogen））にクローニングし、ノーザンブロット分析に用いた。100クローンのノーザンブロットから、61クローンが差次的に発現し、39クローンがそうでないことが確認された。ノーザンブロットメンブレンには、対照、LA投与、GLA投与、EPA投与およびDHA投与動物群から分離されたラット肝RNAを含めた。

20

【0091】

ノーザンブロットにおいて61の陽性と確認されたクローンのその後の配列決定から、14種の遺伝子に属する28の特有なDNA配列が特定された。これらの遺伝子のうちの11遺伝子のmRNAレベルは脂肪を含まない条件下でより高く、PUFAを与えたときに低減されるのに対して、これらの遺伝子のうちの3遺伝子のmRNAレベルは脂肪を含まない条件下でPUFA補給時と比較してより低い。これらの14遺伝子を表1および2に示す。

30

【0092】

（発見された遺伝子）

I. METP遺伝子およびポリペプチド

試験において特定された差次的に発現したバンドのうちの1つは、METP（mitochondrial energy transfer protein）と呼ばれる、特性の解析が行われていない未知のミトコンドリア担体タンパク質遺伝子に属することが確認されたラット部分cDNAクローンであった。GeneTrapper（登録商標）技術（Gibco BRL）を用いて、ラットMETP遺伝子をクローニングした。全長コード配列（CDS）をDNA塩基配列決定により決定した（図1）。

40

【0093】

生物情報学的手法を用いて、そのヒト遺伝子を、第14染色体のゲノムDNAのフラグメントに関するGenBankのHTGSデータベース内に発見した（GenBank登録番号AL135838）。オリゴヌクレオチドプライマーを合成し、提示されたヒト遺伝子配列をクローニングおよびDNA配列決定により立証した（図2）。エキソンをAL135838のゲノムDNA上にマッピングしたところ、遺伝子は6個のコーディングエキソンを含むことが見いだされた。

【0094】

50

生物情報学的手法を用いてヒトMETP遺伝子の制御領域を特定し、地図を作製した。ATGから位置-1~-1500の制御領域を図6に示す。

ヒトおよびラットのこの遺伝子を比較したところ、アミノ酸配列レベルで87%同一（89%陽性）であることが見いだされた（図3）。

【0095】

ヒトおよびラットのこのタンパク質は、ミトコンドリアエネルギー輸送（担体）タンパク質ファミリーに属し、このタンパク質ファミリーに特有の3つのシグネチャ・モチーフ（signature motif）を含むことが見いだされた。図4に、ヒトミトコンドリアエネルギー輸送タンパク質遺伝子ファミリーの4メンバー、METP、MCAT（ミトコンドリアカルニチン／アシルカルニチントランスロケース；GenBank登録番号NP_000378）、TXTP（トリカルボキシレート輸送タンパク質；GenBank登録番号P53007）およびUCP2（ミトコンドリア脱共役タンパク質2；GenBank登録番号NP_003346）の間の多重アライメントを、このタンパク質ファミリーのPROSITEシグネチャ・モチーフPS00215を囲い枠内に強調して示す。ヒトタンパク質におけるこれらのモチーフは、アミノ酸位置19~28、115~124および237~246（図4の枠で囲った部分）に位置する。モチーフの共通パターンは、P-x-[DE]-x-[LIVAT]-[RK]-x-[LRH]-[LIVMFY]-[QGAI VM]（PrositeパターンPS00215）である。

10

【0096】

METPとミトコンドリア担体タンパク質ファミリーの密接に関連したヒトタンパク質との間の関係を示す多重配列アライメントを図4に示す。

20

ラットおよびヒトのMETPタンパク質は、このファミリーのタンパク質を表す3部分ドメイン構造を有する。タンパク質配列のドットマトリックス解析のグラフィックを作製した（データは示さず）。内部が類似しているドメインのそれぞれが2つのトランスメンブラン領域と短いループとを含んでいる。これは、厳しいカットオフ値に到達した6つのピークが予測されるトランスメンブラン領域である、ヒト遺伝子に関する図5に示すDense Alignment Surface (DAS) 予測（セルゾら（Cserzo et al.）、1997年、Prot. Eng.、第10巻、673~676ページ）の結果から明らかである。

【0097】

ラット部分cDNAクローンをノーザンブロット法のプローブとして用いることにより、ラット肝におけるこの遺伝子のmRNAの相対存在量がPUFA投与後に劇的に増加することが示された（表1および2）。

30

【0098】

ヒトおよびラットにおける組織分布を評価するノーザンブロット試験（実施例37を参照）により、METP転写物が肝臓のみで検出されることが示された。

これらの所見は、METPが多価不飽和脂肪酸によって制御される肝臓特異的ミトコンドリア担体タンパク質であることを確認するものである。本発明者らのデータは、STZ誘発性糖尿病ラットではmRNA存在量が増加することを示唆している。したがって、本発明は、新規の薬物標的すなわちMETPについて、その遺伝子発現またはその遺伝子産物の活性を調節する新規な薬物または化学物質をスクリーニングするための該遺伝子ならびにプロモーターの使用を含めて記述するものである。

40

【0099】

II. GLOL遺伝子およびポリペプチド

試験において特定された差次的に発現した他のバンドは、機能未知のヒト遺伝子と非常に類似したラットの部分cDNAクローンであった。このヒト遺伝子は、GenBank登録番号D83198およびNM_014297において「甲状腺において発現されるmRNA」とされている。このヒト遺伝子配列のCDSはGenBankに提出されているが、それに関する現存刊行物は存在しない。

【0100】

50

GenBankのEST部門(d i v i s i o n)をBLASTNを用いて検索して、遺伝子の5'末端を含むげっ歯類の配列を特定した。そのような特定された1つのマウスのEST(GenBank登録番号AW106717)からデザインしたフォワード・プライマーとクローニングしたラットの部分cDNAからデザインしたリバーズ・プライマーとを用いて、ラットGLOL(グリオキサラーゼII様(g l y o x a l a s e II-l i k e))遺伝子の全長コード配列(CDS)を決定した。配列を図7に示す。

【0101】

GenBankにおけるそのヒト配列は、PCRクローニング(D83198からデザインしたプライマーを用いた)およびDNA配列決定により立証された(図8)。

【0102】

生物情報学的手法を用いて、そのヒト遺伝子をGenBankの第19染色体に帰属する配列上のHTGS部門内に発見した(GenBank登録番号AC068785)。エキソンをこのゲノムDNAにマップしたところ、遺伝子は6個のコーディングエキソンを含むことが見いだされた。

【0103】

生物情報学的手法を用いて、ヒトGLOLの制御領域を特定し、地図を作製した。ヒトGLOL CDSを用いてBLASTNによりGenBankのEST部門を検索することにより、該遺伝子の5'UTRを含むヒトESTの集合を特定した。この実験から、長さ437bpの上流イントロンの存在が明らかにされた。本発明者らの結果は、このイントロンの末端が誤って5'UTRと同定されているGenBank登録番号D83198に記載されているものと異なっている。本発明者らは、部位-905から上流側の高度に反復する要素を含む領域をさらに特定した。ATGから部位-438および部位-905の間の制御領域が特定された。これを図13に示す。

【0104】

ラットおよびヒト遺伝子に対するアミノ酸配列を比較したところ、92%同一または95%類似であることが見いだされた(図9)。

本発明者らは、GLOLをタンパク質のメタロβ-ラクタマーゼスーパーファミリーのメンバーであると決定した。該タンパク質は、2つのドメインによって構成されている。ドメイン1は残基1~168からなっていて、他のメタロβ-ラクタマーゼとの相同性を有しており、一方、ドメイン2は残基169~227からなっている。β-ラクタマーゼのほかに、他の多くのタンパク質がこのファミリーに属している。これらのタンパク質には、S-D-ラクトイルグルタチオンの加水分解を触媒しグルタチオンとD-乳酸を生成するグリオキサラーゼIIファミリーのメンバーであるチオールエステラーゼおよび*Neisseria gonorrhoeae*における自然形質転換に必須であり、DNA取込みに関与する輸送体であると思われるコンピテンス(*competence*)タンパク質が含まれる。コンピテンスタンパク質を除き、これらのタンパク質は補因子として1分子当たり2つの亜鉛イオンと結合する。

【0105】

GLOLのモデル化の基礎となりうる構造を特定するために、BLASTPを用いてProtein Data Bankの3次元構造データベースについてヒト遺伝子を検索した。PDBのIDコード登録1QH5(S-[N-ヒドロキシ-N-ブロモフェニルカルバモイル]グルタチオンを含むヒトグリオキサラーゼII)および1QH3(活性部位に存在するカコジル酸および酢酸イオンを含むヒトグリオキサラーゼII)は、1次配列に基づいて、有効なモデル化を保証するに十分類似していることが示された(GLOL配列中の175アミノ酸残基にわたって25%同一、43%類似)。ヒトグリオキサラーゼIIの3次元表示を図11に示す。

【0106】

GLOLのモデルはドメイン1(GLOLの1~168残基)に関するものである。GLOLの3次元表示を図12に示す。下記のヒトグリオキサラーゼII(GenBank登録番号NP_005317)における金属配位に関与する主要なアミノ酸残基の7つすべ

10

20

30

40

50

てが1次構造においてGLOL中で完全に保存されており（図10）、3次構造空間において高度に保存されている。

【表1】

グリオキサラーゼII中の残基	GLOL中の残基
H54	H52
H56	H54
D58	D56
H59	H57
H110	H108
D134	D127
H173	H168

10

【0107】

グリオキサラーゼIIへのグルタチオンの結合または活性部位の形成に關与する他の重要な残基（キャメロンら（Cameron et al.）、1999年、Structure Fold. Des. 第7巻、1067～1078ページ）を、これらの残基がGLOL中で類似残基とどのように關聯しているかということとともに以下に示す。

20

【表2】

グリオキサラーゼII中の残基	GLOL中の残基
D29	D25
T53	T51
T111	T109
G133	G126
C141	C134
K143	R136
E174	D169
Y175	Y170

30

【0108】

これらのモデルにより、GLOLの触媒活性について重要な確認がなされ、活性部位において重要な残基が示される。

【0109】

ラットの部分cDNAクローンをノーザンブロット法のプローブとして用いた場合、ラット肝におけるGLOL遺伝子のmRNAの相対的存在量はPUFA投与後に劇的に減少した（表1および2）。

40

【0110】

ラットにおける組織分布を評価するノーザンブロット試験で、GLOL転写物が検査したすべての組織で発現していて、肝臓および腎臓において高レベルであることが示された。ヒトにおける同様な試験においても遍在的な発現が示され、肝臓、腎臓及び骨格筋において高レベルで、結腸において最も高いレベルであった。

【0111】

これらの所見から、GLOLが多価不飽和脂肪酸により制御される遍在的に発現するグリ

50

オキサラーゼ I I 様タンパク質であることが確認される。したがって、本発明は、新規な薬物標的すなわち G L O L について、その遺伝子発現または遺伝子産物の活性を調節する新規な薬物または化学物質をスクリーニングするために該遺伝子ならびにそのプロモーターを使用することを含めて記述している。

【0112】

I I I . F T F 1 遺伝子およびポリペプチド

試験において特定された差次的に発現される別のバンドは、マウス O A S I S 遺伝子とオルソログスであるラットの部分 c D N A クローンであった。c D N A 末端の 5 ' 迅速増幅 (R A C E) を用いて、ラットの F T F 1 (脂肪応答性転写因子 1 (f a t r e s p o n s i v e t r a n s c r i p t i o n f a c t o r 1)) 遺伝子の 5 ' 末端をクローニングし、全長コード配列 (C D S) を D N A 配列決定により決定した (図 1 4) 。 10

【0113】

ホンマら (H o n m a e t a l .) (1 9 9 9 年、M o l . B r a i n R e s . 第 6 9 巻、9 3 ~ 1 0 3 ページ) は、マウス O A S I S 遺伝子 (o l d - a s t r o c y t e s p e c i f i c a l l y - i n d u c e d s u b s t a n c e) を特定し、特徴付けを行った。彼らはこの遺伝子が C R E B / A T F 遺伝子ファミリーに属する転写因子をコードすることを示し、また、ロイシンジッパーモチーフおよび塩基性の D N A 結合ドメインを含むことを示している。これらの研究者らは、該遺伝子の発現がマウス脳の寒冷傷害時に誘導されることを示した。彼らは、この転写因子と P U F A または糖尿病との関連は何も示さなかった。 20

【0114】

ヒト遺伝子は、T B L A S T N を用いたマウス O A S I S アミノ酸配列、および B L A S T N を用いたマウス O A S I S の c D N A 配列を用いて G e n B a n k の H T G S データベースを検索することにより特定された。エキソンを、標準的な生物情報学的手法を用いてゲノム D N A のこの配列 (G e n B a n k 登録番号 A C 0 0 9 6 4 7) 上にマップしたところ、遺伝子が 1 2 エキソンから構成されていることが確認された。G e n B a n k の H T G S データベースから得られた h F T F 1 の配列を用いてデザインされたプライマーを用いてヒト遺伝子をクローニングし、全長 C D S を配列決定した (図 1 5) 。

【0115】

本発明者らは、生物情報学的手法を用いて、ヒト F T F 1 遺伝子の制御領域を特定し、地図図を作製した。G e n B a n k の E S T 部門を検索することにより、この遺伝子の 5 ' U T R を含むヒト E S T の集合を特定し、部位 - 8 8 3 から上流側の高度に反復する要素を含む領域を特定した。A T G からの部位 - 1 ~ - 8 8 3 の制御領域を図 1 9 に示す。 30

【0116】

ヒトおよびラットの F T F 1 遺伝子ならびにマウス O A S I S 遺伝子の間の類似性を示す多重配列アライメントを図 1 6 に示す。ヒトおよびラットの F T F 1 遺伝子は、9 1 % 同一または 9 3 % 類似である。ヒトおよびマウスの遺伝子は 9 0 % 同一であり、一方、ラットおよびマウスの遺伝子は 9 5 % 同一である。

【0117】

F T F 1 のモデル化の基礎となりうる構造を特定するために、B L A S T P を用いて 3 次元構造を含む G e n B a n k の P D B データベースを検索した。転写因子 c - j u n (P D B I D コード : 1 F O S 、 c - f o s と 2 量体化し、D N A と複合体化した c - j u n 癌原遺伝子 (プロトオンコジーン) [転写因子 a p - 1]) の構造の一部が鋳型構造として特定された (図 1 7) 。 F T F 1 は、4 3 アミノ酸の配列について c - j u n と 3 7 % 同一であった。 40

【0118】

比較モデル化を用いて、位置 2 9 5 ~ 3 3 7 のアミノ酸残基を c - j u n の構造上にモデル化した。これは、塩基性 D N A 結合領域ならびにロイシン・ジッパー・モチーフに対応している (図 1 8) 。

【0119】

ヒト F T F 1 遺伝子は、P R O S I T E により推定されるように「b Z I P 転写因子塩基性ドメイン・シグネチャ」（アミノ酸 2 9 5 ～ 3 1 0）および「ロイシンジッパーパターン」モチーフ（アミノ酸 3 3 2 ～ 3 5 3）を含む。これらのモチーフは、超らせん（c o i l e d c o i l）予測領域（アミノ酸 2 8 5 ～ 3 5 9）内に位置する。3 次元モデル化領域は、b Z I P 塩基性ドメイン・シグネチャおよび C 末端に向かうロイシン・ジッパーの始まりの N 末端を含んでいる。

【0 1 2 0】

残基 2 8 5 ～ 3 5 9 は、C O I L S v 2 . 1 ソフトウェア（ルパスら（L u p a s e t a l . ）、1 9 9 1 年、S c i e n c e、第 2 5 2 巻、1 1 6 2 ～ 1 1 6 4 ページ）を用いて、超らせん構造を形成するのに非常に有利なアミノ酸配列を含むものとして高い 10
確実性をもってマップされた。この超らせん構造は、図 1 8 に示す 3 次元モデルで認めることが可能である。

【0 1 2 1】

ラットの部分 c D N A クローンをノーザンブロットティングのプローブとして用いた場合、ラット肝における F T F 1 遺伝子の m R N A の相対的存在量は P U F A 投与後に劇的に減少していた（表 1 および 2）。

【0 1 2 2】

ラットにおける組織分布を評価するノーザンブロット試験により、F T F 1 転写物が検査したすべての組織において発現し、脂肪、卵巣および神経におけるレベルが最高であることが示された。ヒトにおける同様な試験から、結腸、胎盤、肺、小腸および心臓における 20
発現のレベルが高いことが示された。

【0 1 2 3】

これらの所見から、F T F 1 が多価不飽和脂肪酸により制御される広範に発現する転写因子であることが確認される。したがって、本発明は、新規な薬物標的すなわち F T F 1 について、脂肪調節性の転写因子の発現を調節する新規な薬物または化学物質をスクリーニングするために該遺伝子を使用することおよび／またはそのプロモーターを使用することを含めて記述している。

【0 1 2 4】

I V . A 1 B G 遺伝子およびポリペプチド

試験において特定された他の差次的に発現するバンドは、ヒト α -1 b 糖タンパク質（A 1 B G）と非常に類似したラットの部分 c D N A クローンであった。c D N A 末端の 5 ' 迅速増幅（R A C E）を用いて、ラット A 1 B G の 5 ' 末端をクローニングし、全長コード配列（C D S）を D N A 配列決定により決定した（図 2 0）。 30

【0 1 2 5】

成熟ヒト A 1 B G タンパク質（4 7 4 アミノ酸残基）は、以前に精製され、該タンパク質のアミノ酸配列は通常のタンパク質配列決定により決定された（イシオカラ（I s h i o k a e t a l . ）、1 9 8 6 年、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 第 8 3 巻、2 3 6 3 ～ 2 3 6 7 ページ）が、遺伝子のクローニングも特徴付けも行われていない。

【0 1 2 6】

A 1 B G の配列決定されたタンパク質は、メチオニンでは始まらなかった。A 1 B G は血漿タンパク質であるので、未熟なタンパク質は分泌経路のためのシグナル配列を含むはずであると仮定した。G e n B a n k の E S T 部門（d b e s t）におけるヒトタンパク質配列を用いた T B L A S T N クエリにより、本発明者らは、転写物の始めの部分にエキソンの欠損を含む、A 1 B G 遺伝子の 5 ' 末端のヒト E S T（W 2 5 0 9 9）を発見した。この E S T から遺伝子の 5 ' 末端の知見を拡大し、エキソン 1 の 5 ' U T R の 1 5 ヌクレオチドおよびエキソン 2 の大部分を含めた（下記を参照）。 40

【0 1 2 7】

生物情報学的手法を用いて、ヒト A 1 B G 遺伝子を、ヒトタンパク質配列を用いた T B L A S T N クエリにより第 1 9 染色体のゲノム D N A のフラグメント上に、G e n B a n k H T G S データベース内に見出した（G e n B a n k 登録番号 A C 0 1 2 3 1 3）。エ 50

キソンをこの配列上にマップしたところ、遺伝子は8エキソンから構成されることが示された。オリゴヌクレオチドプライマーを合成し、ヒト遺伝子配列をクローニングおよびDNA配列決定により立証した。ヒトA1BG遺伝子配列を図21に示す。

【0128】

この新規に発見されたN末端のアミノ酸配列は、成熟タンパク質のN末端を生成させる予測切断部位を備えた古典的シグナル配列に十分に適合する21残基を含む。ニューラル・ネットワークおよび隠れマルコフ・モデルはいずれも高い確率で同じ切断部位を予測した（ヘンリクラ（Henrik et al.）、1997年、Prot. Eng. 第10巻、1～6ページ）。したがって、未熟なタンパク質は、以前に報告された474残基でなく495アミノ酸残基を含む。

10

【0129】

本発明者らは、生物学的情報手法を用いて、ヒトA1BG遺伝子の制御領域を特定し、地図を作製した。先に示したように、本発明者らは15bpの5'UTRを含むヒトEST（GenBank登録番号W25099）を特定した。GenBankのEST部門を検索することにより、本発明者らはさらに部位-430から上流側の転写において活性な領域を特定した。ATGからの部位-1～-430の制御領域を図25に示す。

【0130】

ラットおよびヒトのA1BGを比較したところ、アミノ酸配列レベルで44%同一または55%類似であることが見いだされた（図22）。

A1BGは、免疫グロブリンドメインおよび主要組織適合性複合体（MHC）ドメインのシグネチャ・モチーフを含むタンパク質の免疫グロブリンスーパーファミリーに属している。A1BGは、5つの部分のドメイン構造を示す。各ドメインはジスルフィド架橋を含む。ヒトタンパク質は、配列全体を通して4つのアスパラギンがグリコシル化されており、グルコサミン結合部位を含む。

20

【0131】

有効なモデル化を行うのに十分に類似した既知の構造を有するタンパク質を特定するため、ヒトA1BGをpdbデータベースに対して検索した。多数のナチュラルキラー（NK）細胞阻止受容体（KIR）構造が優れた候補として特定された。KIR2DL2を比較モデル化の適切な構造として選択した（PDB IDコード：2DL1ーキラー免疫グロブリン受容体2d12、三角型）。図23を参照のこと。

30

【0132】

NK細胞は、自己と非自己とを識別する（これにより適切な標的細胞に対してのみNKに仲介される溶解作用が誘導される）と同時に、特定の病原体に感染した細胞または腫瘍細胞に対してその細胞溶解性の殺傷作用を発動させる。自己認識を達成する1つの機序は、細胞表面の阻止受容体による制御によるものである。これらの受容体は標的細胞表面上に発現されたクラスI MHC分子と相互作用することができ、異常細胞はクラスI主要組織適合性複合体分子が欠損している。

【0133】

図24に示すように、KIR2DL2の細胞外MHCクラスI結合部分が2つのドメインのみからなっているということから、A1BGの最後の2つのドメインをこの鋳型構造を用いてモデル化した。

40

【0134】

フクロネズミ（キャタニーズ ジェー ジェーおよびクレス エル エフ（Catanesse J. J. and Kress L. F.）、1992年、Biochemistry、第31巻、410～418ページ）およびマングース（キーら（Qiet al.）、1994年、Toxicon、第32巻、1459～1469ページおよびキーら（Qiet al.）、1995年、Toxicon、第33巻、241～245ページ）由来の抗出血性因子の部分的アミノ酸配列決定から、A1BGとの高度な類似性が示されている。これらは、マングースの血漿糖タンパク質AHF1/AHF2（ヘビ毒メタロプロテイナーゼに対する抗出血性因子）およびフクロネズミの血漿糖タンパク質オプリン

50

(ヘビ毒メタロプロテイナーゼに対して活性なプロテイナーゼ阻害物質)である。A H F 1 / A H F 2 の既知の配列が A 1 B G と約 5 0 % 同一であり、オプリンの既知の配列が約 3 5 % 同一であることは、これらのタンパク質が実際にヒト A 1 B G に対するオーソログであることを強く示唆している。しかし、ヒト A 1 B G は抗出血活性を有さないことが報告されていることに注意すべきである (イシオカら (I s h i o k a e t a l .)、1 9 8 6 年、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 第 8 3 巻、2 3 6 3 ~ 2 3 6 7 ページ)。

【0135】

本発明者らのデータは、A 1 B G に関する他の報告および刊行物と一致するが、他の研究者らはこのタンパク質の役割を特定していない。本発明者らは、 α -1 b 糖タンパク質が、免疫系機能の制御に重要であるナチュラルキラー細胞阻止受容体構造と類似していることを認めている。

10

【0136】

ラットの部分 c D N A クローンをノーザンブロットティングのプローブとして用いて評価した場合、ラット肝における A 1 B G 遺伝子の m R N A の相対的存在量は P U F A 補給後に増加していた (表 1 および 2 参照)。A 1 B G の m R N A の発現の増加は脂肪酸を補給した個体間でかなり異なっており、D H A 投与群に最高の発現が認められた。

【0137】

ヒトおよびラットにおける組織分布を評価するノーザンブロット試験により、A 1 B G 転写物が高度に肝臓特異的であることが示された。

20

これらの所見から、A 1 B G が肝臓により産生される血漿タンパク質であり、多価不飽和脂肪酸により制御されることが確認される。本発明者らのデータは、S T Z 誘発性糖尿病ラットでは m R N A 存在量が減少することを示唆している。したがって、本発明は、新規な薬物標的すなわち A 1 B G について、その遺伝子発現または遺伝子産物の活性を調節する新規な薬物または化学物質ならびに免疫学的疾患に対して有効な新規試験化合物をスクリーニングするために、該遺伝子およびプロモーターを使用することを含めて記述している。

【0138】

V. S C D 遺伝子およびポリペプチド

試験において特定された差次的に発現したさらに 2 つのバンドは、既知の代謝機能を有するラットステアロイル C o A デサチュラーゼのラットの部分 c D N A クローン (S C D 1 および S C D 2、それぞれ G e n B a n k 登録番号 J 0 2 5 8 5 および A B 0 3 2 2 4 3) であった。さらに、本発明者らの研究室における研究から、m R N A 発現ならびに S C D 活性がストレプトゾトシン (S T Z) 誘発性糖尿病において低いことが示されている。これは、糖尿病マウスにおける S C D 1 の m R N A の発現についても当てはまる (ウォーターズ ケー エム および タムビ ジェー エム (W a t e r s K . M . a n d N t a m b i J . M .)、1 9 9 4 年、J . B i o l . C h e m . 第 2 6 9 巻、2 7 7 7 3 ~ 2 7 7 7 7 ページ)。逆に、ヒト S C D の m R N A 発現はいくつかの癌性組織において高い (リーら (L i e t a l .)、1 9 9 4 年、I n t . J . C a n c e r、第 5 7 巻、3 4 8 ~ 3 5 2 ページ)。これらのデータは、ラットの S C D 1 遺伝子および S C D 2 遺伝子ならびにヒトの S C D 遺伝子が食事脂肪 (特に P U F A、表 2 を参照) により、また、疾患 (タムビ ジェー エム (N t a m b i J . M .)、1 9 9 4 年、J . L i p i d R e s . 第 4 0 巻、1 5 4 9 ~ 1 5 5 8 ページ) において転写時に制御されることを示唆している。

30

40

【0139】

マウスおよびラットのタンパク質も特徴付けがなされ、機能が立証されている (ミヤザキら (M i y a z a k i e t a l .)、2 0 0 0 年、J . B i o l . C h e m . 第 2 7 5 巻、3 0 1 3 2 ~ 3 0 1 3 8 ページおよびシーデラ (T h i e d e e t a l .)、1 9 8 6 年、J . B i o l . C h e m . 第 2 6 1 巻、1 3 2 3 ~ 1 3 2 5 ページ)。S C D 1 はパルミトイル C o A (1 6 : 0) またはステアロイル C o A (1 8 : 0) のいずれ

50

かを不飽和化（デサチュレート）すると提唱されており、一方、SCD2は16：0に対するよりも18：0のデサチュラーゼに対して選択性を示すと提唱されている（キムら（Kim et al.）、2000年、J. Lipid Res. 第41巻、1310～1316ページ）。ヒトSCDタンパク質の機能解析は報告されていない（ツアンら（Zhang et al.）、1999年、Biochem. J. 第340巻、252～264ページ）。

【0140】

ラットSCDに対するポリクローナル抗体が生産され、免疫ブロット分析に用いられている（ハッサンら（Hassan et al.）、2000年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第97巻、8883～8888ページ）。

10

【0141】

マウスでは、SCD1およびSCD2のPUFA抑制を担うプロモーター要素が特定されている（タムビ ジュー エム（Ntambi J. M.）、1999年、J. Lipid Res. 第40巻、1549～1558ページ）。2つのアイソフォームのマウスプロモーターの高度に保存された領域は77%同一である。これらの要素には、PUFA応答領域（PUFA-RR）と総称される、ステロール調節要素（SRE）、CCAAT結合因子または核因子（NF-Y）結合部位およびエンハンサー結合タンパク質配列（C/EBP）が含まれる。疾患においてヒトSCDが明らかに転写制御を受けるにもかかわらず、ヒトSCD制御領域は研究されていない。

【0142】

ヒトSCD制御領域を含むヒト配列を特定するために、BLASTNおよび利用可能なヒトSCDのcDNA配列（GenBank登録番号Y13647およびAF097514）を用いてGenBankのHTGS部門を検索した。検索により、ヒトcDNAに対応する6個のエキソンを含む第10染色体上のゲノム配列（GenBank登録番号AL139819）が特定された。最初のエキソンは、ヒトSCD cDNAのATGおよび5' UTRを含んでいる。部位-1～-2006bpのATGの上流側配列の地図を作製し、該配列の1970bpフラグメントを特異的プライマーを用いたPCRによりクローニングした。ヌクレオチド配列を図26に示す。

20

【0143】

ヒトSCD制御領域のヌクレオチド配列をマウスSCD1制御領域およびSCD2制御領域と比較した（図27）。マウスのSCD1プロモーターおよびSCD2プロモーターに存在するPUFA-RR要素は、ヒトSCD制御領域に保存されている。ヒトSCDの制御領域内のこれらのモチーフがヒトSCD遺伝子の発現をPUFAにより制御している可能性がある。

30

【0144】

したがって、本発明者らは、SCD遺伝子の転写を仲介するヒト制御領域をクローニングした。本発明の実施形態として、本発明者らは、脂質関連疾患の治療に有用であると思われる試験化合物の化学ライブラリーをスクリーニングするために用いるヒトSCDプロモーター／リポーター構築物を合成した。

【0145】

これらの所見は、新規な薬物標的すなわちSCDの遺伝子発現または遺伝子産物の活性を調節する新規な薬物または化学物質をスクリーニングするために該遺伝子ならびにプロモーターを使用することを含む、SCDに対する標的試験化合物を特定する新規な方法を示している。

40

【0146】

VI. アポリポタンパク質A-1遺伝子およびポリペプチド

試験において差次的に発現した他のバンドは、アポリポタンパク質A-1（ApoA-1）のラットの部分cDNAであった。アポリポタンパク質A-1のcDNAは、ラット（ハッダドラ（Haddad et al.）、1986年、J. Biol. Chem. 第261巻、13268～13277ページ、GenBank登録番号J02597）およ

50

びヒト（ブレスロウら（Breslow et al.）、1982年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第79巻、6861～6865ページ、GenBank登録番号NM_000039）からクローニングされている。

【0147】

ApoA-1は、血漿中の高密度リポタンパク質（HDL）の主要なタンパク質成分である。ApoA-1は、ほとんどの血漿コレステリルエステルの形成を担うレシチン／コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）の補因子である（ソウターら（Soutar et al.）、1975年、Biochemistry、第14巻、3057～3064ページ）。マウスおよびヒトのApoA-1プロモーターを用いたトランスフェクション試験についての記述がある（スリヴァスタヴァら（Srivastava et al.）、2000年、Eur. J. Biochem. 第267巻、4272～4280ページ）。このタンパク質は、抗体を用いたラジオイムノアッセイにより測定されることが多い（カーリンら（Karlin et al.）、1976年、J. Lipid Res. 第17巻、30～37ページ）。ヒトApoA-1に選択的に結合するタンパク質（アフィボディ）を単離するための、1価のファージディスプレイのために構成されたコンビナトリアルライブラリーの使用についての記述がある（ノードら（Nord et al.）、1997年、Nat. Biotechnol. 第15巻、772～777ページ）。

10

【0148】

PUFAはApoA-1のmRNAレベルを低下させることが報告されており（バーソウら（Berthou et al.）、1995年、Eur. J. Biochem. 第232巻、179～187ページ）、これは、本発明者らのノーザンブロットデータの結果（表2参照）と一致している。本発明者らのデータは、STZ誘発性糖尿病ラットではmRNA存在量が増加することを示唆している。

20

【0149】

これらの所見は、新規な薬物標的すなわちApoA-1の遺伝子発現または遺伝子産物の活性を調節する新規な薬物または化学物質をスクリーニングするために該遺伝子ならびにプロモーターを使用することを含む、ApoA-1に対する標的試験化合物を特定する新規な方法を示している。

【0150】

VII. Δ^3 , Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼ遺伝子
試験において特定された差次的に発現した別のバンドは、PUFAの代謝に参与するミトコンドリア β 酸化補助酵素 Δ^3 , Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼのラット部分cDNA（GenBank登録番号X61184）（パロサール ピー エムおよびヒルチューネン ジェー ケー（Palosaari and Hiltunen J. K.）、1990年、J. Biol. Chem. 第265巻、2446～2449ページならびにミュラー・ニューテン ジーおよびストッフエル ダブリュー（Muller-Newten G. and Stoffel W.）、1991年、Biol. Chem. Hoppe-Seyler、第372巻、613～624ページ）であった。この酵素は、シス Δ^3 エノイルCoAのトランス Δ^2 エノイルCoAへの変換を触媒する。ラット遺伝子は3- α 脂肪酸により誘導される（マドセンら（Madsen et al.）、1998年、J. Lipid Res. 第39巻、583～593ページ）。

30

40

【0151】

本発明者らは、STZ誘発性糖尿病ラットにおいてmRNA発現が誘導されることを示した。いくつかのヒト遺伝病、例えば、カルニチン輸送欠損、ツェルヴェーガー症候群、X連鎖副腎脳白質ジストロフィーは、 β 酸化の遺伝子／酵素に関連している（ワンダースら（Wanders et al.）、1992年、J. Inherit. Metab. Dis. 第15巻、643～644ページ、ローら（Roe et al.）、1990年、J. Clin. Invest. 第85巻、1703～1707ページ、およびウエイら（Wei et al.）、2000年、Ann. Neurol. 第47巻、286～2

50

96ページ)。

【0152】

Δ^3 , Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼをコードするヒト遺伝子がクローニングされた (ジャンセンら (Janssen et al.), 1994年、Genomics、第23巻、223~228ページ、GenBank登録番号NM_001919)。ヒト遺伝子の制御領域は公表されている (ジャンセンら (Janssen et al.), 1994年、Genomics、第23巻、223~228ページ)。タンパク質は精製され、抗体が産生された (ミュラー-ニュートン ジーおよびストッフエル ダブリュー (Muller-Newten G. and Stoffel W.), 1991年、Biol. Chem. Hoppe-Seyler、第372巻、613~624ページ)。トラ 10
ンス3-ヘキセノイルCoAのような基質を用いたその酵素活性の試験は当業者によって知られている (グルビッツら (Gurvitz et al.), 1999年、Biochem. J. 第344巻、903~914ページならびにパロサーリ ピー エムおよびヒルチューネン ジェー ケー (Palosaari and Hiltunen J. K.), 1990年、J. Biol. Chem. 第265巻、2446~2449ページ)。

【0153】

ラットの部分cDNAクローンをノーザンブロット法のプローブとして用いて、本発明者らはPUFAが Δ^3 , Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼのmRNAレベルを増加させることを示している (表1および2参照)。 20

【0154】

これらの所見は、薬物標的すなわち Δ^3 , Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼの遺伝子発現または遺伝子産物の活性を調節する新規な薬物または化学物質をスクリーニングするためにラットおよびヒト遺伝子ならびにプロモーターを使用することを含む、 Δ^3 , Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼに対する標的試験化合物を特定する新規な方法を示している。

【0155】

VIII. 脂肪酸シンターゼ遺伝子およびポリペプチド

差次的に発現したバンドの1つが脂肪酸シンターゼ (FAS) として特定された。ラット (GenBank登録番号X62888およびM76767) およびヒト (GenBank登録番号U26644およびU29344) を含むいくつかの動物種のFAS cDN 30
Aについて特徴付けがなされている。

【0156】

FASは、アセチルCoA、マロニルCoAおよびNADPHからの長鎖脂肪酸パルミチン酸の合成を触媒する (ワキル エス ジェイ (Wakil S. J.), 1989年、Biochemistry、第28巻、4523~4530ページ)。FASは、各ペプチドサブユニットが約260kDの大きさのホモ二量体として存在する。各サブユニットは7つの別個の成分の活性 (β -ケトアシルシンターゼ、アセチルCoAおよびマロニルCoAトランスアシラーゼ、 β -ヒドロキシアシルデヒドラターゼ、エノイルレダクターゼ、 β -ケトアシルレダクターゼ、チオエステラーゼ) および補欠分子族4'-ホスホパンテテイン (アシル担体タンパク質) の結合部位を有する。組換え大腸菌から精製された 40
ヒトFASは、これらの活性のすべてを示す (ジャヤクマールら (Jayakumar et al.), 1996年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第93巻、14509~14514ページ)。ジャヤクマールら (Jayakumar et al.) (1995年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第92巻、8695~8699ページ) は、ヒト肝癌細胞株HepG2からFASをほぼ均質になるまで精製した。

【0157】

FASの発現は、栄養およびホルモンに制御されている (セメンコヴィッチ シー エフ (Semenkovich C. F.), 1997年、Prog. Lipid. Res. 第36巻、43~53ページ)。ラットの部分cDNAクローンをノーザンブロット法のプローブとして用いたとき、本発明者らのデータ (表1および2) は、PUFAがFAS 50

のmRNAレベルを低下させることを示す以前に報告されたデータ（クラークら（Clarke et al.）、1990年、J. Nutr. 第120巻、225～231ページおよびアームストロングら（Armstrong et al.）、1991年、Biochem. Biophys. Res. Commun. 第177巻、1056～1061ページ）と一致している。さらに、その発現はストレプトゾトシン誘発性糖尿病において変化する（サガーソン イー ディーおよびカーペンター シー エー（Saggerson E. D. and Carpenter C. A.）、1987年、Biochem. J. 第243巻、289～292ページ）。これは、STZ誘発性糖尿病ラットではmRNAの存在量が減少していることを示唆する本発明者らの結果と一致している。

【0158】

10

FASのラットプロモーターは、リポーター検定システムを用いて培養細胞およびトランスジェニックマウスのいずれにおいても十分に特徴づけられている（セメンコヴィッチ シー エフ（Semenkovich C. F.）、1997年、Prog. Lipid. Res. 第36巻、43～53ページ）。ヒトFAS遺伝子の2つのプロモーターについても記載されており、1つはラット遺伝子と非常に類似しており、もう1つは第1イントロンの3'末端の約260塩基対からなるプロモーターIIである（シューら（Hsu et al.）、1996年、J. Biol. Chem. 第271巻、13584～13592ページ）。

【0159】

ヒトFASに対する抗体は入手可能であり、免疫組織化学およびウェスタンブロット法に用いられている（ジョワイユら（Joyeux et al.）、1990年、J. Clin. Endocrinol. Metab. 第70巻、1438～1444ページ、ジャヤクマールら（Jayakumar et al.）、1996年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第93巻、14509～14514ページ、およびウィレンツら（Wilentz et al.）、2000年、Pediatr. Dev. Pathol. 第3巻、525～531ページ）。

20

【0160】

FASは、抗腫瘍療法の有望な選択的標的として提案されている（クハージダら（Kuhajda et al.）、1994年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第91巻、6379～6389ページ）。FASタンパク質についての薬物スクリーニング検定が記載されている（特許協力条約国際特許出願公開第WO00/51430号）。

30

【0161】

本発明者らは、FAS遺伝子の発現を調節する新規な薬物または化学物質をスクリーニングするためにヒトプロモーターを使用することを含む標的試験化合物を特定する新規な方法を教示している。

【0162】

IX. グルコースー6ーリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子およびポリペプチド
試験において特定された差次的に発現されたバンドの1つは、グルコースー6ーリン酸デヒドロゲナーゼ（G6PD）遺伝子のラットの部分cDNAであった。G6PD cDNAは、ラット（GenBank登録番号X07467）およびヒト（GenBank登録番号X03674）からクローニングされている。

40

【0163】

G6PDは、ペントースリン酸の産生および還元的生合成や細胞の酸化還元状態の維持のためのNADPHのかたちの還元力の産生をもたらすペントースリン酸経路における最初の反応を触媒する。

【0164】

ヒトG6PDは、組換え大腸菌（バウティスタら（Bautista et al.）、1992年、Biochim. Biophys. Acta. 第1119巻、512～518ページ）ならびにヒト赤血球（アデディラン エス エー（Adediran S. A.）、1996年、Biochimie、78巻、165～170ページ）およびラット

50

脳（アスカールら（Askar et al.）、Indian J. Biochem. Biophys. 第33巻、512～518ページ）を含む種々の他の供給源から精製されている。

【0165】

G6PDは、ホルモン、栄養素および酸化体ストレスにより組織特異的に制御を受ける（クレツィエンら（Kletzien et al.）、1994年、FASEB J. 第8巻、174～181ページ）。PUFAはG6PD mRNAレベルを低下させると報告されており（トムリンソンら（Tomlinson et al.）、1998年、J. Nutr. 第118巻、408～415ページおよびヨシダら（Yoshida et al.）、1999年、J. Nutr. Sci. Vitaminol. 第45巻、411～421ページ）、これは、本発明者らのノーザンブロットの所見からの結果と一致している（表2を参照）。

10

【0166】

ラットおよびヒト双方のG6PDのプロモーターがクローニングされ、リポーター検定システムを用いて特徴づけられている（ウーシニら（Ursini et al.）、1990年、Biochem. Biophys. Res. Commun. 第170巻、1203～1209ページ、クレツィエンら（Kletzien et al.）、1994年、FASEB J. 第8巻、174～181ページおよびフィリップペら（Phillippe et al.）、1994年、Eur. J. Biochem. 第226巻、377～384ページ）。G6PDに対する抗体は入手可能である（ダオら（Dao et al.）、1982年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第79巻、2860～2864ページおよびムーアら（Moore et al.）、1986年、Carcinogenesis、第7巻、1419～1424ページ）。

20

【0167】

本発明者らは、G6PDの遺伝子発現または遺伝子産物の活性を調節する新規な薬物または化学物質をスクリーニングするためにラットおよびヒト遺伝子ならびにプロモーターを使用することを含む、G6PDに対する標的試験化合物を特定する新規な方法を教示している。

【0168】

X. グリセロール3-リン酸アシルトランスフェラーゼ遺伝子およびポリペプチド GPATのミトコンドリア型アイソフォームおよびミクロソーム型アイソフォームが報告されている。試験において特定された差次的に発現されたバンドの1つは、グリセロール3-リン酸アシルトランスフェラーゼ（GPAT）遺伝子のミトコンドリア型アイソフォームのラットの部分cDNAであった。ミトコンドリア型イソ酵素のラットおよびマウス cDNAのみがクローニングされている（ガネシュら（Ganesha et al.）、1999年、Biochim. Biophys. Acta、第1439巻、415～423ページ、GenBank登録番号AF021348およびシンら（Shin et al.）、1991年、J. Biol. Chem. 第266巻、23834～23839ページ、GenBank登録番号NM_008149）。

30

【0169】

生物情報学的手法を用いて、GenBankのHTGSデータベースにおいてヒト遺伝子を第10染色体のゲノムDNAのフラグメント上に特定した（GenBank登録番号AL391986）。オリゴヌクレオチドプライマーを合成し、提示されたヒト遺伝子配列をクローニングおよびDNA配列決定により立証した（図28）。エキソンをAL135838のゲノムDNA上にマップしたところ、遺伝子は20個のコーディングエキソンを含むことが見いだされた。ナガセら（Nagase et al.）（2000年、DNA Res. 第7巻、273～281ページ）は、このヒトGPAT CDS（GenBank登録番号AB046780）のカルボキシル末端のみを含む不完全なcDNAをクローニングしている。このヒト遺伝子配列のCDSはGenBankに提出されたが、グリセロール3-リン酸アシルトランスフェラーゼ遺伝子としてのその機能上の同一性を示

40

50

唆するアノテーションは存在しない。それは単に「K I A A 1 5 6 0 タンパク質の m R N A」と同定されただけである。

【0170】

ヒト、ラット (G e n B a n k 登録番号 A A B 7 1 6 0 5) およびマウス (G e n B a n k 登録番号 N P _ 0 3 2 1 7 5) の G P A T 遺伝子間の同一性および類似性を示す多重配列アライメントを図 29 に示す。ヒトおよびマウスの遺伝子は 93% 同一または 96% 類似であり、一方、ヒトおよびラットの遺伝子は 92% 同一または 95% 類似である。

【0171】

現在までのところ、マウスのプロモーターの特徴づけのみが報告されている (ジャーキン
スラ (J e r k i n s e t a l .)、1995 年、J . B i o l . C h e m . 第 27 10
0 巻、1416~1421 ページおよびエリクソンら (E r i c s s o n e t a l .)、1997 年、J . B i o l . C h e m . 第 272 巻、7298~7305 ページ)。
。

【0172】

生物情報学的手法を用いて、ヒト G P A T 遺伝子の制御領域を特定し、地図を作製した。
ヒト G P A T C D S により B L A S T N を用いて G e n B a n k の E S T 部門を検索することにより、
遺伝子の 5' U T R の 205 b p を含むヒト E S T を特定した (G e n B a n k 登録番号 A V 6 9 5 2 8 8)。
この実験から、独自に 5' U T R を含む 2 つの追加の上流エクソンと、長さ 31 k b をこえる第 1 のイントロンの存在が明らかにされた。A
T G からの部位 - 3 2 5 3 5 ~ - 3 4 5 3 4 の制御領域を図 30 に示す。 20

【0173】

G P A T は、1-アシル-s n-グリセロール 3-リン酸を生成するための s n-グリセ
ロール 3-リン酸のアシル化を触媒し、それによりグリセロ脂質の生成のための確実なス
テップを提供する (ベル アール エムおよびコールマン アール エー (B e l l R . M . a n d C o l e m a n R . A .)、1980 年、A n n u . R e v . B i o c h e m . 第 49 巻、459~487 ページ)。
マウスミトコンドリアタンパク質に対する抗体が産生されている (イエットら (Y e t e t a l .)、1993 年、B i o c h e m i s t r y、第 32 巻、9486~9491 ページ)。

【0174】

ラットの部分 c D N A クローンをノーザンブロット分析のプロブとして用いて、本発明 30
者らは P U F A が G P A T m R N A レベルを低下させることを最初に示している (表 1
および 2 参照)。

【0175】

本発明者らはこのように、新規な薬物標的すなわち G P A T について、その遺伝子発現ま
たは遺伝子産物の活性を調節する新規な薬物または化学物質をスクリーニングするために
ラットおよびヒトの遺伝子ならびにプロモーターを使用することを含めて示している。

【0176】

X I . S p o t - 1 4 遺伝子およびポリペプチド

試験において特定された差次的に発現したバンドの 1 つは、S p o t - 1 4 遺伝子のラッ
トの部分 c D N A であった。S p o t - 1 4 配列は、ヒト (グリラスカラ (G r i l l a s c a e t a l .)、1997 年、F E B S L e t t . 第 401 巻、38~42 ペ
ージ、G e n B a n k 登録番号 Y 0 8 4 0 9)、ラット (リアウ シー ダブリューおよ
びトウル エイチ シー (L i a w C . W . a n d T o w l e H . C .)、1984 年、J . B i o l . C h e m . 第 259 巻、7253~7260、G e n B a n k 登録
番号 K 0 1 9 3 4) およびマウス (グリラスカラ (G r i l l a s c a e t a l .)、1997 年、F E B S L e t t . 第 401 巻、38~42 ページ、G e n B a n k 登
録番号 X 9 5 2 7 9) において知られている。ラットおよびマウスの S p o t - 1 4 遺伝
子の発現は、肝臓および脂肪組織において広く研究されている。S p o t - 1 4 特異抗体
を用いて脂質生成組織の核に見いだされた S p o t - 1 4 タンパク質は、甲状腺ホルモン
(T 3) および食事の炭水化物により共同作用的に誘導される (キンロウら (K i n l 50

aw et al.)、1989年、J. Biol. Chem. 第264巻、19779～19783ページ、キンロウら (Kinlaw et al.)、1993年、Endocrinology、第133巻、645～650ページ、クラークら (Clarke et al.)、1990年、J. Nutr. 第120巻、218～224ページ、ジャンプら (Jump et al.)、1994年、J. Lipid Res. 第35巻、1076～1084ページおよびリュウ エイチ シーおよびトウル エイチ シー (Liu H. C. and Towle H. C.)、1994年、Mol. Endocrinol. 第8巻、1021～1037ページ)。

【0177】

Spot-14は、脂質生成に密接に関連づけられており、より具体的には正常組織および癌組織における脂質生成を増大させる代謝インテグレートである (カニングハムら (Cunningham et al.)、1998年、Thyroid、第8巻、815～825ページ)。THRSP遺伝子は、ヒトの肝臓および脂肪細胞、特に脂肪腫小節において発現する。さらに、その発現はストレプトゾトシン誘発性糖尿病において変化する (ジャンプら (Jump et al.)、1990年、Mol. Endocrinol. 第4巻、1655～1660ページ)。これは、STZ誘発性糖尿病ラットではmRNAの存在量が減少していることを示唆する本発明者らの結果と一致している。本発明者らのノーザンブロットデータ (表2)は、PUFAがSpot-14のmRNAレベルを低下させることを示す、以前に報告されたデータと一致している (フォレッツら (Foretz et al.)、1999年、Biochem. J. 第341巻、371～376ページ)。

【0178】

グリラスカら (Grillasca et al.) (1997年、FEBS Lett. 第401巻、38～42ページ)は、ヒトおよびマウスの遺伝子 (THRSPとも呼ばれる) およびプロモーターをクローニングし、それがラット遺伝子と同じ構成を有し、高度に保存されたアミノ酸配列 (80%を超える) を示すことを見いだした。タビオーら (Taviaux et al.) (1997年、Cytogenet. Cell Genet. 第76巻、219～220ページ)は、蛍光in situハイブリッド形成により、THRSP遺伝子を11q13.5～q14.1に位置づけた。

【0179】

長鎖脂肪酸合成の増大が乳癌において発生することがある。それは、不良な予後を示す腫瘍増殖では必ず発生する。Spot-14タンパク質は、脂肪酸合成酵素をコードする遺伝子を活性化する。THRSP遺伝子が存在する染色体領域11q13の増幅によっても、乳癌の予後不良が予測される。モンカーら (Moncure et al.) (1998年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第95巻、6989～6994ページ)は、11q13の増幅された領域のテロメア末端におけるマーカーD11S906とD11S937との間にTHRSP遺伝子の位置を特定し、該遺伝子が乳癌由来細胞株において増幅かつ発現されることを見いだした。他の所見から、腫瘍の脂質代謝を決定付ける因子としての該タンパク質の役割を裏づけられた。Spot-14の発現は、乳癌における2つの予後指標、すなわち脂質生成の増大と11q13の増幅との間に病態生理学的関連性をもたらしした。

【0180】

本発明は、薬物標的すなわちSpot-14の遺伝子発現または遺伝子産物の活性を調節する新規な薬物または化学物質をスクリーニングするためにラットおよびヒトの遺伝子ならびにプロモーターを使用することを含む、Spot-14に対する試験化合物を特定する新規な方法を教示する。

【0181】

XII. カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ遺伝子およびポリペプチド
試験において特定された差次的に発現されたバンドの1つは、カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT) 遺伝子のラットの部分cDNAであった (サルミネンら (50

Salminen et al.)、1990年、Gene、第93巻、241～247ページおよびランドストロムら (Lundstrom et al.)、1991年、DNA Cell Biol. 第10巻、181～189ページ)。

【0182】

COMTは、基質中のフェノール性水酸基の1つをメチル化することにより、種々の生物における様々なカテコール含有分子を不活性化する (ガルドベルグおよびマースデン (Guldberg and Marsden)、1975年、Pharmacol. Rev. 第27巻、135～306ページ)。哺乳類においては、神経伝達物質、ホルモンおよびパーキンソン病の治療に用いられているLドーパのようなカテコール部分を含む薬物は、COMTにより不活性化される (テンフネン ジェイ (Tenhunen J.)、1996年、DNA Cell Biol. 第15巻、461～473ページ)。COMTの阻害剤は、パーキンソン病およびアルツハイマー病の治療に有用であると考えられている (ジョーガラ (Jorga et al.)、2000年、Clin. Pharmacol. Ther. 第67巻、610～620ページならびにチョン ビー エスおよびメースフェルダー ティー エル (Chong B. S. and Mersfelder T. L.)、2000年、Ann. Pharmacother. 第34巻、1056～1065ページ)。

10

【0183】

ヒトおよびラットのCOMT遺伝子ならびにプロモーターについての記載がある (テンフネンら (Tenhunen et al.)、1994年、Eur. J. Biochem. 第223巻、1049～1059ページ、カイら (Xie et al.)、1999年、Mol. Pharmacol. 第56巻、31～38ページおよびテンフネンら (Tenhunen et al.)、1996年、DNA Cell Biol. 第15巻、461～473ページ)。COMTは精製されており、それに対する抗体についての記載がある (ティルグマン シーおよびウルマネン アイ (Tilgmann C. and Ulmanen I.)、1996年、J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 第684巻、147～461ページおよびカストナーら (Kastner et al.)、1994年、Neuroscience、第62巻、449～457ページ)。

20

【0184】

アドレナリンを基質として用いたCOMTの酵素検定は公表されており、当業者によって十分に知られている (ヴィエイラ・コエルホ エムおよびソアレス・ダ・シルヴァ ピー (Vieira-Coelho M. and Soares-da-Silva P.)、1999年、Brain Res. 第821巻、69～78ページおよびボルゲスら (Borges et al.)、1998年、J. Enzyme Inhib. 第13巻、473～483ページ)。

30

【0185】

ラットの部分cDNAクローンをノーザンブロット法のプローブとして用いて、本発明者らはPUFAがCOMTのmRNAレベルを低下させることを最初に示す (表1および2を参照)。

40

【0186】

よって本発明者らは、COMT遺伝子の発現または遺伝子産物の活性を調節する新規な薬物または化学物質をスクリーニングするためにラットおよびヒト遺伝子ならびにプロモーターを使用することを含む、COMT発現を標的とする試験化合物を特定する新規な方法を示している。

【0187】

XIII. INSIG1遺伝子およびポリペプチド

試験において特定された差次的に発現されたバンドの1つは、インスリン誘導性遺伝子1 (INSIG1) のラットの部分cDNAであった。INSIG1配列は、ヒト (ペンら (Peng et al.)、1997年、Genomics、第43巻、278～28

50

4 ページ、GenBank 登録番号 U96876) およびラット (当初 CL-6 と命名された) (ダイヤモンドら (Diamond et al.), 1993 年、J. Biol. Chem. 第 268 巻、15185～15192 ページ、GenBank 登録番号 L13619) において知られている。

【0188】

ラット CL-6 は、肝細胞株においてインスリンにより最も高度に誘導される遺伝子であり、再生および発生時に増殖中の肝臓において発現される (ボルトフら (Bortoff et al.), 1997 年、Endocrine、第 7 巻、199～207 ページ、チンら (Chin et al.), 1995 年、Am. J. Physiol. 第 269 巻、E691～E700 ページおよびハーバーら (Haber et al.), 1993 年、Hepatology、第 22 巻、906～914 ページ)。

【0189】

ヒトの同遺伝子は、翻訳領域内でラット遺伝子と 80% の同一性を共有している。蛍光 in situ ハイブリッド形成により、該遺伝子は 7q36 に位置づけされた (ペンら (Peng et al.), 1997 年、Genomics、第 43 巻、278～284 ページ)。ヒトおよびラットタンパク質の推定分子量は、それぞれ 30 および 28 kDa である。INSIG1 は、5 つの潜在的な膜スパンニングドメインを有し、ラットタンパク質に対するウェスタンブロットにおいて抗 CL-6 抗血清を用いて測定された実験的分子量は約 43 kDa である (ダイヤモンドら (Diamond et al.), 1993 年、J. Biol. Chem. 第 268 巻、15185～15192 ページ)。

【0190】

INSIG1 は肝再生に関与することが知られており、インスリンにより高度に誘導される。同タンパク質は、他のタンパク質の機能ドメインと明確な相同性を有さない。発現の程度は肝臓および腎臓で最高であり、続いて心臓および筋肉である (ダイヤモンドら (Diamond et al.), 1993 年、J. Biol. Chem. 第 268 巻、15185～15192 ページ)。ヒト INSIG1 に関するプロモーター試験がルシフェラーゼ検定を用いて実施されている (ペンら (Peng et al.), 1997 年、Genomics、第 43 巻、278～284 ページ)。

【0191】

ラットの部分 cDNA クローンをノーザンブロット法のプローブとして用いて、本発明者らは PUFA が INSIG1 の mRNA レベルを低下させることを最初に示している (表 1 および 2 を参照)。

【0192】

よって本発明者らにより、INSIG1 遺伝子の発現または遺伝子産物の活性を調節する新規な薬物または化学物質をスクリーニングするためにラットおよびヒトの遺伝子ならびにプロモーターを使用することを含む、INSIG1 発現を標的とする試験化合物を特定する新規な方法が示されている。

【0193】

(対象ポリヌクレオチドおよびポリペプチド)

対象ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、本明細書でさらに考察するように、疾患、特にヒト疾患の治療法および診断法の発見のための研究試薬および研究材料として用いることができる。

【0194】

(ヌクレオチドプローブ)

本発明の核酸分子により、当業者は生体材料中のヌクレオチド配列の検出に用いるヌクレオチドプローブを構築することが可能である。本明細書に記載のように、制限酵素の多くの特有の制限配列が、対象ポリヌクレオチドの配列一覧に特定される核酸分子内に組み込まれており、これらによって、本発明の対象ポリヌクレオチドに特有なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列へのアクセスが可能となる。対象ポリヌクレオチドに特有なヌクレオチド配列またはそのイソ型 (アイソフォーム) は、当技術分野で周知の手順により

実施される化学合成および酵素的連結反応によって構築することも可能である。

【0195】

ヌクレオチドプローブは、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 等のような十分なシグナルを提供しかつ十分な半減期を有する放射性標識を始めとする検出可能なマーカーで標識することができる。使用できる他の検出可能なマーカーとしては、特異的標識抗体により認識される抗原、蛍光化合物、酵素、標識抗原に対して特異的な抗体および化学発光化合物などがある。適切な標識は、検出すべきヌクレオチドへのプローブのハイブリッド形成および結合の速度と、ハイブリッド形成に利用可能なヌクレオチドの量とを考慮して選択可能である。ヌクレオチドプローブは、本発明の対象ポリヌクレオチドと関連または類似の遺伝子を検出するために用いることができる。

10

【0196】

したがって、本発明はまた、検出可能なマーカーで標識した本発明の1つまたは複数のヌクレオチドプローブに試料をハイブリッド形成条件下で接触させることと、試料中の核酸分子とヌクレオチドプローブとの間のハイブリッド形成の程度を測定することとから成る、試料中の対象ポリヌクレオチドに関連するかまたは類似のポリペプチドをコードする核酸分子の存在を検出する方法も提供する。

【0197】

本発明の方法に用いることができるハイブリッド形成条件は、当技術分野で知られており、例えば、前述のサムブルックら (Sambrook et al.) に記載されている。ハイブリッド形成産物は、当技術分野で知られている技術を用いて分析することができる。ヌクレオチドプローブは、本明細書に記載のように検出可能なマーカーで標識することができ、ハイブリッド形成産物は、検出可能なマーカーまたは検出可能なマーカーによってもたらされる検出可能な変化を検出することにより、分析することができる。

20

【0198】

(プライマー)

本発明の核酸分子の同定は、例えばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) において本発明のポリヌクレオチド分子を増幅するためのプライマーとして用いることができるヌクレオチド配列の同定および単離または合成も可能にする。PCRに用いるプライマーの長さとは、一方のプライマーから合成される伸長産物とその鋳型から分離されたとき、他方のプライマーが伸長して規定の長さの核酸となるための鋳型として働き得るように、両プライマーが所望の配列の別々の鎖でかつその配列上の相対的な位置にハイブリッド形成するように選択する。

30

【0199】

本発明において用いることができるプライマーは、精製された制限エンドヌクレアーゼ消化物中にあるように天然に存在する、あるいは、例えばホスホトリエステルおよびホスホジエステル法または自動化法 (コノリー ビー エー (Connolly B. A.))、1987年、Nuc l. Acid Res. 第15巻、3131~3139ページを参照) のような当技術分野で知られている技術を用いて合成により生産されるオリゴヌクレオチド、すなわち、本発明の核酸分子の2つまたはそれ以上のデオキシリボヌクレオチドを含む分子である。プライマーは、本発明のDNA配列と相補的であるプライマー伸長産物の合成を可能とする条件下、例えば、ヌクレオチド基質、DNAポリメラーゼのような重合剤の存在下で適切な温度およびpHのもとに置いたとき、合成の開始点として作用することができる。プライマーは、他のプライマーコピーとの塩基対合により2次構造を形成しない配列またはヘアピン構造を形成する配列であることが好ましい。プライマーは、1本鎖または2本鎖であってよい。プライマーが2本鎖である場合、増幅産物を調製するためにプライマーを使用する前に、鎖を分離するべく処理すればよい。プライマーは、約7~25ヌクレオチドを含むことが好ましい。

40

【0200】

プライマーは、増幅産物の検出を可能にする検出可能なマーカーで標識することができる。適切な検出可能なマーカーは、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I および ^3H のような放射性マ

50

ーカー、化学発光マーカーのような発光マーカー（好ましくはルミノール）、および蛍光マーカー（好ましくは、ダンシルクロライド、フルオレセイン-5-イソチオシアネートおよび4-フルオロ-7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3ジアゾール）ならびにビオチンのような補因子である。十分な量のプライマーが増幅すべき本発明の核酸またはそのオリゴヌクレオチド配列と相補的な配列を含んでいるならば、プライマーは非相補的配列を含んでいてよいことは理解できよう。制限部位のリンカーも、増幅産物のクローニングと配列決定とを容易にする適切な制限酵素による増幅産物の消化を可能にしつつ、プライマーに組み込まれていてもよい。

【0201】

（検定—配列の増幅）

10

したがって、ポリメラーゼ連鎖反応において核酸分子またはその核酸分子の所定のオリゴヌクレオチドフラグメントを増幅可能なプライマーを用いて、増幅配列を生成させるべく増幅配列の生成が可能な条件下で試料を処理することと、増幅配列を検定することを含む、試料中の対象ポリヌクレオチドまたはそのポリヌクレオチドの所定のオリゴヌクレオチドフラグメントをコードする配列を有する核酸分子の存在を確定する方法が提供される。

【0202】

ポリメラーゼ連鎖反応は、引用により本願に組み込まれる、イニス エム エーおよびゲルファント ディー エイチ（Innis M. A. and Gelfand D. H.）、1989年、PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications、イニス エム エー、ゲルファント ディー エイチ、シンスキー ジェー ジェーおよびホワイト ティー ジェー（Innis M. A., Gelfand D. H., Shinsky J. J. and White T. J.）（編）、アカデミックプレス（Academic Press）[ニューヨーク所在]、3～12ページに一般的に記載されているように、標的核酸配列を増幅する方法を指す。

20

【0203】

増幅産物は、当技術分野で知られている技術を用いて、それらの各サイズに基づいて単離し、区別することが可能である。例えば、増幅後、DNA試料をアガロースゲル上で分離し、臭化エチジウムで染色した後に紫外（UV）光下で可視化することが可能である。DNAは所望のレベルに増幅することができ、放射性標識またはビオチン標識されたヌクレオチド三リン酸のような検出可能なマーカーを有するヌクレオチド誘導体を組み込むためにさらなる伸長反応を行うことができる。プライマーを検出可能なマーカーで標識してもよい。検出可能なマーカーは、制限酵素および電気泳動による分離または当技術分野で知られている技術により分析することができる。

30

【0204】

PCRを用いる本発明の方法において用いることができる条件は、ハイブリッド形成および増幅反応が試料中のDNAおよび適切な相補的ハイブリッド形成プライマーの存在下で進行することを可能にする条件である。ポリメラーゼ連鎖反応に適した条件は、当技術分野で一般的に知られている。例えば、本願明細書に援用する、イニス エム エーおよびゲルファント ディー エイチ（Innis M. A. and Gelfand D. H.）、1989年、PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications、イニス エム エー、ゲルファント ディー エイチ、シンスキー ジェー ジェーおよびホワイト ティー ジェー（Innis M. A., Gelfand D. H., Shinsky J. J. and White T. J.）（編）、アカデミックプレス（Academic Press）[ニューヨーク所在]、3～12ページを参照のこと。好ましくは、PCRには好熱性細菌 *Thermus aquaticus* から得られるポリメラーゼ（GeneAmpキットのTaqポリメラーゼ、Perkin Elmer Cetus）を用いるか、あるいは、他の熱安定性ポリメラーゼを用いてDNA鋳型鎖を増幅してもよい。

40

50

【0205】

本発明の核酸を増幅するのにリガーゼ連鎖反応（LCR）および核酸配列に基づく増幅法（Nucleic-Acid Sequence Based Amplification）（NASBA）のような他の技術を用いることができることは理解されよう。LCRにおいては、標的鎖上に互いに隣接してハイブリッド形成する2つのプライマーが標的鎖の存在下で連結されて相補鎖を形成する（バックマン（Backman）、1991年、および1989年6月14日公表の欧州公告出願第0320308号）。NASBAは2つのプライマーを用いる連続増幅法であり、一方のプライマーはRNAポリメラーゼにより認識されるプロモーター配列を組み込んでおり、第2のプライマーは標的配列の第1のプライマーに対して相補的な配列から得られるものである（マレク（Malek）への米国特許第5,130,238号）。 10

【0206】

（ベクター）

本発明はまた、本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターを用いて遺伝子工学的に改変される宿主細胞、および組換え技術による本発明のポリヌクレオチドの生産を教示している。

【0207】

本発明のこの態様によれば、ベクターは、例えば、プラスミドベクター、1本鎖または2本鎖のファージベクター、あるいは1本鎖または2本鎖のRNAまたはDNAウイルスベクターであってよい。これに関する特定の実施形態において、ベクターは特異的発現を可能にする。そのような特異的発現は、誘導性発現または特定の種類の細胞のみにおける発現または誘導性かつ細胞特異的発現である。誘導性ベクターのうちの特定のものは、温度および栄養添加物のような操作しやすい環境因子により発現誘導可能なベクターである。原核生物の宿主および真核生物の宿主に用いるための構成を有し誘導可能な発現ベクターを含む、本発明のこの態様に適した様々なベクターは、当業者に良く知られており、また日常的に用いられている。そのようなベクターとしては、とりわけ、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば、細菌プラスミドから、バクテリオファージから、トランスポゾンから、酵母エピソームから、挿入エレメントから、酵母染色体エレメントから、ウイルス（バキュロウイルス、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスのようなウイルス）から得られるベクター、ならびにコスミドおよびファージミドのようなプラスミド遺伝因子とバクテリオファージ遺伝因子とから得られるようなそれらの組合せに由来するベクターなどがある。これらのすべてが、本発明のこの態様による発現のために用いることができる。 20 30

【0208】

市販されている以下のベクターを、例として記載する。細菌用のベクターの主なものは、pQE-9、pQE-16、pQE-30、pQE-40、pQE-50およびpQE-60（キアゲン（Qiagen））、pCRII、pCRII-TOPO、pTrcHisおよびpBAD-TOPO（インビトロジェン（Invitrogen））、pGEM-3Z、pGEMEX-1、pET-5（プロメガ（Promega））、pBSファージミドベクター、Phagescriptベクター、Bluescriptベクター、pCAL、pET-3およびpSPUTK（ストラタジーン（Stratagene））、pTrc99A、pKK223-3、pKK232-8およびpRIT2T（ファルマシア（Pharmacia））、pMAL（ニューイングランドバイオラボ（New England Biolabs））およびpBR322（ATCC37017）である。真核ベクターの主なものは、pGAPZ、pYES2、pYES2/CTおよびpcDNA3.1（インビトロジェン（Invitrogen））、pCAT3およびpGL3（プロメガ（Promega））、pCMV-Script、pXT1、pDual、pCMVLacI、pESC、HybriZAP2.1、ImmunoZAPおよびpRS（ストラタジーン（Stratagene））、ならびにpSVK3、pSVLおよびpMS 40 50

G (ファルマシア (Pharmacia)) である。これらのベクターは、本発明のこの態様に従って当業者が使用可能な多くの市販かつよく知られたベクターの単なる例として列挙する。例えば、宿主における本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの導入、維持、増殖または発現に適した他のプラスミドまたはベクターを、本発明のこの態様に用いることができることは理解されよう。一般的に、宿主においてポリペプチドまたはポリヌクレオチドを発現させるためにポリヌクレオチドを維持、増殖または発現するのに適した任意のベクターが、この点で発現に用いることができる。

【0209】

発現ベクターにおけるDNA配列は、例えばmRNA転写を誘導するプロモーターなどの適切な発現制御配列と作動可能なように連結されている。プロモーター領域は、制限部位または候補プロモーター・フラグメント、すなわちプロモーターを含む可能性があるフラグメントを導入するための部位の下流のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 転写ユニットのようなプロモーター領域を欠くりポーター転写ユニットを備えたベクターを用いて所望の遺伝子から選択することが可能である。よく知られているように、プロモーターを含むフラグメントをベクターのCAT遺伝子の上流の制限部位に導入することにより、標準的なCAT検定により検出可能なCAT活性が生じる。この目的に適したベクターは、pKK232-8およびpCAT3のように、よく知られており、容易に入手できる。本発明のポリヌクレオチドの発現のためのプロモーターには、よく知られ、かつ容易に入手できるプロモーターだけでなく、リポーター遺伝子を用いて前記の技術により容易に得られるプロモーターも含まれる。本発明によるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現に適した既知の原核プロモーターは、大腸菌lacIおよびlacZプロモーター、T3およびT7プロモーター、gptプロモーター、ラムダPRおよびPLプロモーターならびにtrpプロモーターなどである。この点について適した既知の真核プロモーターは、CMV即時型プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、初期および後期SV40プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) のプロモーターのようなレトロウイルスLTRsのプロモーターおよびマウスメタロチオネイン-Iプロモーターのようなメタロチオネインプロモーターなどである。

【0210】

増殖および発現用のベクターは一般的に、例えば、前記のサンプブルックら (Sambrook et al.) に記載されているような選択可能なマーカーおよび増幅領域を備える。

【0211】

(宿主細胞)

本明細書で前述したように、本発明は、本発明のベクターを用いて遺伝子工学的に改変される宿主細胞をも教示している。

宿主細胞中のポリヌクレオチド構築物は、組換え配列によりコードされる遺伝子産物を生産するために通常の方法で用いることが可能である。対象ポリヌクレオチドまたはポリペプチド産物またはそのイソ型またはその一部は、当技術分野で知られている技術を用いて適切な宿主細胞中で発現させることにより得ることができる。適切な宿主細胞としては、原核生物もしくは真核生物または細胞株、例えば、細菌、哺乳類、酵母または他の菌類、ウイルス、植物または昆虫の細胞などがある。外来DNAを発現させるために細胞を形質転換またはトランスフェクションする方法は、当技術分野でよく知られている (例えば、イタクラら (Itakura et al.)、米国特許第4,704,362号、ヒンネンら (Hinnen et al.)、1978年、マライら (Murray et al.)、米国特許第4,801,542号、マックナイトら (McKnight et al.)、米国特許第4,935,349号、ハーゲンら (Hagen et al.)、米国特許第4,784,950号、アクセルら (Axel et al.)、米国特許第4,399,216号、ゲッダルら (Goeddal et al.)、米国特許第4,766,075号およびサンプブルックら (Sambrook et al.)、1989年、Molecular Cloning、第2版、コールドスプリングハーバーラボ

ラトリープレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) [ニューヨーク州コールドスプリングハーバー (Cold Spring Harbor) に所在] (すべてを本願明細書に援用する) を参照)。適切な宿主の代表的な例としては、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌、ストレプトミセスおよび枯草菌のような細菌細胞；酵母細胞およびアスペルギルス細胞のような菌類の細胞；ショウジョウバエ S2 およびスポドプテラ (Spodoptera) Sf9 細胞のような昆虫細胞；CHO、COS-1、ZR-75-1、チャン (Chang)、HeLa、C127、3T3、HepG2、BHK、293 および Bowes メラノーマ細胞のような動物細胞；ならびに植物細胞などがある。

【0212】

宿主細胞は、ポリヌクレオチドを組み込み、本発明のポリヌクレオチドを発現するべく遺伝子工学的に改変することが可能である。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレイプ・ローディング (scrape loading)、弾道導入 (ballistic introduction)、感染またはその他の方法により行うことが可能である。そのような方法は、デービスら (Davis et al.)、1986 年、Basic Methods in Molecular Biology、エルセビア (Elsevier) [ニューヨーク所在] およびサムブルックら (Sambrook et al.)、1989 年、Molecular Cloning、第 2 版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) [ニューヨーク州コールドスプリングハーバー (Cold Spring Harbor) に所在] のような多くの標準的な実験手引き書に記載されている。

【0213】

(対象ポリペプチドの生産)

本明細書において前述したように、本発明は組換え技術による本発明のポリヌクレオチドの生産についても教示している。

対象ポリヌクレオチドは、成熟タンパク質に付加的なアミノ末端またはカルボキシル末端アミノ酸を加えた、または成熟ポリペプチドの内部にアミノ酸を加えた (例えば、成熟型が 2 つ以上のポリペプチド鎖を有している場合) ポリペプチドをコードする。そのような配列は、例えば、前駆体から成熟型へのタンパク質のプロセッシングにおいて役割を果たし、タンパク質輸送を可能にし、タンパク質の半減期を延長または短縮し、検定または生産のためのタンパク質の操作を容易にすると思われる。一般的に *in vivo* の場合と同様に、付加的アミノ酸は細胞の酵素により処理されて成熟タンパク質から離れうる。

【0214】

1 つまたは複数のプロ配列と融合した成熟型のポリペプチドを有する前駆体タンパク質は、不活性型のポリペプチドである可能性がある。プロ配列が除去されるとき、一般にそのような不活性な前駆体は活性化される。活性化の前にプロ配列の一部またはすべてが除去されうる。一般的に、そのような前駆体はプロタンパク質と呼ばれている。

【0215】

したがって、本発明のポリヌクレオチドは、成熟タンパク質、成熟タンパク質 + リーダー配列 (プレタンパク質と呼ばれることがある)、プレタンパク質のリーダー配列ではない 1 つまたは複数のプロ配列を有する成熟タンパク質の前駆体、または、活性型および成熟型のポリペプチドを生産するプロセッシング段階で通常除去されるリーダー配列および 1 つまたは複数のプロ配列を有するプロタンパク質の前駆体であるプレプロタンパク質をコードする。

【0216】

本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチドを発現させるために、上記の宿主／ベクター系を培養することにより調製可能である。組換え生産される対象タンパク質またはその

10

20

30

40

50

一部は、市販のタンパク質濃縮システムのような当技術分野で知られている技術を用い、タンパク質を塩析した後透析することにより、アフィニティークロマトグラフィーにより、あるいは陰イオンまたは陽イオン交換樹脂を用いてさらに精製することができる。

【0217】

成熟タンパク質は、適切なプロモーターの制御下において哺乳類細胞、酵母、細菌またはその他の細胞中で発現させることが可能である。無細胞翻訳系も、本発明のDNA構築物から得られるDNAを用いてそのようなタンパク質を生産するために用いることが可能である。原核および真核宿主とともに用いるための適切なクロニングベクターおよび発現ベクターは、前記のサムブルックら (Sambrook et al.) によって記載されている。

10

【0218】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの異種構造配列をコードする本発明のポリヌクレオチドは一般的に、発現のためのプロモーターと作動可能なように連結するべく標準的な技術を用いてベクターに挿入する。ポリヌクレオチドを、転写開始部位がリボソーム結合部位に対して5'に適切に配されるように位置づけする。リボソーム結合部位は、発現されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドの翻訳を開始するAUGに対して5'に位置することになる。一般的に、開始コドン(通常AUG)で始まりリボソーム結合部位と開始コドンとの間に位置する他の読み取り枠は存在しない。また、一般的に、発現ポリヌクレオチドの末端に翻訳停止コドンが存在し、真核宿主に用いるための構成物にポリアデニル化シグナルが存在する。転写領域の3'末端に適切に配置された転写終結シグナルもポリヌクレオチド構成物に含まれる。

20

【0219】

翻訳されたタンパク質を小胞体内腔、ペリプラズム空間または細胞外の環境へ分泌するために、適切な分泌シグナルを発現ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは、ポリヌクレオチドに対して内因性であってよく、あるいは異種のシグナルであってもよい。タンパク質の発現に用いられる微生物の細胞は、凍結融解の繰り返し、音波処理、機械的破碎または細胞溶解剤の使用などの任意の手頃な方法、または当業者に知られている他のそのような方法により破碎することが可能である。対象ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、硫酸アンモニウム沈殿またはエタノール沈殿、酸による抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロース・クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティ・クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィーおよびレクチン・クロマトグラフィーなどの既知の方法により、組換え細胞の培養物から回収し、精製することが可能である。精製には高速液体クロマトグラフィーを用いることが最も好ましい。単離および/または精製時にポリヌクレオチドが変性する場合、活性な構造を再生するためにタンパク質をリフォールディングするための良く知られた技術を用いることができる。

30

【0220】

本発明の核酸分子は、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子融合システム、例えば、ファルマシア(Pharmacia)のpGEX-1T、pGEX-2TおよびpGEX-3Xにクロニングすることができる。融合遺伝子は、IPTGにより高レベルの発現を誘導し得る強力なlacプロモーターを調節要素として含むことができる。融合産物から所望のポリペプチドをタンパク質分解により切断することを可能にするトロンビンまたはXa因子切断部位が存在してもよい。グルタチオンS-トランスフェラーゼ対象ポリペプチド融合タンパク質は、例えばファルマシア(Pharmacia)製のグルタチオン・セファロース4Bカラムを用いて容易に精製することができる。26kDaのグルタチオンS-トランスフェラーゼポリペプチドを、トロンビン(pGEX-1TまたはpGEX-2T)またはXa因子(pGEX-3X)により切断し、同じアフィニティカラムを用いてポリペプチドから分離することが可能である。必要ならば、例えばセファデックス(Sephadex、登録商標)またはDEAEセルロースを用いた追加のクロマトグラフ工程を含めることが可能である。2つの酵素をタンパク質および酵素検

40

50

定法によりモニターし、純度を SDS-PAGE を用いて確認することができる。

【0221】

対象タンパク質またはその一部を、固相合成（メリフィールド（Merrifield）
、1964年、J. Am. Chem. Assoc. 第85巻、2149～2154ページ）
または均一溶液中の合成（ハウベンウェイルら（Houbenweyl et al.
）、1987年、Method of Organic Chemistry、ワンシュ
イー（Wansch E.）（編）、第15巻、IおよびII、ティーム（Thieme）
[ドイツ所在]）のようなタンパク質の化学においてよく知られている技術を用いて
化学合成によって調製することもできる。

【0222】

本発明の背景において、対象ポリペプチドは生物学的活性を有する様々な構造型の一次タン
パク質を含む。例えば、対象ポリペプチドは酸性塩または塩基性塩の形もしくは中性の
形であってよい。さらに、個々のアミノ酸残基は酸化または還元により修飾されていてよ
い。さらに、最終的な効果としては対象ポリペプチドの生物学的活性が保持されるように
しつつ、様々な置換、削除または付加をアミノ酸または核酸配列に対して行うことができ
る。コードの縮重のため、例えば、同じアミノ酸をコードするヌクレオチド配列中にかなり
の変動が存在しうる。

【0223】

ポリペプチドは、融合タンパク質のような修飾された形態で発現可能であり、また分泌シ
グナルだけでなく付加的な異種の機能領域も備えることができる。したがって、精製時
またはその後の取扱いおよび保存時の宿主細胞中の安定性および持続性を改善するために、
例えば、付加的アミノ酸、特に荷電アミノ酸の領域をポリペプチドのカルボキシル末端ま
たはアミノ末端に付加してもよい。また、精製を容易にするために、融合タンパク質をポ
リヌクレオチドまたはポリペプチドに付加してもよい。そのような領域は、ポリヌクレオ
チドまたはポリペプチドの最終調製の前に除去することができる。とりわけ、分泌または
排出を誘発するため、安定性を改善するため、または精製を容易にするために、ポリヌク
レオチドまたはポリペプチドにペプチド部分を付加することは、当技術分野では通常かつ
常用の技術である。例えば、薬物の発見において、アンタゴニストを特定するためのハイ
スループットスクリーニング検定を目的としてタンパク質が抗体のFc部分と融合されて
いる（ベネットら（Bennett et al.）、1995年、J. Mol. Rec
ognit. 第8巻、52～58ページおよびジョハンソンら（Johanson et
al.）、1995年、J. Biol. Chem. 第270巻、9459～9471ペ
ージを参照のこと）。

【0224】

（抗体）

タンパク質を用いる検査に関して、脂肪調節性遺伝子産物に対する抗体を標準的な免疫学
的技術、本明細書に記載した融合タンパク質または合成ペプチドを用いて生成させること
が可能である。モノクローナル抗体を、ワルドマン ティー エー（Waldmann
T. A.）、1991年、Science、第252巻、1657～1662ページおよ
びハーロウ イーおよびレーン ティー（Harlow E. and Lane D.）
（編）、1988年、Antibodies: A Laboratory Manual
、コールドハーバープレス（Cold Harbour Press）[ニューヨーク州
コールドハーバー（Cold Harbour）所在]に記載されているような現在では
通常の技術を用いて生産することも可能である。抗体フラグメント、すなわちFab'フ
ラグメントを同様に用いることが可能であることも理解できよう。免疫検定法、例えば、
被検試料を抗体と接触させ遺伝子産物への結合を検出するエライザ（ELISA）は、脂
肪酸調節性遺伝子産物の存在および量を測定する迅速かつ効率のよい方法を提供し得る。
例えば、抗体を用いて、臨床試験に登録された被験者における医薬品の効果を試験するこ
とが可能である。

【0225】

したがって、本発明はまた、対象ポリペプチドおよびそのフラグメントに、もしくは対象ポリヌクレオチド領域、特に対象ポリペプチドの遺伝子座またはその一部のポリヌクレオチド配列に特異的に結合することができる、ポリクローナルおよび／またはモノクローナル抗体およびそれらのフラグメントならびにそれらの免疫学的な結合性を有する同等物も提供する。「抗体」という用語は、均質な分子の実体または複数の異なる分子の実体からなる血清製剤のような混合物の両方を称するのに用いられる。ポリペプチドをペプチド合成機で合成により調製し、担体分子（例えば、カサガイヘモシアニン）と結合させ、ウサギに数カ月にもわたり注射してもよい。ウサギ血清を対象ポリペプチドまたはフラグメントに対する免疫反応性について試験する。モノクローナル抗体は、該タンパク質のポリペプチド、融合タンパク質またはそれらのフラグメントをマウスに注射することにより生産することができる。モノクローナル抗体をELISAによりスクリーニングし、対象ポリペプチドまたはそのフラグメントとの特異的な免疫反応性について試験する（ハーロウ イーおよびレーン ディー（Harlow E. and Lane D.）（編）、1988年、Antibodies: A Laboratory Manual、コールドハーバープレス（Cold Harbour Press）〔ニューヨーク州コールドハーバー（Cold Harbour）所在〕）。これらの抗体は、検定だけでなく医薬品においても有用である。

【0226】

十分な量の所望のポリペプチドが得られたならば、様々な目的に用いることができる。一般的な用途は、特異的に結合する抗体の生産である。これらの抗体はポリクローナルまたはモノクローナルのいずれでもよく、当技術分野でよく知られているin vitroまたはin vivoの手法により生産することができる。ポリクローナル抗体を生産するために、適切な標的免疫系、一般的にマウスまたはウサギを選択する。実質的に精製された抗原を、該動物に適した方法および免疫学者によく知られている他のパラメーターによって決まる仕方で免疫系に与える。一般的な注射の経路は、足蹠、筋肉内、腹腔内または皮内である。もちろん、他の動物種をマウスまたはウサギの代わりに用いてもよい。次いで、ポリクローナル抗体を当技術分野において知られている手法を用いて精製し、所望の特性が得られるように調整する。

【0227】

免疫学的反応は通常免疫検定法により検定する。通常、そのような免疫検定法は、例えば抗原と同じ細胞により同じ方法で産生された、抗原の供給源のある程度の精製を必要とする。ハーロウ イーおよびレーン ディー（Harlow E. and Lane D.）（編）、1988年、Antibodies: A Laboratory Manual、コールドハーバープレス（Cold Harbour Press）〔米国ニューヨーク州コールドハーバー（Cold Harbour）所在〕またはゴードینگ ジュー ダブリュー（Goding J. W.）、1996年、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology、第3版、アカデミックプレス（Academic Press）〔米国ニューヨーク所在〕に記載されているような、様々な免疫検定法が当技術分野においてよく知られている。

【0228】

10^8 M^{-1} または好ましくは 10^9 から 10^{10} M^{-1} の、またはより強い親和性を有するモノクローナル抗体は一般的に、ハーロウ イーおよびレーン ディー（Harlow E. and Lane D.）（編）、1988年、Antibodies: A Laboratory Manual、コールドハーバープレス（Cold Harbour Press）〔米国ニューヨーク州コールドハーバー（Cold Harbour）所在〕またはゴードینگ ジュー ダブリュー（Goding J. W.）、1996年、Monoclonal Antibodies: Principles and P

ractice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology、第3版、アカデミックプレス (Academic Press [米国ニューヨーク所在]) に記載されているような標準的方法により調製されるであろう。その概要を述べると、適切な動物を選択し、望ましい免疫化プロトコルに従う。適切な期間の後に、その動物の脾臓を切除し、個々の脾臓細胞を適切な選択条件下で一般に不死化骨髄腫細胞に融合させる。その後、細胞をクローニングにより分離し、各クローンの上清を、抗原の所望の領域に対して特異的な適切な抗体の産生について試験する。

【0229】

他の適切な手法は、リンパ球を抗原性ポリペプチドに *in vitro* で曝露させること、あるいはその代わりにファージまたは類似のベクター中の抗体ライブラリーを選択することを伴う (フーセラ (Huse et al.)、1989年、Science、第246巻、1275~1281ページ)。本発明のポリペプチドおよび抗体は、修飾を施して、あるいは施さずに用いることができる。しばしば、ポリペプチドおよび抗体は、検出可能なシグナルを提供する物質を共有結合または非共有結合させることにより標識されるであろう。様々な標識および複合の手法が知られており、科学および特許文献のいずれにも広範に報告されている。適切な標識としては、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害物質、蛍光物質、化学発光体、磁気粒子等がある。そのような標識の使用を教示している特許は、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号および第4,366,241号などである。また、組換え免疫グロブリンを生産してもよい (米国特許第4,816,567号を参照)。

【0230】

(対象ポリヌクレオチドに対するポリクローナル抗体の生成)

対象ポリヌクレオチドコード配列の配列を大腸菌内で融合タンパク質として発現させる。過剰発現したタンパク質をゲル溶離により精製し、ハーロウ イーおよびレーン ディー (Harlow E. and Lane D.) (編)、1988年、Antibodies: A Laboratory Manual、コールドハーバープレス (Cold Harbour Press) [米国ニューヨーク州コールドハーバー (Cold Harbour) 所在] により記載された方法に類似の方法を用いてウサギおよびマウスを免疫する。この方法は、他の様々なタンパク質に対する抗体を発生させることが示されている (例えば、クレマーら (Kraemer et al.)、1993年、J. Lipid Res.、第34巻、663~671ページ)。

【0231】

概要を示すと、対象ポリヌクレオチドから選択した一続きのコード配列をプラスミド pET5A (ノバジェン (Novagen)、ウィスコンシン州) または pMAL システム (ニューイングランドバイオラボ (New England Biolabs)、米国) に融合タンパク質としてクローニングする。IPTG による誘導の後、予想された分子量を有する融合タンパク質が過剰発現していることを、SDS-PAGE により立証する。融合タンパク質を電気溶出によりゲルから精製する。対象ポリペプチド融合産物としてのタンパク質の同定は、N末端におけるタンパク質配列決定により立証することが可能である。次に、精製タンパク質をウサギにおいて免疫原として用いる。ウサギを完全フロイント・アジュバント中の100 μg タンパク質で免疫し、3週間間隔で2回、最初は不完全フロイント・アジュバント中の100 μg の免疫原を、その後PBS中の100 μg の免疫原を追加投与する。その2週間後に抗体を含む血清を採取する。

【0232】

この手順を繰り返して、対象ポリペプチドの突然変異型に対する抗体を生成させる。これらの抗体を野生型の対象ポリペプチドに対する抗体とともに用いて、種々の組織および体液中の突然変異型の存在および相対レベルを検出する。

【0233】

(対象ポリペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体の生成)

以下のプロトコールに従ってモノクローナル抗体を生成させる。マウスを、よく知られているようにグルタルアルデヒドまたはEDCを用いてカサガイヘモシアニンに結合させた完全な対象ポリペプチドまたはそのペプチド(野生型または突然変異体)からなる免疫原で免疫する。

【0234】

免疫原をアジュバントと混合する。各マウスに10から100 μ gの免疫原を4回注射し、4回目の注射後に、血清が免疫原に対する抗体を含んでいるかどうかを調べるためマウスから血液試料を採取する。血清の力価をELISAまたはRIAにより測定する。免疫原に対する抗体の存在を示す血清を有するマウスをハイブリドーマの生産のために選択する。

10

【0235】

免疫マウスから脾臓を摘出し、ハーロウ イーおよびレン ディー(Harlow E. and Lane D.) (編)、1988年、Antibodies: A Laboratory Manual、コールドハーバープレス(Cold Harbour Press) [ニューヨーク州コールドハーバー(Cold Harbour)所在]に記載されているように、単一細胞懸濁液を調製する。細胞融合は、本質的にコーラー ジーおよびミルスタイン シー(Kohler G. and Milstein C.)、1975年、Nature、第256巻、495~497ページにより記載されているように実施する。その概要を記載すると、P3. 65. 3骨髓腫細胞(American Type Culture Collection、メリーランド州ロックビル(Rockville))をハーロウ イーおよびレン ディー(Harlow E. and Lane D.) (編)、1988年、Antibodies: A Laboratory Manual、コールドハーバープレス(Cold Harbour Press) [ニューヨーク州コールドハーバー所在]により記載されているようにポリエチレングリコールを用いて免疫脾臓細胞と融合させる。細胞を96ウエル組織培養プレートを用いて 2×10^5 細胞/ウエルの密度に蒔く。個々のウエルを生育について調べ、生育の見られるウエルの上清を対象ポリペプチド特異抗体の存在について、野生型または突然変異型の標的タンパク質を用いてELISAまたはRIAにより検査する。陽性ウエル中の細胞を、確立してモノクローン性を確認するべく増殖させ、サブクローニングする。

20

30

【0236】

特徴付けおよび検定法開発用の十分な量の抗体を生産するため、所望の特性を有するクローンをマウスの腹水症として、または中空ファイバーシステム中で拡大かつ増殖させる。

【0237】

(対象ポリペプチドのサンドイッチ検定法)

モノクローナル抗体をプレート、チューブ、ビーズまたは粒子のような固体表面に付着させる。抗体を96ウエルのエライザ(ELISA)プレートのウエル表面に付着させることが好ましい。対象ポリペプチド/タンパク質(野生型または突然変異体)を含む100 μ lの試料(例えば、血清、尿、組織の細胞質ゾル)を固相抗体に加える。試料を室温で2時間インキュベートする。次に、容器を傾けて試料液を除き、結合していない物質を除去するために固相を緩衝液で洗浄する。100 μ lの第2のモノクローナル抗体(対象ポリペプチド/タンパク質上の異なる決定基に対する抗体)を固相に加える。この抗体を検出用分子または原子(例えば、 ^{125} I、酵素、蛍光団または発色団)で標識し、第2抗体の結合した固相を室温で2時間インキュベートする。容器を傾けて第2抗体を除き、結合していない物質を除去するために固相を緩衝液で洗浄する。

40

【0238】

試料中に存在する対象ポリペプチド/タンパク質の量に比例する結合標識の量を定量する。野生型対象ポリペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体ならびに対象ポリペプチドにおいて同定された突然変異のそれぞれに対して特異的なモノクローナル抗体を用いて

50

別個の検定を行う。

【0239】

(脂質代謝の影響を受ける疾患の存在または素因の検出およびその治療のモニタリング)
先に論述したように、疾患においては脂質代謝が無調節であることが多い。脂肪調節性遺伝子における遺伝的多形が疾患感受性に寄与している可能性がある。

【0240】

本明細書に開示する対象ポリヌクレオチドは、診断ツールとして、対象ポリヌクレオチドの遺伝的多形の検出または対象ポリヌクレオチドの発現レベルの変動の検出に有用である。真核生物、詳細には哺乳類、特にヒトにおける対象ポリヌクレオチドの異常な型、あるいは対象ポリヌクレオチドの発現レベルの減少または増加を検出することにより、疾患の診断の方法が提供されるであろう。対象ポリヌクレオチドの遺伝的多形または対象ポリヌクレオチドの発現の変化を示す真核生物（本明細書では「個体」でもある）、詳細には哺乳類、特にヒトは、種々の技術により検出することができる。

10

【0241】

脂肪調節性遺伝子は広く発現しているので、対象の被検試料は、血液を含む様々な組織から得ることが可能である。脂肪調節性遺伝子、DNA、RNAまたはタンパク質は羊水においても評価することが可能であるので、脂肪調節性遺伝子の試験を出生前検査のパネルに含めることも可能である。したがって、脂肪調節性遺伝子転写物および遺伝子産物の定量的検査も本発明の範囲内にあると考えられる。

【0242】

脂肪調節性遺伝子における遺伝的多形をスクリーニングする核酸およびタンパク質に基づく方法はすべて、本発明の教示内容の範囲内にある。例えば、脂肪調節性遺伝子の配列を知れば、DNAプローブまたはRNAプローブを構築し、通常の技術を用いて血液のような組織中のゲノムDNAとのハイブリッド形成により脂肪調節性遺伝子の突然変異を検出するために用いることが可能である。脂肪調節性遺伝子の突然変異または発現の量的変化をスクリーニングするために、RNAプローブまたはcDNAプローブを同様に検索することが可能である。異なるプローブの混合物、すなわち「プローブカクテル」も複数の突然変異の検査に用いることが可能である。

20

【0243】

核酸に基づく検査に関しては、ゲノムDNAを、特定の配列の検出に直接に用いることができ、または、分析の前にPCRを用いて*in vitro*で酵素的に増幅することができる（サイキら（Saiki et al.）、1985年、Science、第230巻、1350～1353ページおよびサイキら（Saiki et al.）、1986年、Nature、第324巻、163～166ページ）。この主題の総説は、カスキーシーティー（Caskey C. T.）、1989年、Science、第236巻、1223～1228ページにより、またランデグレンら（Landegren et al.）、1989年、Science、第242巻、229～237ページにより公開されている。特定のDNA配列の検出は、特異的オリゴヌクレオチドを用いたハイブリッド形成（ワラスら（Wallace et al.）、1986年、Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 第51巻、257～261ページ）、ダイレクトDNAシーケンシング（チャーチら（Church et al.）、1988年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第81巻、1991～1995ページ）、制限酵素の使用（フラベルら（Flavell et al.）、1978年、Cell、第15巻、25～41ページ、ギーバーら（Geever et al.）、1981年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第78巻、5081～5085ページ）、変性剤を含むゲル中の電気泳動の移動度に基づく識別（マイヤーズら（Myers et al.）、1986年、Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 第51巻、275～284ページ）、RNaseプロテクション（マイヤーズら（Myers et al.）、1985年、Science、第230巻、1242～1246ページ）、化学的切断（コットンら（Cotton et

30

40

50

a l.)、1985年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第85巻、4397～4401ページ)およびリガーゼ媒介検出法(ランデグレンら(Landegren et al.)、1988年、Science、第241巻、1077～1080ページ)のような方法により実現することができる。PCRを用いて、個体に存在する対象ポリヌクレオチドのレベルまたは状態の特徴付けを比較分析により行うことができる。

【0244】

タンパク質に基づく検査に関しては、本明細書に記載のように標準的な免疫学的技術、融合タンパク質または合成タンパク質を用いて、脂肪調節性遺伝子産物に対して抗体を生成させることが可能である。

【0245】

脂肪調節性遺伝子産物およびその機能の特徴づけを用いて、脂肪調節性遺伝子の診断およびスクリーニングならびに治療のモニターに、機能検定を用いることも可能である。例えば、脂肪調節性遺伝子または産物の直接的なスクリーニングではなく、遺伝子機能のレベルを調べる酵素学的検査を用いることが可能である。この種の検査は、テイーサックス病におけるように他の疾患および状態に用いられている。

【0246】

したがって、本発明は、対象ポリヌクレオチドの発現の変化または突然変異を検出するための当技術分野で知られている方法および本明細書に記載の方法を用いることにより疾患を検出する方法を提供する。例えば、対象ポリヌクレオチドの発現の低下を、例えば、PCR、RT-PCR、DNaseプロテクション、ノーザンブロット法および他のハイブリッド形成法などのポリヌクレオチドの定量のための当技術分野で知られている方法のいずれか1つを用いて測定することが可能である。したがって、本発明は、脂質代謝の影響を受ける疾患を検出する方法、ならびに湿疹、心血管障害(高トリグリセリド血症、異常脂質血症、アテローム動脈硬化症、冠動脈疾患、脳血管疾患および末梢血管疾患を含むが、これらに限定されない)、炎症(副鼻腔炎、喘息、膵臓炎、骨関節症、慢性関節リウマチおよびざ瘡を含むが、これらに限定されない)、体重異常(肥満、悪液質および食欲不振を含むが、これらに限定されない)、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症などの疾患の遺伝的素因を検出する方法を提供する。

【0247】

(薬物スクリーニング検定)

本明細書の教示により、脂肪酸結合性分子との相互作用のような対象ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの作用を増大する化合物(アゴニスト)または阻害する化合物(アンタゴニスト)を特定するための化合物のスクリーニング方法が提供される。遺伝性の脂肪酸の障害における対象ポリヌクレオチドの特定は、遺伝子組換え法(transgenic methods)の分野における進歩と相まって、ヒトの疾患をさらに研究するのに必要な情報を提供するものである。これは、湿疹、心血管障害(高トリグリセリド血症、異常脂質血症、アテローム動脈硬化症、冠動脈疾患、脳血管疾患および末梢血管疾患を含むが、これらに限定されない)、炎症(副鼻腔炎、喘息、膵臓炎、骨関節症、慢性関節リウマチおよびざ瘡を含むが、これらに限定されない)、体重異常(肥満、悪液質および食欲不振を含むが、これらに限定されない)、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症を含む、家族性の脂肪酸障害および脂肪酸代謝の他の疾患をモデル化するうえで極めて有用である。薬物スクリーニング検定は、酵母を用いるDNA-タンパク質相互作用検定(酵母ワン・ハイブリッド)における本発明で述べている遺伝子の制御領域またはその一部の使用により有効になる。薬物スクリーニングのための酵母タンパク質-タンパク質相互作用(ツー・ハイブリッド)またはタンパク質-RNA相互作用検定における本明細書に記載の遺伝子もしくはその一部または転写RNAの使用も、有効な薬物スクリーニング法を提供する。そのような相互作用する分子を、薬物スクリーニングの目的で、in vitroで再構成することも可能である。

【0248】

例えば、アゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニングのために、合成反応の混合物

10

20

30

40

50

、膜、細胞包膜もしくは細胞壁のような細胞画分、またはそのいずれかの調製物を、対象ポリヌクレオチドに結合する分子を発現する細胞から調製することができる。調製物を、アゴニストまたはアンタゴニストの可能性のある候補分子の非存在下または存在下で標識ポリヌクレオチドとともにインキュベートする。候補分子が結合性分子に結合する能力は、標識リガンドの結合性の低下に反映される。

【0249】

潜在的なアゴニストおよびアンタゴニストの脂肪酸様の作用を、例えば、候補分子と細胞または適切な細胞調製物との相互作用の後にリポーターシステムの活性を測定し、作用をベースライン（対照）の測定と比較することにより、測定することができる。この点で有用であると思われるリポーターシステムは、産物に変換される比色定量用標識基質、脂肪酸酵素活性の変化に応答するリポーター遺伝子、および当技術分野で知られている結合検定を含むが、これらに限定されない。

10

【0250】

アンタゴニストの検定の他の例は、競合的阻害試験用の適切な条件下で、対象ポリペプチドおよび潜在的なアンタゴニストを、膜に結合した対象ポリペプチド結合性分子、組換えの対象ポリペプチド結合性分子、天然の基質またはリガンド、もしくは基質またはリガンドの擬態物と組み合わせる競合試験である。潜在的アンタゴニストの有効性を評価するために、結合性分子に結合または産物に変換される対象ポリペプチド分子の数を正確に測定することができるように、対象ポリペプチドを放射能または比色定量用化合物などで標識することが可能である。

20

【0251】

潜在的アンタゴニストは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドに結合し、それによりその活性を阻害または消失させる小有機分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体などである。潜在的アンタゴニストは、対象ポリペプチドによって誘導される活性を誘導することなく、結合性分子上の同じ部位に結合し、その結果、対象ポリペプチドの結合を遮断することにより対象ポリペプチドの作用を妨げる、密接に関連するタンパク質または抗体のような小有機分子、ペプチド、ポリペプチドであってもよい。潜在的アンタゴニストとして、アンチセンス分子（オカノら（Okano et al.）、1988年、EMBO J. 第7巻、3407～3412ページ）などが挙げられる。潜在的アンタゴニストは、対象ポリペプチドに関連する化合物およびその誘導体などである。

30

【0252】

潜在的アンタゴニストは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドに結合し、それにより、その活性を阻害または消失させる小有機分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体などである。潜在的アンタゴニストは、小有機分子、ペプチド、ポリペプチド、アンチセンス分子、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、脂肪酸ならびにそれらの化学的および機能的誘導体からなる群から選択することができる。

【0253】

特定の脂肪調節性タンパク質の生物学的活性のモジュレーターの開発には、個々の検定用調製物に存在する脂肪により制御されるイソ酵素を区別する必要がある。天然の組織供給源から脂肪調節性タンパク質を単離し、各々の新規なイソ酵素を研究するという古典的アプローチを用いてもよい。他のアプローチは、1つのイソ酵素の寄与に有利で、調製物中の他のイソ酵素の寄与を最小限にするような検定条件を特定することである。さらに他のアプローチは、免疫学的手段による脂肪調節性タンパク質の分離である。脂肪により制御されるイソ酵素を区別する前記のアプローチは、時間がかかるものである。そのため、複数のイソ酵素を含む調製物を用いて、選択的な脂肪調節性タンパク質のモジュレーターを開発する多くの試みが行われた。さらに、天然の組織供給源からの脂肪調節性タンパク質の調製物は限定的タンパク質分解を受けやすく、完全長の脂肪調節性タンパク質と異なる速度論的特性、調節特性および生理学的特性を有する活性のあるタンパク質分解産物の混合物を含んでいる可能性がある。

40

【0254】

50

本発明の組換え対象ポリペプチド産物は、新規かつ特異的なモジュレーターの開発を著しく促進する。内因性脂肪調節性タンパク質の活性を欠く宿主細胞中でイソ酵素を組換えにより発現させることによって、イソ酵素を精製する必要を回避可能である。脂肪調節性タンパク質の活性を調節する化合物が発見されたならば、特定の対象酵素に対するその活性を他の脂肪により制御されるイソ酵素に対するその活性と比較することにより、その選択性を評価することが可能である。したがって、一連の独立した検定における本発明の組換え対象ポリペプチド産物と他の組換え脂肪調節性タンパク質産物との組合せが、特定の脂肪調節性タンパク質の選択的モジュレーターを開発するためのシステムを提供する。選択的モジュレーターとしては、例えば、対象ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに特異的に結合する抗体および他のタンパク質またはペプチド、対象ポリペプチド（標的生体分子に選択的に結合するオリゴヌクレオチドを選択する方法を記載している特許協力条約国際公開第WO93/05182号を参照）または対象ポリヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）に特異的に結合するオリゴヌクレオチド、および対象ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに特異的に結合する他の非ペプチド性の天然または合成化合物などがある。対象ポリペプチドの酵素活性または細胞内のその局在性を変化させる対象ポリヌクレオチドの突然変異型も考えられる。単独およびモジュレーターと結合した組換え対象ポリペプチドの結晶化、X線結晶学による原子構造の解析およびそれらの構造のコンピュータモデリングは、非ペプチド性の選択的モジュレーターの設計と最適化とに有用な方法である。構造に基づく薬物設計の一般的総説については、例えば、エリックソンら（Ericsson et al.）、1992年、Ann. Rep. Med. Chem. 第27巻、271～289ページを参照のこと。

10

20

【0255】

選択的モジュレーターの開発の標的は、例えば（1）他のタンパク質に接触かつ／または対象の脂肪調節性タンパク質を細胞内に局在化する、同タンパク質の領域、（2）基質に結合する同タンパク質の領域、および（3）対象ポリペプチドのリン酸化部位などである。

【0256】

したがって、本発明は、脂質により影響を受ける障害を促進する化合物をスクリーニングし、選択する方法を提供する。また、本発明は、湿疹、心血管障害（高トリグリセリド血症、異常脂質血症、アテローム動脈硬化症、冠動脈疾患、脳血管疾患および末梢血管疾患を含むが、これらに限定されない）、炎症（副鼻腔炎、喘息、脾臓炎、骨関節症、慢性関節リウマチおよびざ瘡を含むが、これらに限定されない）、体重異常（肥満、悪液質および食欲不振を含むが、これらに限定されない）、精神障害、癌、嚢胞性線維症、月経前症候群、糖尿病および糖尿病合併症などの脂質代謝に関連する疾患ならびに脂質代謝に必ずしも関連しない他の疾患を治療またはその進行を抑制する化合物をスクリーニングし、選択する方法を提供する。

30

【0257】

（脂肪調節性遺伝子のDNA制御領域、CDSおよびRNAに関するタンパク質相互作用検定）

タンパク質相互作用は、細胞内の事実上あらゆる生物学的プロセス、例えば、代謝、輸送、シグナル伝達および疾患に密接に関連している。酵母ツー・ハイブリッドおよびワン・ハイブリッド・システムの開発により、in vivoでのタンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-DNA相互作用またはタンパク質-RNA相互作用を研究し、特定することが可能になった（フィールズ エスおよびソング オー（Fields S. and Song O.）、1989年、Nature、第340巻、245～246ページ、ウルマソフら（Ulmasov et al.）、1997年、Science、第276巻、1865～1868ページ、フルヤマ ケーおよびサッサ エス（Furuyama K. and Sassa S.）、2000年、J. Clin. Invest. 第105巻、757～764ページ、およびギウリスら（Gyuris et al.）、1993年、Cell、第75巻、791～803ページ）。これらの相互作用は細胞の

40

50

機能にとって重要なものであるので、相互作用するパートナーを特定することが、機能および病態への関与の解明に向けての第1段階である。そのような相互作用を調節する（阻害または活性化する）新規な化学物質は、ヒト、動物ならびに植物の疾患において著しい製薬上および治療上の利益をもたらすと思われる。鉄芽球性貧血患者において、スクシニルCoAシンテターゼとヘム生合成酵素 δ -アミノレブリン酸シンターゼ-E (ALAS-E) との間の相互作用が阻害されていることが現在知られている（フルヤマ ケーおよびサッサ エス (Furuyama K. and Sassa S.)、2000年、J. Clin. Invest. 第105巻、757～764ページ）。小分子-RNA相互作用によるヒト細胞における遺伝子発現の阻害が最近説明された（ファンら (Hwang et al.)、1999年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第96巻、12997～13002ページ）。タンパク質-RNA阻害技術の使用は、抗HIV療法の開発への有望なアプローチである（ハミーら (Hamy et al.)、1997年、Proc. Natl. Acad. Sci. 第94巻、3548～3553ページおよびメイら (Mei et al.)、1998年、Biochemistry、第37巻、14204～14212ページ）。

【0258】

（薬物デザイン）

本発明のアンタゴニストおよびアゴニストならびにその他の化合物は、単独または治療用化合物のような他の化合物とともに用いることができる。医薬組成物は、例えば、罹患部位に直接マイクロインジェクションすることにより、または静脈内もしくは他の経路により投与するなどの任意の効果的で都合のよい方法で投与可能である。本発明の組成物を、対象者に投与するのに適した医薬の担体のような、細胞、組織もしくは生物とともに使用するための非滅菌または滅菌済の1つまたは複数の担体と組み合わせて使用してもよい。そのような組成物は、例えば、培地添加物または治療上有効な量の本発明のアンタゴニストもしくはアゴニストおよび医薬として許容可能な担体もしくは賦形剤からなる。そのような担体には、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組合せがあるがこれらに限定されない。製剤は投与方法に適するように調製される。

【0259】

脂肪調節性遺伝子の機能の調節は、脂肪調節性の代謝系遺伝子のタンパク質の構造または機能の様々な側面と相互作用するようにデザインし得る治療薬または薬物を使用することにより達成することが可能である。例えば、薬物または抗体は、タンパク質の折りたたみ構造に結合して、欠陥のある構造を是正し得る。あるいは、薬物は特定の機能残基に結合して、基質または補因子に対するその親和力を増加させ得る。薬物または作用物質の有効性は、欠陥のある脂肪調節性遺伝子のタンパク質が発現する細胞系中で*in vitro*で調節をモニターするスクリーニングプログラムにより確認することが可能である。

【0260】

あるいは、そのようなタンパク質の構造と機能との相関についての知見、および様々な突然変異タンパク質における特異的欠陥についての知見から、脂肪調節性遺伝子のタンパク質の活性を調節するように薬物をデザインすることが可能である（コプゼイら (Copsy et al.)、1988年、Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs、ストックトンプレス (Stockton Press)、ニューヨーク）。

【0261】

（遺伝子治療）

対象ポリヌクレオチドの発現を*in vivo*で調節するために、本発明による種々の遺伝子治療法を用いることができる。例えば、アンチセンスDNA分子を工学設計し、対象ポリヌクレオチドのmRNAの翻訳を*in vivo*で遮断するために用いることができる。代替案としては、対象ポリヌクレオチドのmRNAを*in vivo*で切断し破壊するためにリボザイム分子を設計することができる。別の選択肢では、対象ポリヌクレオチ

ドの5'領域(コード配列の上流の領域を含む)とハイブリッド形成し、3重らせん構造を形成するように設計したオリゴヌクレオチドを用いて、対象ポリヌクレオチドの転写を阻害または減少させることができる。さらに別の選択肢では、完全長の野生型対象ポリヌクレオチドをコードする核酸を、さもないれば野生型対象ポリヌクレオチド産物を十分な量であるいは全く産生することができない細胞に*in vivo*で導入することができる。

【0262】

例えば、従来の置換療法では、遺伝子産物またはその機能上の同等物を治療上有効な量で患者に投与する。脂肪調節性遺伝子のタンパク質は、ドイチャー エム (Deutcher M.) (編) 1990年、*Guide to Protein Purification. Meth. Enzymol.* 第182巻に記載されているような通常の手法を用いて精製することが可能である。治療用の十分な量の遺伝子産物またはタンパク質は、例えば、培養細胞系または合成による製造により得ることが可能である。遺伝子産物を刺激または置換する薬物療法も用いることが可能である。送達媒体およびスキームを、特定の標的遺伝子に合わせて特別に調整することが可能である。

10

【0263】

遺伝子を患者の細胞またはベクター(患者に遺伝子産物を*in vivo*で供給する)に送達するための組換え技術を用いる遺伝子治療も、本発明の範囲内である。レトロウイルスは、体細胞遺伝子治療における実験用の好ましいベクターとみなされており、感染効率が強く、安定な組込みと発現を示す(オーキンら(Orkin et al.)、1988年、*Prog. Med. Genet.* 第7巻、130~142ページ)。例えば、脂肪調節性遺伝子のcDNAをレトロウイルスベクターにクローニングし、その内因性プロモーターから、またはレトロウイルスLTR(末端反復配列)から駆動することができる。使用可能な他の送達系は、アデノ随伴ウイルス(AAV)(マクラウフリンら(McLaughlin et al.)、1988年、*J. Virol.* 第62巻、1963~1973ページ)、ワクシニアウイルス(モスら(Moss et al.)、1987年、*Annu. Rev. Immunol.* 第5巻、305~324ページ)、ウシパピローマウイルス(ラスムッセンら(Rasmussen et al.)、1987年、*Meth. Enzymol.* 第139巻、642~654ページ)またはエプスタインバーウイルスのようなヘルペスウイルス群のメンバー(マルゴルスキーら(Margolske et al.)、1988年、*Mol. Cell. Biol.* 第8巻、2837~2847ページ)などである。

20

30

【0264】

アンチセンス、リボザイムおよび3重らせんヌクレオチドを、対象ポリヌクレオチドの翻訳または転写を阻害するようにデザインする。これを実現するためには、使用するオリゴヌクレオチドを、対象ポリヌクレオチドに特有の適切な配列に基づいてデザインすべきである。例えば、限定の意図はないが、オリゴヌクレオチドは、対象ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が他のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列とほぼ相同である領域(本明細書では「固有領域」と称する)の中にあるべきでない。

【0265】

アンチセンス分子の場合、配列を固有領域から選択することが好ましい。また、配列の翻訳を防ぐべく標的mRNA配列との十分に強いアニーリングを実現するために、配列の長さが少なくとも18ヌクレオチドであることも好ましい(イザント ジェー ジーおよびワイントラウプ エッチ(Izant J. G. and Weintroub H.)、1984年、*Cell*、第36巻、1007~1015ページおよびローゼンブルグら(Rosenberg et al.)、1985年、*Nature*、第313巻、703~706ページ)。

40

【0266】

「ハンマーヘッド」タイプのリボザイムの場合、リボザイムの標的配列を固有領域から選択することも好ましい。リボザイムは、高度に特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性を有

50

するRNA分子である。ハンマーヘッドリボザイムは、標的RNAの少なくとも一部とヌクレオチド配列が相補的であるハイブリッド形成領域と標的RNAを切断するように構成された触媒領域とからなる。ハイブリッド形成領域は、9個またはそれ以上のヌクレオチドを含んでいる。したがって、該ハンマーヘッドリボザイムは、上記の配列と相補的であり、長さが少なくとも9ヌクレオチドであるハイブリッド形成領域を有する。そのようなリボザイムの構成と生産は当該技術分野においてよく知られており、ハーゼロフ ジェーおよびゲルラヒ ダブリュ エル (H a s e l o f f J. a n d G e r l a c h W. L.)、1988年、Nature、第334巻、585～591ページにより十分に記載されている。

【0267】

リボザイムには、天然にTetrahymena Thermophilaに存在し (I V SまたはL-19 I V S RNAとして知られている)、トーマス セヒ (T h o m a s C e c h) および共同研究者らにより広範に記載されている (ザウラ (Z a u g e t a l.)、1984年、Science、第224巻、574～578ページ、ザウ エー ジェーおよびセヒ ティー アール (Z a u g A. J. a n d C e c h T. R.)、1986年、Science、第231巻、470～475ページ、ザウラ (Z a u g e t a l.)、1986年、Nature、第324巻、429～433ページ、特許公開条約国際特許出願公開第WO88/04300号、ビーン エム ディー およびセヒ ティー アール (B e e n M. D. a n d C e c h T. R.)、1986年、Cell、第47巻、207～216ページ) RNAエンドリボヌクレアーゼのようなRNAエンドリボヌクレアーゼ (以後「Cec hタイプリボザイム」と称する) も含まれる。Cec hエンドリボヌクレアーゼは、標的RNA配列とハイブリッド形成し、その後、標的RNAの切断が起こる8塩基対の活性部位を有する。Cec hタイプリボザイムの標的である8塩基対の活性部位配列は、対象ポリヌクレオチドに存在するが、脂肪調節性タンパク質の他のポリヌクレオチドには存在しない。

【0268】

化合物は、送達媒体としてのリボソームの使用を含むがこれに限定されない、当技術分野において知られている様々な方法により投与することが可能である。裸のDNAまたはRNAも、末端の修飾、環状分子の形成、もしくはホスホチオネートおよびチオホスホリル修飾された結合などの別の結合の使用により、分解に対して抵抗性のある形態である場合には使用することができる。さらに、核酸の送達は、核酸分子がポリリシンまたはトランスフェリンに結合している促進輸送によってもよい。核酸を、レトロウイルス、ワクシニア、アデノ随伴ウイルスおよびアデノウイルスを含むがこれらに限定されない様々なウイルス担体のいずれかにより細胞内に輸送することもできる。

【0269】

代替案として、そのようなアンチセンス、リボザイム、3重らせんもしくは対象ポリヌクレオチド分子をコードするかまたはこれらのいずれかである組換え核酸分子を構築することが可能である。核酸分子はRNAでもDNAでもよい。仮に核酸がRNAをコードしている場合、所望のRNA産物が十分なコピー数生産されるように、その配列を調節要素に作動可能なように連結させることが好ましい。調節要素により、配列の恒常的または制御された転写が可能にする。1つまたは複数のRNAをコードする細菌プラスミドまたはウイルスRNAもしくはウイルスDNAのような転移ベクターを、細胞または生物の細胞内にトランスフェクションすることができる (レウェリンら (L l e w e l l y n e t a l.)、1987年、J. Mol. Biol. 第195巻、115～123ページ、ハナハンら (H a n a h a n e t a l.)、1983年、J. Mol. Biol. 第166巻、557～580ページ)。ひとたび細胞内に入れば、転移ベクターは複製することができ、細胞内のポリメラーゼにより転写されてRNAを生産するか、または宿主細胞のゲノムに組み込まれることもある。あるいは、転移ベクターまたはその一部が宿主細胞のゲノムに組み込まれるように、1つまたは複数のRNAをコードする配列を含む転移ベクターをマイクロインジェクションのようなマイクロマニピュレーション法により細胞

10

20

30

40

50

にトランスフェクションするか、細胞に導入することができる。

【0270】

(医薬組成物の組成、製剤および投与)

本発明の医薬組成物は、それ自体知られている方法、例えば、通常の混合、溶解、造粒、糖衣丸調製、研和、乳化、カプセル封入、封入または凍結乾燥工程により製造することができる。

【0271】

したがって、本発明に従って使用する医薬組成物は、医薬として使用し得る製剤への活性化化合物の処理を容易にする賦形剤および補助剤を含む1つまたは複数の生理学的に許容できる担体を用いて通常の方法で調合することができる。適切な製剤は、選択する投与経路によって決まる。 10

【0272】

注射の場合、本発明の作用物質は、水溶液、好ましくは、ハンクス液、リンガー液または生理食塩水緩衝液のような生理学的に適合する緩衝液を用いて調合することができる。経粘膜投与の場合、透過すべきバリアに適した浸透剤を製剤に用いる。そのような浸透剤は当該技術分野において一般的に知られている。

【0273】

経口投与の場合、活性化化合物を当分野でよく知られた医薬として許容できる担体と混合することにより、該化合物を容易に調合することが可能である。そのような担体は、本発明の化合物を、治療を受ける患者が経口摂取するための錠剤、丸薬、糖衣丸、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー、懸濁剤等に調合することを可能にする。経口投与用の医薬製剤は、望ましければ錠剤または糖衣丸コアを得るために適切な補助剤を添加した後に、固体賦形剤を用いて（任意選択で得られた混合物を粉碎し、粒剤の混合物を処理して）得ることが可能である。適切な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールなどの糖またはセルロース調製物（例えばトウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび／またはポリビニルピロリドン）のような、増量剤である。望ましい場合、架橋ポリビニルピロリドン、寒天またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムを始めとするその塩のような崩壊剤を加えてもよい。 20 30

【0274】

糖衣丸コアには、適切なコーティングを施す。この目的のために、任意選択でアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポール (carbopol) ゲル、ポリエチレングリコールおよび／または二酸化チタン、ラッカー溶液および適切な有機溶媒または溶媒混合物を含みうる高濃度の糖溶液を用いることができる。識別または活性化化合物の用量の異なる組合せを特徴づけるために、染料または色素を錠剤または糖衣丸コーティングに加えてもよい。

【0275】

経口で使用し得る医薬製剤には、ゼラチン製の押込みばめカプセル、ならびにゼラチンとグリセロールまたはソルビトールのような可塑剤とで調製した軟性封入カプセルなどがある。押込みばめカプセルには、ラクトースのような増量剤、デンプンのような結合剤および／またはタルクもしくはステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤、および任意選択で安定剤との混合物の形で有効成分を含めることが可能である。軟性カプセルにおいては、活性化化合物は脂肪油、流動パラフィンもしくは液状ポリエチレングリコールのような適切な液体に溶解または懸濁してよい。さらに、安定剤を加えてもよい。経口投与用のすべての製剤は、そのような投与に適した用量のものであるべきである。 40

【0276】

口腔内投与の場合、組成物は通常の方法で調合した錠剤またはトローチ剤の形態とすることができる。

吸入投与の場合、本発明に従って使用する化合物を、適切な噴射剤、例えば、ジクロロジ 50

フルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロメタン、二酸化炭素または他の適切なガスを用いた加圧容器または噴霧器からのエアゾール噴霧の形で適宜送達する。加圧エアゾールの場合、用量単位は一定量を送達する弁を設けることにより決定することができる。吸入器または吹き入れ器において使用するカプセルおよびカートリッジ（例えばゼラチン）を、化合物とラクトースまたはデンプンのような適切な粉末基剤との粉末混合物を含めて製剤化することができる。

【0277】

化合物は、注射、例えばボーラス注射または持続注入による非経口投与用に製剤化することができる。注射用製剤は、保存料を加えて単位用量の剤形（例えばアンプルまたは複数回分容器入り）とすることができる。組成物は、油性もしくは水性媒体中の懸濁剤、溶液または乳剤のような形態とすることができ、懸濁化剤、安定化剤および／または分散剤のような調合助剤を含んでいてよい。

10

【0278】

非経口投与用医薬製剤としては、水溶性の形態の活性化合物の水溶液などがある。さらに、活性化合物の懸濁剤を適切な油性懸濁注射剤として調製することができる。適切な親油性溶媒または媒体としては、ゴマ油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームなどがある。水性懸濁注射剤は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランのような懸濁剤の粘度を高める物質を含んでもよい。任意選択で、懸濁剤は、適切な安定化剤や、または高度に濃縮された溶液の調製を可能にするために化合物の溶解度を高める作用物質を含んでもよい。

20

【0279】

あるいは、有効成分は、使用前に適切な媒体（例えば発熱物質非含有滅菌水）で構成するために粉末状でもよい。

化合物は、例えば、ココアバターまたは他のグリセリドのような通常の坐剤基剤を含む坐剤または停留浣腸剤のような直腸内組成物として製剤化してもよい。

【0280】

前述の製剤に加えて、化合物をデポ製剤として調合してもよい。そのような長時間作用する製剤は、埋め込み（例えば皮下または筋肉内）または筋肉内注射により投与することができる。したがって、例えば化合物を適切な高分子材料もしくは疎水性材料（例えば許容し得る油中乳剤として）またはイオン交換樹脂を用いて、あるいはやや溶けにくい誘導体として、例えばやや溶けにくい塩として製剤化してもよい。

30

【0281】

本発明の疎水性化合物用の医薬用担体は、ベンジルアルコール、非極性界面活性剤、水混和性有機高分子および水相からなる共溶媒系である。当然、共溶媒系の割合は、その溶解性および毒性特性を失うことなく、大幅に変えてもよい。さらに、共溶媒成分の実体を変えてもよい。

【0282】

あるいは、疎水性医薬化合物の他の送達系を用いることができる。リポソームおよび乳剤は、疎水性薬物の送達媒体または担体のよく知られている例である。通常毒性がより大きいという犠牲を払うが、ジメチルスルホキシドのような特定の有機溶媒も用いることができる。さらに、化合物は、治療薬を含む疎水性固体高分子の半透過性マトリックスのような徐放性システムを用いて送達することができる。様々な徐放性材料が確立されており、当業者によく知られている。徐放性カプセル剤は、それらの化学的性質によって、化合物を数週間から最長100日間にわたり放出する。治療薬の化学的性質および生物学的安定性によっては、タンパク質の安定化のために追加の戦略を用いてもよい。

40

【0283】

医薬組成物は、適切な固相またはゲル相の担体または賦形剤を含んでいてもよい。そのような担体または賦形剤としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチンおよびポリエチレングリコールのような高分子などがある。

50

るが、これらに限定されない。

【0284】

本発明の化合物の多くは、医薬として適合しうる対イオンを有する塩として提供されうる。医薬として適合しうる塩は、塩化水素、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等を含むがこれらに限定されない多くの酸を用いて形成可能である。塩は、対応する遊離塩基形よりも、水性または他のプロトン性溶媒により溶けやすい傾向がある。

【0285】

適切な投与経路は、例えば、経口、直腸内、経粘膜、経皮または腸内投与、または筋肉内注射、皮下注射、脊髄内注射、ならびに髄膜内注射、脳室内への直接注射、静脈内注射、腹腔内注射、鼻腔内注射もしくは眼内注射などの非経口的送達である。

10

【0286】

あるいは、化合物を全身的でなく局所的に、例えば、罹患部位への化合物の直接注射により、しばしばデポ製剤または徐放性製剤として投与することができる。

【0287】

さらに、薬物を標的指向型薬物送達系、例えば、罹患細胞に特異的な抗体で被覆したリポソームに入れて投与することができる。そのリポソームは、その細胞を標的とし、その細胞によって選択的に取り込まれるであろう。

【0288】

医薬組成物は一般的に、特定の1つまたは複数の適応症の治療または予防に有効な量で投与する。最適用量は、各治療様式および適応症ごとの標準的方法により、徴候、その重症度、投与経路、合併症状等を考慮に入れて決定することは理解される。治療においてまたは予防として、活性物質を注射用組成物として、例えば好ましくは等張性の無菌の水性分散剤として個体に投与することができる。治療上有効な用量は、そのような疾患に伴う症状の改善をもたらすのに有効な化合物の量をさらに表す。本出願の化合物の製剤化および投与の技術については、Remington's Pharmaceutical Sciences、マックパブリッシングカンパニー社(Mack Publishing Co.)、ペンシルバニア州イーストン(Easton)、最新版に見いだすことができる。哺乳類、特にヒトへの投与の場合、活性物質の1日投与量レベルは0.001mg/kg~10mg/kg、一般的に約0.01mg/kgであると予想される。いずれにしても医師は、個体にとって最も適切で、かつ年齢、体重およびその個体の反応により異なる実際の投与量を決定することになる。上記の用量は平均的な場合の例示である。もちろんより高いまたはより低い用量範囲が正当である個別の例があり得るが、そのようなものは本発明の範囲内である。

20

30

【0289】

本発明の化合物は動物(特に哺乳類)の障害(獣医による適用)において特に有用な可能性がある。

本発明はさらに、1つまたは複数の本発明の上記組成物を詰めた1つまたは複数の容器からなる診断用または医薬としての包装物およびキットを提供する。そのような容器には、医薬品もしくは生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関により定められた書式の、ヒトに投与するための該製品の製造、使用または販売についての該政府機関による承認を示す注意書きを添付することができる。

40

【0290】

(実施例)

本発明を、以下の実施例によりさらに説明する。これらの実施例は、本発明のある特定の態様を例示するものであるが、開示された発明の限定を表すものでも、範囲を定めるものでもない。

【0291】

実施例1-P U F Aを補給した飼料を与えたラットの肝臓における差次的遺伝子発現

A. 動物実験

4週齢の雌のウィスター(Wistar)ラット(52~72g)をチャールズリバーカ

50

ナダリミテッド (Charles River Canada Ltd.) から購入し、ケージ当たり 3～4 匹として 4 週間飼育した。ラットを無作為に 6 群に分け、脂肪非含有飼料 (Teklad #940123) を与えた。2 週間後、第 2～6 群に高度に精製された多価不飽和脂肪酸を補給した飼料をさらに 2 週間与えた。各群に対して用いた個別の脂肪酸の濃度は、飼料配合物の総量の 5 % (重量 %) であった。実験計画を以下に示す。

【0292】

第 1 群：脂肪非含有対照

第 2 群：リノール酸 (LA) - ベニバナ油として供給

第 3 群： α -リノレン酸 (ALA) - アマ油として供給

第 4 群： γ -リノレン酸 (GLA) - 1, 3-GLA プロパンジオールとして供給

第 5 群：エイコサペンタエン酸 (EPA) - 1, 3-EPA プロパンジオールとして供給

第 6 群：ドコサヘキサエン酸 (DHA) - 1, 3-DHA プロパンジオールとして供給

10

【0293】

飼料は、油を脂肪非含有飼料に混入して調製した。この混合飼料は、脂肪酸の酸化を防ぐために窒素雰囲気下で -20°C で保存した。給餌は毎日同じ時間に行った。飼料配合物を以下に示す。

【0294】

第 2 群 (LA) - 62.5 g ベニバナ油 + 937.5 g 脂肪非含有飼料

第 3 群 (ALA) - 87.7 g アマ油 + 912.3 g 脂肪非含有飼料

第 4 群 (GLA) - 55.8 g GLA ジオール + 944.3 g 脂肪非含有飼料

第 5 群 (EPA) - 57.9 g EPA ジオール + 942.1 g 脂肪非含有飼料

第 6 群 (DHA) - 59.7 g DHA ジオール + 940.3 g 脂肪非含有飼料

20

ラット (166～229 g) を麻酔下で心臓穿刺により屠殺した。肝臓を生理食塩水で灌流し、摘出して、RNA 抽出に備えて液体窒素中で凍結した。

【0295】

B. ラット肝からの RNA 単離および DNase 処理

0.4 g の各肝臓から製造業者のプロトコールに従って Trizol (登録商標) Reagent (ギブコ (Gibco) BRL) を用いて全 RNA を単離した。混入ゲノム DNA を除去するために、RNA 試料を RQ1 RNase 非含有 DNase (プロメガ (Promega)) とともに 37°C で 30 分間インキュベートした。その後 RNA を沈澱させ、再懸濁して終濃度 0.5 mg/ml とした。

30

【0296】

C. RNA の 1 本鎖 cDNA への逆転写

ディファレンシャル・ディスプレイ反応のための鋳型 cDNA を得るために、RNA の 1 本鎖 cDNA への逆転写を行った。製造業者のプロトコールに従って、 $2\text{ }\mu\text{g}$ の全 RNA を、総容量 $10\text{ }\mu\text{l}$ 中でオリゴ (dT) プライマーを用いた M-MLV 逆転写酵素 (ギブコ (Gibco) BRL) を用いて逆転写した。

【0297】

D. ディファレンシャル・ディスプレイ PCR

ラット肝 cDNA を、10 種の任意の P プライマーと 9 種のアンカー T プライマーとの 90 種の組合せ、ならびに P プライマーのみの 55 種の組合せを用いて増幅した (クロンテック (Clontech)、Delta (登録商標) Differential Display Kit)。対照、GLA、DHA の処理群当たり 3 匹の個々のラット由来の試料を、各プライマー対ごとに合計 9 サンプル調製した。製造業者のプロトコール (クロンテック (Clontech)) に従って、Advantage (登録商標) 2 DNA ポリメラーゼ (クロンテック (Clontech)) を用いてディファレンシャルディスプレイ処理を実施し、合計 55 ng の全 RNA から cDNA を得た。一般的に、可能な場合には 5 プライマー対についての反応をマスターミックスを用いて同時に行った。次いでこれらの試料を 7 M 尿素を含む 4.5% ポリアクリルアミド上で泳動させた。実験を繰り返して、結果を検証した。両実験において差次的 (ディファレンシャル) に発現されたバン

40

50

ドのみについてさらに特徴づけを行った。

【0298】

以下のプライマー（5'から3'方向に示す）を用いた。

【表3】

Pプライマー

P1, ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA;

P2, ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATAG;

P3, ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG;

P4, ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG;

P5, ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG;

P6, ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG;

P7, ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG;

P8, ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG;

P9, ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG;

P10, ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC.

Tプライマー

T1, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAA;

T2, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAC;

T3, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAG;

T4, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCA;

T5, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCC;

T6, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCG;

T7, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGA;

T8, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGC;

T9, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGG.

【0299】

E. 差次的に表示されたバンドのクローニング

差次的に発現された各cDNAフラグメントをゲルから切り出した後、最初にディファレンシャル・ディスプレイ法で用いたのと同じPおよびTまたはPおよびPプライマーの組合せを用いて増幅させた。精製したPCRフラグメント（キアゲン（Qiagen））を線状化したpCRIIベクター（インビトロゲン（Invitrogen））に連結した（ベーリンガー・マンハイム（Boehringer Mannheim）、Rapid DNA Ligation）。製造業者の仕様に従って、10個の個別コロニーからプラスミドDNAを単離し（キアゲン（Qiagen））、ベクター特異的蛍光標識プライマ

10

20

30

40

50

ー (Li-Cor) を用いて両鎖についてそれらの挿入フラグメントの配列決定を行った。配列解析を、Vector NTI (登録商標) Suite (インフォマックスインコーポレイティッド社 (Informax Inc.)) を用いて行った。

【0300】

F. ノーザンブロット分析

ディファレンシャル・ディスプレイ実験で発見された遺伝子の発現パターンを確認するため、かつこれらの遺伝子の転写物のサイズを測定するために、ノーザンブロット分析を行った。サムブルックら (Sambrook et al.)、1989年、Molecular Cloning、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) [ニューヨーク州コールドスプリングハーバー (Cold Spring Harbour) に所在] に従って、1、2、4、5および6 (上記を参照) の各処理群からの3匹の個別のラット由来の8 μ gの全RNAをホルムアルデヒドアガロースゲル上にのせ (ロードし)、電気泳動により分離し、毛細管現象によりナイロン膜 (バイオラッド (BioRad)) に転写した。RNAの膜への転写を、メチレンブルー染色により確認した。ノーザンブロット用のDNAプローブは、差次的に発現された遺伝子由来の部分DNA配列を有するプラスミドから、その挿入DNAを、pCRIIの挿入部位に隣接する両側に結合する2つのプライマー

5'-ACTAGCTAACGGCCGCCAGTGTGCTGG-3' および
5'-TGAGCTGGATATCTGCAGAAATTCGGC-3' を用いて増幅して得た。挿入DNAを、製造業者の仕様に従って、[α -³²P] dCTPおよびReady-To-Go (登録商標) DNA標識ビーズ (アマシャムファルマシアバイオテク (Amersham Pharmacia Biotech)) を用いて標識した。ノーザンブロットを、オースベルら (Ausubel et al.)、1994年、Current Protocols in Molecular Biology、ジョンワイリーアンドサンズ (John Wiley & Sons) [ニューヨーク] に記載のプロトコールにしたがって実施した。膜を42℃で一夜ハイブリッド形成させ、最終的なストリンジェンシーを55℃で0.25×SSC、0.1% SDSとして洗浄した。ロード操作の標準化のために、すべての膜を18S rRNAサブユニットに対するヌクレオチドプローブで探査した。

【0301】

G. ディファレンシャル・ディスプレイにより同定された遺伝子

この実験により、PUFA投与後に発現の変化を示す14個の遺伝子が同定された。この実験から得られたcDNAフラグメントを含む以下の17個のプラスミドは、その14個の固有の遺伝子を示す。

【0302】

【表4】

表1

プラスミド	遺伝子	登録 番号 [†]	DNAフラグメント [‡]			位置 [*]
			開始	終了	総数	
pCr2001.1	MEIP				889	CDS + 3'
pCr2002.1	AIBG				440	CDS + 3'
pCr2003.1	ApoA-1	J02597	1040	1551	558	CDS (444/1485) + 3'
pCr2004.1	COMT	Z12651	131	431	336	CDS (301/795)
pCr2005.1	INSIG1	L13619	820	2363	1587	3'
pCr2006.1	Δ3, Δ2エノイル CoAイソメラーゼ	X61184	-2	608	637	5' + CDS (608/867)
pCr2007.1	FAS	X62888	3215	3513	339	CDS (361/7518)
pCr2008.1	G6PD	X07467	156	1151	1030	CDS (996/1548)
pCr2009.1	G6PD	X07467	1124	2255	1165	CDS (425/1548) + 3'
pCr2010.1	GPAT	M77003	49/2	574/	797	3'
pCr2011.1	Spot-14	K01934	250	1241	1038	CDS (203/453)
pCr2012.1	GLOL	D83198	35	827	838	CDS (648/684) + 3'
pCr2013.1	FTF1	AB017614	755	1706	981	CDS (770/1524) + 3'
pCr2014.1	SCD1	J02585	2175	2677	538	3'
pCr2015.1	SCD1	J02585	3960	4362	439	3'
pCr2016.1	SCD2	AB032243	-235	995	1276	5' + CDS (995/1077)
pCr2017.1	SCD2	AB032243	3915	4719	836	3'

† M77003およびAB017614はマウスヌクレオチド配列を指し、D83198はヒトヌクレオチド配列を指す。その他の登録番号は、すべてラット遺伝子を表す。

‡ 「開始」および「終了」は、翻訳開始コドン(1で示すAUGのA)から数えた、その遺伝子固有の挿入配列の開始位置および終了位置を意味し、「総数」は、遺伝子非特異的な2つのプライマーを含む挿入配列のすべてのヌクレオチドの数である。

* 例えば、ApoA-1のCDS(444/1485) + 3'の場合、プラスミドは全CDS(1485ヌクレオチド)中の444ヌクレオチドおよび3'UTRの114ヌクレオチドを含む。

10

20

30

【 0 3 0 3 】

【 表 5 】

表2

表にノーザンブロットの定量値を投与群当たり3匹の個々のラットの%±標準偏差として示す。すべての膜を18S rRNAサブユニットに対するヌクレオチドプローブで探査し、G6PD、A1BGおよびFTF1を除き、すべての値を18Sに対して標準化する。ただし、ゲル上の異なるレーン間のロード操作の差は通常15%未満である。(N. D. は「検出されず」を示す)。

	脂肪なし	LA	GLA	EPA	DHA
SCD1	100 ± 17	63 ± 20	6 ± 8	N.D.	1 ± 1
SCD2	100 ± 23	63 ± 15	11 ± 6	2 ± 1	4 ± 1
G6PD	100 ± 11	42 ± 27	8 ± 9	15 ± 14	19 ± 7
GPAT	100 ± 35	52 ± 5	15 ± 13	14 ± 10	26 ± 15
FAS	100 ± 33	47 ± 40	17 ± 12	17 ± 14	27 ± 21
Δ3, Δ2エノイル CoAイソメラーゼ	14 ± 18	29 ± 27	33 ± 15	100 ± 35	87 ± 2
COMT	100 ± 32	59 ± 6	45 ± 23	50 ± 4	49 ± 3
ApoA-1	100 ± 24	90 ± 23	32 ± 8	25 ± 4	12 ± 1
Spot-14	100 ± 16	50 ± 6	12 ± 7	19 ± 25	24 ± 18
INSIG1	100 ± 44	49 ± 12	11 ± 2	25 ± 3	13 ± 11
FTF1	100 ± 16	56 ± 15	4 ± 8	10 ± 7	13 ± 12
GLOL	100 ± 17	64 ± 6	37 ± 11	29 ± 15	36 ± 17
METP	10 ± 5	37 ± 7	78 ± 12	100 ± 16	80 ± 28
A1BG	7 ± 9	52 ± 47	14 ± 10	32 ± 30	100 ± 64

10

20

30

40

50

【0304】

実施例2 - rMETPおよびhMETPの哺乳類発現ベクターへのクローニング

A. rMETPの5'末端の入手

rMETPの完全コード配列を含むクローンを、製造業者の指示に従い、Genetrapp (登録商標) cDNA Positive Selection System (ギブコ (Gibco) BRL) を用いて Superscript (登録商標) ラット肝 cDNA ライブラリー (ギブコ (Gibco) BRL) から得た。cDNA ライブラリーを探索し、捕捉された cDNA 標的を修復するのに用いたオリゴヌクレオチドの配列は、5'-GTGGTCTTCGTGGCTTATGAG-3' であった。修復された DNA を用いて、UltraMax (登録商標) DH5α-FT 細胞 (ギブコ (Gibco) BRL) を形質転換した。rMETP を含むコロニーを、遺伝子特異的プライマーとして 5'-GCTACGCCCATGGACGTTATCAAGTCC-3' および 5'-CAGGCAGTATGGCACTTTGA-3' を用いたコロニー PCR により同定した。PCR 反応物には、0.5 μM の各プライマー、各 200 μM の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、2 mM MgCl₂、1×PCR 緩衝液 (ギブコ (Gibco) BRL) および 0.025 U/μl の Platinum (登録商標) Taq ポリメラーゼ (ギブコ (Gibco) BRL) を含めた。PCR 条件は、95℃で2分間；95℃で30秒間、58℃で45秒間および72℃で45秒間を35サイクル；72℃で7分間；であった。プラスミド DNA を選択されたコロニーから単離し、配列を決定した。得られた配列を用いて rMETP の読み取り枠を特定し、遺伝子をサブクローニングするためのプライマーをデザインした。完全コード配列を含むプラスミドを pSr1066.1 と名付けた。

【0305】

B. METPのクローニング

ラットおよびヒトのMETPをPCRによりp cDNA 3.1/Myc-His (+) 哺乳類発現ベクター（インビトロゲン（Invitrogen））へクローニングした。c-mycエピトープとポリヒスチジンペプチドとを含むC末端タグを有するMETPタンパク質（すなわちrMETP/Myc-HisおよびhMETP/Myc-His）またはタグを含まないMETPタンパク質（すなわちrMETPおよびhMETP）を生産するために、各遺伝子について2つのプラスミド構築物を作製した。ラットおよびヒト遺伝子のクローニング用のフォワードプライマーはそれぞれ

【0306】

5' - C A C G C G G G A T C C G C C A C C A T G G A T T T T G T T G C T G G G G C C A T T G G - 3' および

5' - C A C G C G G G T A C C A C G C G T G C C A C C A T G G A T T T T G T C G C T G G A G C C A T C G - 3' ,

【0307】

であった。これらのプライマーは翻訳開始コドンに隣接するKozak共通配列を含む。ラット遺伝子のプライマーはBamHI切断部位（下線部分）を含み、一方、ヒト遺伝子のプライマーはKpnI切断部位（下線部分）を含む。rMETPおよびhMETPをクローニングするためのリバープライマーの配列はそれぞれ

【0308】

5' - A T A T C A C G A T G C G G C C G C C T A T G T G A G C A G G C C C T G A G T G A G C C - 3' および

5' - A T A T C A C G A T G C G G C C G C C T A T G T G A G C A G A C C C C G G G C G A G C - 3' ,

【0309】

であった。これらのプライマーはNotI切断部位（下線部分）を含み、翻訳終止コドンを用意している。rMETP/Myc-HisおよびhMETP/Myc-Hisのクローニング用のリバープライマーはそれぞれ

【0310】

5' - A T A T C A C G A T G C G G C C G C C C A T G T G A G C A G G C C C T G A G T G A G C C - 3' および

5' - A T A T C A C G A T G C G G C C G C C C A T G T G A G C A G A C C C C G G G C G A G C - 3' ,

【0311】

であった。これらのプライマーは、NotI切断部位（下線部分）を含み、終止コドンの3塩基のうちの2塩基のみを有するので、遺伝子はベクターによって供給されるタグを有する枠内に配される。

【0312】

PCRを、製造業者の指示に従ってAdvantage（登録商標）-HFポリメラーゼ（クロンテック（Clontech））を用いて行った。pSr1066.1をrMETP/Myc-Hisを生成させるためのDNA鋳型として用いた。pMr1076.1（下記）をrMETPのDNA鋳型として用いた。Proquest（登録商標）ヒト肝cDNAライブラリー（ギブコ（Gibco）BRL）由来のプラスミドDNAをヒト遺伝子の鋳型として用いた。

【0313】

PCR産物をゲル精製し、NotIおよびBamHI（ラット遺伝子）かKpnI（ヒト遺伝子）のいずれかを用いて消化し、同じ酵素で切断したp cDNA 3.1/Myc-His (+) Aに連結した。連結反応産物を用いて大腸菌株TOP10（インビトロゲン（Invitrogen））を形質転換した。プラスミドを単離し、配列を決定した。rMETP/Myc-HisおよびrMETP用のプラスミドをそれぞれpMr1076.1

10

20

30

40

50

および pMr1076.2 と名付けた。hMETHP/Myc-His および hMETHP の双方について、2つの異なる配列を得た。単離されたもののうち約半分はコード配列の部位404にGを有し (Arg¹³⁵)、半分はこの部位にTを有しており (Leu¹³⁵)、このことは (遺伝特性のスクリーニングに有用となり得る) 遺伝的多型の可能性がある部位であることを示すものである。部位404にGを有する hMETHP/Myc-His および hMETHP 用のプラスミドをそれぞれ pMh1081.1 および pMh1084.1 と名付けた。部位404にTを有する hMETHP/Myc-His および hMETHP 用のプラスミドをそれぞれ pMh1083.1 および pMh1085.1 と名付けた。

【0314】

実施例3-rGLOLおよびhGLOLの哺乳類発現ベクターへのクローニング

10

A. rGLOLの5'末端の入手

rGLOL cDNAの5'末端をPCRによりクローニングした。フォワードプライマーの配列 (5'-CCGGTCTCTCTGCGGCAGATG-3') は、rGLOLのマウスオーソログの5'末端をコードするマウスEST (GenBank登録番号AW106717) に基づくものとした。同プライマーは、5'UTRおよび翻訳開始コドン (下線部分) に相当する。リバープライマー (5'-TGGAAGTCTGTTCGTCCACA-3') は、ディファレンシャル・ディスプレイによって得られたrGLOLクローンに基づくものとした。PCRを、前述 (実施例2) のようにPlatinum (登録商標) Taqポリメラーゼ (ギブコ (Gibco) BRL) を用いて行った。SuperScript (登録商標) ラット肝cDNAライブラリー (ギブコ (Gibco) BRL) から単離したプラスミドDNAを鋳型として用いた。PCR産物をゲル精製し、TAクローニングによりpCRIIベクター (インビトロゲン (Invitrogen)) に挿入した。連結反応産物を用いて大腸菌株TOP10 (インビトロゲン (Invitrogen)) を形質転換した。プラスミドDNAを単離し、配列を決定した。得られた配列を用いて遺伝子をクローニングするためのフォワードプライマーをデザインした。rGLOLの5'末端を含むプラスミドをpCr1067.1と名付けた。

20

【0315】

B. GLOLのクローニング

ラットおよびヒトGLOLをPCRによりpcDNA3.1/Myc-His (+) 哺乳類発現ベクター (インビトロゲン (Invitrogen)) へクローニングした。c-mycエピトープおよびポリヒスチジンペプチドを含むC末端タグを有するGLOLタンパク質 (すなわち rGLOL/Myc-His および hGLOL/Myc-His) またはタグを含まないGLOLタンパク質 (すなわち rGLOL および hGLOL) を生産するために、各遺伝子について2つのプラスミド構築物を作製した。ラットおよびヒト遺伝子のクローニング用のフォワードプライマーはそれぞれ

30

【0316】

5'-CACGCG GGATCC GCCACCATGTTTGAAGCCCAAGAGCTGCACC-3' および

5'-CACGCG GGATCC GCCACCATGTTTCGAGCCTGTGAGCTGCACC-3'

40

【0317】

であった。これらのプライマーは、翻訳開始コドンに隣接するKozak共通配列およびBamHI切断部位 (下線部分) を含む。rGLOLおよびhGLOLのクローニング用のリバープライマーの配列はそれぞれ

【0318】

5'-ATAATCACGAT GCGGCCGC TCAGGAGGGTGGAGTCTGGACCC-3' および

5'-ATAATCACGAT GCGGCCGC TCAGGCAGTGGGTGTCTGGACCC-3'

【0319】

50

であった。これらのプライマーは、N o t I 切断部位（下線部分）を含み、翻訳終止コドンを用意している。r G L O L / M y c - H i s および h G L O L / M y c - H i s のクローニング用のリバースプライマーはそれぞれ

【0320】

5' - A T A T C A C G A T G C G G C C G C C A G G A G G G T G G A G T C T G G A C C C - 3' および

5' - A T A T C A C G A T G C G G C C G C C A G G C A G T G G G T G T C T G C A C C - 3'

【0321】

であった。これらのプライマーは、N o t I 切断部位（下線部分）を含み、終止コドンに必要な3塩基のうちの2塩基のみを有するので、遺伝子はベクターによって供給されるタグを有する枠内に配される。 10

【0322】

PCRは、製造業者の指示に従ってA d v a n t a g e（登録商標）-H Fポリメラーゼ（クロンテック（C l o n t e c h））を用いて行った。S u p e r s c r i p t（登録商標）ラット肝cDNAライブラリー（ギブコ（G i b c o）B R L）からのプラスミドDNAをr G L O L / M y c - H i sを生成させるためのDNA鋳型として用いた。p M r 1 0 7 5 . 1（下記）をr G L O LのDNA鋳型として用いた。P r o q u e s t（登録商標）ヒト肝cDNAライブラリー（ギブコ（G i b c o）B R L）由来のプラスミドDNAをh G L O L / M y c - H i sを生成させるための鋳型として用いた。p M r 1 0 7 2 . 1（下記）をh G L O LのDNA鋳型として用いた。 20

【0323】

PCR産物をゲル精製し、B a m H I およびN o t Iで消化し、同じ酵素で切断したp c D N A 3 . 1 / M y c - H i s（+）Aに連結した。連結反応産物を用いて大腸菌株T O P 1 0（インビトロゲン（I n v i t r o g e n））を形質転換した。プラスミドを単離し、配列を決定した。r G L O L / M y c - H i s および r G L O L 用のプラスミドをそれぞれp M r 1 0 7 5 . 1 および p M r 1 0 7 5 . 2 と名付けた。h G L O L / M y c - H i s および h G L O L 用のプラスミドをそれぞれp M h 1 0 7 2 . 1 および p M h 1 0 7 2 . 2 と名付けた。独立したPCR反応の産物をクローニングし、配列決定を行って確認したヒト遺伝子について得られた配列には、G e n B a n k 登録番号D 8 3 1 9 8 に報告されている配列と異なる1塩基、すなわちコード配列の部位46のGの代わりにAが含まれていた。これにより、G l y¹⁶の代わりにA r g¹⁶となっている。 30

【0324】

実施例4-r F T F 1 および h F T F 1 の哺乳類発現ベクターへのクローニング

A. r F T F 1 の5'末端の入手

r F T F 1 c D N A の5'末端を、製造業者の指示に従ってS M A R T（登録商標）R A C E c D N A 増幅キット（クロンテック（C l o n t e c h））を用いて得た。5'-R A C E - r e a d y c D N A は、S u p e r s c r i p t（登録商標）I I 逆転写酵素（ギブコ（G i b c o）B R L）と、T r i z o l（登録商標）R e a g e n t（ギブコ（G i b c o）B R L）を用いて雌W i s t a r ラットから単離した1 μ g の全脂肪RNAとを用いて調製した。5'-R A C E PCR反応を、1 × A d v a n t a g e（登録商標）-G C c D N A ポリメラーゼ（クロンテック（C l o n t e c h））、対応する緩衝液および0.5 M G C - m e l t（クロンテック（C l o n t e c h））を含む以外は、推奨のとおり設定した。遺伝子特異的プライマーの配列を 40

5' - C T G G A G C A G G G T C C T G T T G G C A G T C T C T - 3'

とした。PCR条件を、94℃で3分間；94℃で30秒間、69℃で10秒間および72℃で3分間を5サイクル；94℃で30秒間、67℃で10秒間および72℃で3分間を5サイクル；94℃で30秒間、65℃で10秒間および72℃で3分間を35サイクル；とした。産物をゲル精製し、T A クローニングによりp C R I I ベクター（インビトロゲン（I n v i t r o g e n））に挿入した。連結反応産物を用いて大腸菌株T O P 1 50

0 (インビトロゲン (Invitrogen)) を形質転換した。プラスミドDNAを単離し、配列を決定した。得られた配列を用いて、rFTF1の読み取り枠を特定し、哺乳類発現ベクターへの遺伝子のクローニング用のフォワードプライマーをデザインした。rFTF1の5'-RACE産物を含むプラスミドをpCr1092.1と名付けた。

【0325】

B. FTF1のクローニング

ラットおよびヒトのFTF1をPCRによりpcDNA3.1/Myc-His(+)哺乳類発現ベクター(インビトロゲン(Invitrogen))へクローニングした。c-mycエピトープおよびポリヒスチジンペプチドを含むC末端タグを有するFTF1タンパク質(すなわちrFTF1/Myc-HisおよびhFTF1/Myc-His)またはタグを含まないFTF1タンパク質(すなわちrFTF1およびhFTF1)を生産するために各遺伝子について2つのプラスミド構築物を作製した。ラットおよびヒト遺伝子のクローニング用のフォワードプライマーをそれぞれ

【0326】

5'-CACGCGGGGTACCCACGCGTGCCACCATTGGACGCCCGTCTTGGAACCTTTCC-3'および

5'-CACGCGGGGTACCCACGCGTGCCACCATTGGACGCCCGTCTTGGAACCTTTCC-3'

【0327】

とした。これらのプライマーは、翻訳開始コドンに隣接するKozak共通配列およびKpnI切断部位(下線部分)を含んでいる。rFTF1およびhFTF1のクローニング用のリバースプライマーの配列を

5'-CACGCGGCTCGAGCTAGGAGAGTTTGATGGTGGTGTGGG-3'

とした。このプライマーは、XhoI切断部位(下線部分)を含み、翻訳終止コドンを用意している。rFTF1/Myc-HisおよびhFTF1/Myc-Hisのクローニング用のリバースプライマーを

5'-CACGCGGCTCGAGGGGAGAGTTTGATGGTGGTGTGGG-3'

とした。このプライマーは、XhoI切断部位(下線部分)を含むが、終止コドンは含まないので、遺伝子はベクターによって供給されるタグを有する枠内に配される。

【0328】

PCRを、製造業者の指示に従ってAdvantage(登録商標)-GCcDNAポリメラーゼおよび1M GC-melt(クロンテック(Clontech))を用いて行った。Superscript(登録商標)ラット肝cDNAライブラリー(ギブコ(Gibco)BRL)由来のプラスミドDNAをラット遺伝子の鋳型として用いた。Proquest(登録商標)ヒト肝cDNAライブラリー(ギブコ(Gibco)BRL)由来のプラスミドDNAをヒト遺伝子の鋳型として用いた。

【0329】

PCR産物をゲル精製し、KpnIおよびXhoIで消化し、同じ酵素で切断したpcDNA3.1/Myc-His(+)Aに連結した。連結反応産物を用いて大腸菌株TOP10(インビトロゲン(Invitrogen))を形質転換した。プラスミドを単離し、配列を決定した。忠実度のあまり高くないAdvantage(登録商標)-GCcDNAポリメラーゼを用いた結果、いくつかのヌクレオチド置換が生じた。いくつかの単離クローンのDNAフラグメントを連結したところ、正しいポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列が得られた。rFTF1/Myc-HisおよびrFTF1用のプラスミドをそれぞれpMr1088.1およびpMr1089.1と名付けた。hFTF1/Myc-HisおよびhFTF1用のプラスミドをそれぞれpMh1090.1およびpMh1091.1と名付けた。

【0330】

実施例 5 - r A 1 B G および h A 1 B G の哺乳類発現ベクターへのクローニング

A. r A 1 B G の 5' 末端の入手

r A 1 B G 遺伝子の 5' 末端を、製造業者の指示に従って S M A R T (登録商標) R A C E c D N A 増幅キット (クロンテック (C l o n t e c h)) を用いて得た。5' - R A C E - r e a d y c D N A を、S u p e r s c r i p t (登録商標) I I 逆転写酵素 (ギブコ (G i b c o) B R L) と、ディファレンシャル・ディスプレイ試験に用いた D H A 補給飼料を与えたラットから単離した 1 μ g の全肝臓 R N A とを用いて調製した。5' - R A C E P C R 反応を、1 × A d v a n t a g e (登録商標) - H F ポリメラーゼミックス (クロンテック (C l o n t e c h)) および対応する緩衝液を含む以外は、製造業者の推奨のとおりに行った。遺伝子特異的プライマーの配列は

5' - C A A C C C T T T C C A A G G G C A C T T T C C T G T G - 3'

であった。産物をゲル精製し、T A クローニングにより p C R I I ベクター (インビトロゲン (I n v i t r o g e n)) に連結させた。連結反応産物を用いて大腸菌株 T O P 1 0 (インビトロゲン (I n v i t r o g e n)) を形質転換した。プラスミド D N A を単離し、配列を決定した。得られた配列を用いて、r A 1 B G の読み取り枠を特定し、哺乳類発現ベクターへの遺伝子のクローニング用のプライマーをデザインした。r A 1 B G の 5' - R A C E 産物を含むプラスミドを p C r 1 0 7 8 . 1 と名付けた。

【0331】

B. A 1 B G のクローニング

ラットおよびヒトの A 1 B G を P C R により p c D N A 3 . 1 / M y c - H i s (+) 哺乳類発現ベクター (インビトロゲン (I n v i t r o g e n)) へクローニングした。c - m y c エピトープおよびポリヒスチジンペプチドを含む C 末端タグを有する A 1 B G タンパク質 (すなわち r A 1 B G / M y c - H i s および h A 1 B G / M y c - H i s) またはタグを含まない A 1 B G タンパク質 (すなわち r A 1 B G および h A 1 B G) を生産するために各遺伝子について 2 つのプラスミド構築物を作製した。ラットおよびヒト遺伝子のクローニング用のフォワードプライマーをそれぞれ

【0332】

5' - C A C G C G G G A T C C G C C A C C A T G T C T C T G T T G A C T A C T G - 3' および

5' - C A C G C G G G A T C C G C C A C C A T G T C C A T G C T C G T G G T C T T T C T C - 3'

【0333】

とした。これらのプライマーは、翻訳開始コドンに隣接する K o z a k 共通配列および B a m H I 切断部位 (下線部分) を含む。r A 1 B G および h A 1 B G のクローニング用のリバースプライマーの配列をそれぞれ

【0334】

5' - A T A T C A C G A T G C G G C C G C T T A G C T A C C T T C T A C T A C A A C T T C C A C A G G G - 3' および

5' - A T A T C A C G A T G C G G C C G C T C A G C T T T C T G C C A C C A G G A G C - 3'

【0335】

とした。これらのリバースプライマーは、N o t I 切断部位 (下線部分) を含み、翻訳終止コドン을備えている。r A 1 B G / M y c - H i s および h A 1 B G / M y c - H i s のクローニング用のリバースプライマーをそれぞれ

【0336】

5' - A T A T C A C G A T G C G G C C G C T T G C T A C C T T C T A C T A C A A C T T C C A C A G G G - 3' および

5' - A T A T C A C G A T G C G G C C G C C A G C T T T C T G C C A C C A G G A G C - 3'

【0337】

10

20

30

40

50

とした。これらのプライマーは、N o t I 切断部位（下線部分）を含み、終止コドンに必要な3塩基のうちの2塩基のみを有するので、遺伝子はベクターによって供給されるタグを有する枠内に配される。

【0338】

PCRを、製造業者の指示に従ってA d v a n t a g e（登録商標）－H Fポリメラーゼ（クロンテック（C l o n t e c h））を用いて行った。r A 1 B Gの5'末端を得るのに用いた5'－R A C E－r e a d y c D N Aをラット遺伝子のD N A鋳型として用いた。P r o q u e s t（登録商標）ヒト肝c D N Aライブラリー（ギブコ（G i b c o）B R L）由来のプラスミドD N Aをヒト遺伝子の鋳型として用いた。

【0339】

PCR産物をゲル精製し、B a m H IおよびN o t Iで消化し、同じ酵素で切断したp c D N A 3.1 / M y c－H i s（+）Aに連結した。連結反応産物を用いて大腸菌株T O P 1 0（インビトロゲン（I n v i t r o g e n））を形質転換した。プラスミドを単離し、配列を決定した。r A 1 B G / M y c－H i sおよびr A 1 B G用のプラスミドをそれぞれp M r 1 0 8 2.1およびp M r 1 0 7 7.1と名付けた。h A 1 B G / M y c－H i sおよびh A 1 B G用のプラスミドをそれぞれp M h 1 0 8 7.1およびp M h 1 0 8 6.1と名付けた。

【0340】

実施例6－h G P A Tの哺乳類発現ベクターへのクローニング

ヒトG P A TをPCRによりp c D N A 3.1 / M y c－H i s（+）哺乳類発現ベクター（インビトロゲン（I n v i t r o g e n））へクローニングする。フォワードプライマー

5'－C A C G C G G G A T C C G C C A C C A T G G A T G A A T C T G C A C T G A C C C T T G G－3'

は、翻訳開始コドンに隣接するK o z a k共通配列およびB a m H I切断部位（下線部分）を含んでいる。リバープライマー

5'－A T A T C A C G A T G C G G C C G C C T A C A G C A C C A C A A A A C T C A G A A T A T A T T C T A G－3'

は、N o t I切断部位（下線部分）を含み、翻訳終止コドン进行備えている。

【0341】

PCRを、製造業者の指示に従ってA d v a n t a g e（登録商標）－H F 2ポリメラーゼ（クロンテック（C l o n t e c h））およびP r o q u e s t（登録商標）ヒト肝c D N Aライブラリー（ギブコ（G i b c o）B R L）由来のプラスミドD N Aを用いて実施する。

【0342】

PCR産物をゲル精製し、B a m H IおよびN o t Iで消化し、同じ酵素で切断したp c D N A 3.1 / M y c－H i s（+）Aに連結する。連結反応産物を用いて大腸菌株T O P 1 0（インビトロゲン（I n v i t r o g e n））を形質転換する。プラスミドを単離し、配列を決定する。

【0343】

実施例7－ヒトS C D制御領域のクローニング

ヒトS C Dプロモーターをヒト白血球ゲノムD N Aからクローニングした。血液を本発明者らの研究室のボランティアから採取し、ゲノムD N Aの調製に用いた。A T Gの上流の部位－1981bp～－12bpに相当する制御領域をフォワードおよびリバーの合成プライマーを用いて増幅した。プラスミドp G L 3－b a s i c（プロメガ（P r o m e g a））へのクローニングを容易にするために、制限酵素B g l I Iの認識配列（増幅する配列内に存在しない）をフォワードおよびリバープライマーの末端に導入した。

【0344】

PCR増幅によるヒトS C D制御領域のクローニングに用いたフォワードおよびリバープライマーはそれぞれ

10

20

30

40

50

5' - G G A A G A T C T G A G A G C G A G A C T T C C T C T C A A - 3' および
5' - G G A A G A T C T G A T G C C G G G A T C A C T T T C C - 3' である。

【0345】

PCR増幅を、パーキンエルマー (Perkin-Elmer) GeneAMP (登録商標) PCRシステム9700機器を用いて、0.5 μgのゲノムDNA、0.4 μMの各プライマー、1×dNTPミックス (クロンテック (Clontech)、カリフォルニア州所在)、1×cDNA PCR反応緩衝液 (クロンテック (Clontech)) および1×Advantage (登録商標) cDNAポリメラーゼミックス (クロンテック (Clontech)) を含む50 μlの反応容積中で行った。

10

【0346】

PCR反応条件を

94℃で2秒間、72℃で3分間を7サイクル

94℃で2秒間、67℃で3分間を32サイクル

67℃で4分間

とした。

【0347】

PCR産物をQIAquick (登録商標) ゲル抽出キット (キアゲン (Qiagen)、ドイツ所在) を用いてゲル精製した。精製したPCR産物およびリポーターベクターpGL3-basicを別々に制限酵素BglIIで消化して、PCR産物をpGL3-basicのルシフェラーゼ遺伝子への読み枠を合わせて連結するのに適した適合性末端を生成させた。連結反応産物を用いて大腸菌株TOP10 (インビトロゲン (Invitrogen)) を形質転換した。生成したプラスミドpGh3022.1を制限酵素分析でスクリーニングし、DNA配列決定により確認した。得られたヒトSCD制御領域/リポーター構築物を用いて、種々の哺乳類細胞株をトランスフェクションし、リポーター活性を測定する。

20

【0348】

実施例8-ヒトMETP制御領域のクローニング

METP制御領域 (1500bp) をヒト白血病ゲノムDNAからPCRによりクローニングする。ATGの上流の部位-1500bp~-1bpで始まるフォワードおよびリバースの合成プライマーを用いて、制御領域をPCRにより増幅する。PCR増幅によりヒトMETP制御領域をクローニングするのに用いるフォワードおよびリバースプライマーはそれぞれ

30

5' - T G G C C T T G G A T G G G C C A C T T C C C G C - 3' および

5' - G A A C A A G G T G T G G C G G G G A G G C C C T G G G T C - 3' である。

【0349】

PCR増幅を、パーキンエルマー (Perkin-Elmer) GeneAMP (登録商標) PCRシステム9700機器を用いて行う。例えば、PCRを0.5 μgのゲノムDNA、0.4 μMの各プライマー、1×dNTPミックス (クロンテック (Clontech)、カリフォルニア州所在)、1×cDNA PCR反応緩衝液 (クロンテック (Clontech)) および1×Advantage (登録商標) cDNAポリメラーゼミックス (クロンテック (Clontech)) を含む50 μlの反応容積で実施する。

40

【0350】

PCR反応条件は

94℃で2秒間、72℃で3分間を7サイクル

94℃で2秒間、67℃で3分間を32サイクル

67℃で4分間

である。

【0351】

PCR産物をQIAquick (登録商標) ゲル抽出キット (キアゲン (Qiagen))

50

、ドイツ所在)を用いてゲル精製し、製造業者の指示に従ってT Aクローニングベクターp C R I I (インビトロゲン (Invitrogen)) に連結する。連結反応産物を用いて大腸菌株T O P 1 0 (インビトロゲン (Invitrogen)) を形質転換する。得られたプラスミドを制限酵素分析によりスクリーニングし、D N A配列決定により確認する。次いでヒトM E T P制御領域をp C R I Iベクターからルシフェラーゼリポーターベクターp G L 3-B a s i c (プロメガ (Promega)) へ再クローニングする。得られたヒトM E T P制御領域/リポーター構築物を用いて、種々の哺乳類細胞株をトランスフェクションし、リポーター活性を測定する。

【0352】

実施例9-ヒトG L O L制御領域のクローニング

10

G L O L制御領域 (468bp、部位-905~-438の範囲) をヒト白血病ゲノムD N AからP C Rによりクローニングする。G L O L制御領域の5'末端の最初の30ヌクレオチドはAヌクレオチドに富み (図13を参照)、プライマーに組み込むとP C Rによるクローニングが困難になるであろう。したがって、A T Gの上流側の部位-886bpおよび-438bpで始まるフォワードおよびリバースの合成プライマーを用いてP C Rにより制御領域を増幅する。P C R増幅によりヒトG L O L制御領域をクローニングするのに用いるフォワードおよびリバースプライマーはそれぞれ

【0353】

5'-G G A A A A A A A A C G G C C C C G A G G C T A T G A G T G-3' および
5'-C T G C C G C A G G A G G A T G G G G G C T C-3' である。

20

【0354】

P C R増幅を、パーキンエルマー (Perkin-Elmer) Gene A M P (登録商標) P C Rシステム9700機器を用いて実施する。例えば、P C Rを0.5μgのゲノムD N A、0.4μMの各プライマー、1×d N T Pミックス (クロンテック (Clontech)、カリフォルニア州所在)、1×c D N A P C R反応緩衝液 (クロンテック (Clontech)) および1×A d v a n t a g e (登録商標) c D N Aポリメラーゼミックス (クロンテック (Clontech)) を含む50μlの反応容積で実施する。

【0355】

P C R反応条件は

30

94℃で2秒間、72℃で3分間を7サイクル
94℃で2秒間、67℃で3分間を32サイクル
67℃で4分間
である。

【0356】

P C R産物をQ I A q u i c k (登録商標) ゲル抽出キット (キアゲン (Qiagen)、ドイツ所在)を用いてゲル精製し、製造業者の指示に従って、T Aクローニングベクターp C R I I (インビトロゲン (Invitrogen)) に連結する。連結反応産物を用いて大腸菌株T O P 1 0 (インビトロゲン (Invitrogen)) を形質転換する。得られたプラスミドを制限酵素分析によりスクリーニングし、D N A配列決定により確認する。次いで、ヒトG L O L制御領域をp C R I Iベクターからルシフェラーゼリポーターベクターp G L 3-B a s i c (プロメガ (Promega)) へ再クローニングする。得られたヒトG L O L制御領域/リポーター構築物を用いて、種々の哺乳類細胞株をトランスフェクションし、リポーター活性を測定する。

40

【0357】

実施例10-ヒトF T F 1制御領域のクローニング

F T F 1制御領域 (883bp、A T Gの上流の部位-883~-1の範囲) をヒト白血病ゲノムD N AからP C Rによりクローニングする。F T F 1制御領域の5'末端の最初の30ヌクレオチドは、AおよびTヌクレオチドに富み (図19を参照)、プライマーに

50

組み込むとPCRによるクローニングが困難になるであろう。したがって、ATGの上流側の部位-850bpおよび-1bpでそれぞれ始まるフォワードおよびリバースの合成プライマーを用いてPCRにより制御領域を増幅する。PCR増幅によりヒトFTF1制御領域をクローニングするのに用いるフォワードおよびリバースプライマーはそれぞれ

【0358】

5'-TTAAAGCTGAATACTCCCCCGTTGAGGGGAGATC-3' および

5'-CGCAGCCGGCTCCCGGGACCCCCCTTCC-3'

である。

【0359】

PCR増幅を、パーキンエルマー (Perkin-Elmer) GeneAMP (登録商標) PCRシステム9700機器を用いて実施する。例えば、PCRを0.5μgのゲノムDNA、0.4μMの各プライマー、1×dNTPミックス (クロンテック (Clontech)、カリフォルニア州所在)、1×cDNA PCR反応緩衝液 (クロンテック (Clontech)) および1×Advantage (登録商標) cDNAポリメラーゼミックス (クロンテック (Clontech)) を含む50μlの反応容積で実施する。

PCR反応条件は

94℃で2秒間、72℃で3分間を7サイクル

94℃で2秒間、67℃で3分間を32サイクル

67℃で4分間

である。

【0360】

PCR産物をQIAquick (登録商標) ゲル抽出キット (キアゲン (Qiagen)、ドイツ所在) を用いてゲル精製し、製造業者の指示に従って、TAクローニングベクターpCRII (インビトロゲン (Invitrogen)) に連結する。連結反応産物を用いて大腸菌株TOP10 (インビトロゲン (Invitrogen)) を形質転換する。得られたプラスミドを制限酵素分析によりスクリーニングし、DNA配列決定により確認する。次いで、ヒトFTF1制御領域をpCRIIベクターからルシフェラーゼリポーターベクターpGL3-Basic (プロメガ (Promega)) へ再クローニングする。得られたヒトFTF1制御領域/リポーター構築物を用いて、種々の哺乳類細胞株をトランスフェクションし、リポーター活性を測定する。

【0361】

実施例11-ヒトAIBG制御領域のクローニング

AIBG制御領域 (431bp) をヒト白血病ゲノムDNAからPCRによりクローニングする。制御領域を、ATGの上流の部位-430bpおよび-1bpで始まるフォワードおよびリバースの合成プライマーを用いてPCRにより増幅する。PCR増幅によりヒトAIBG制御領域をクローニングするのに用いるフォワードおよびリバースプライマーはそれぞれ

5'-TGAAACCCACCTTTGGTGTCACATGTGCAG-3' および

5'-GATGGTCGCGCTCACTCCGGTGTCAGTGAG-3'

である。

【0362】

PCR増幅を、パーキンエルマー (Perkin-Elmer) GeneAMP (登録商標) PCRシステム9700機器を用いて実施する。例えば、PCRを0.5μgのゲノムDNA、0.4μMの各プライマー、1×dNTPミックス (クロンテック (Clontech)、カリフォルニア州所在)、1×cDNA PCR反応緩衝液 (クロンテック (Clontech)) および1×Advantage (登録商標) cDNAポリメラーゼミックス (クロンテック (Clontech)) を含む50μlの反応容積で実施する。

10

20

30

40

50

PCR反応条件は
94℃で2秒間、72℃で3分間を7サイクル
94℃で2秒間、67℃で3分間を32サイクル
67℃で4分間
である。

【0363】

PCR産物をQIAquick（登録商標）ゲル抽出キット（キアゲン（Qiagen）
、ドイツ所在）を用いてゲル精製し、製造業者の指示に従って、TAクローニングベクタ
ーpCRII（インビトロゲン（Invitrogen））に連結する。連結反応産物を
用いて大腸菌株TOP10（インビトロゲン（Invitrogen））を形質転換する 10
。得られたプラスミドを制限酵素分析によりスクリーニングし、DNA配列決定により確
認する。次いで、ヒトAIBG制御領域をpCRIIベクターからルシフェラーゼリポー
ターベクターpGL3-Basic（プロメガ（Promega））へ再クローニングす
る。得られたヒトAIBG制御領域／リポーター構築物を用いて、種々の哺乳類細胞株を
トランスフェクションし、リポーター活性を測定する。

【0364】

実施例12－ヒトGPAT制御領域のクローニング

制御領域（1962bp）をヒト白血球ゲノムDNAからPCRによりクローニングする
。制御領域を、ATGの上流の部位－34534bpおよび－32575bpで始まるフ
ォワードおよびリバースの合成プライマーを用いてPCRにより増幅する。PCR増幅に 20
よりヒトGPAT制御領域をクローニングするのに用いるフォワードおよびリバースプ
ライマーはそれぞれ

5'－TTGGCTCACCTCAGTGCCCCCAGTC－3' および
5'－TG GTTTTG CATCGTATCTTCCCCCTCTGCTGCCATC－3
,

である。

【0365】

PCR増幅を、パーキンエルマー（Perkin-Elmer）GeneAMP（登録商
標）PCRシステム9700機器を用いて実施する。例えば、PCRを0.5μgのゲノ
ムDNA、0.4μMの各プライマー、1×dNTPミックス（クロンテック（Clon 30
tech）、カリフォルニア州所在）、1×cDNA PCR反応緩衝液（クロンテック
（Clontech））および1×Advantage（登録商標）cDNAポリメラー
ゼミックス（クロンテック（Clontech））を含む50μlの反応容積で実施する
。

PCR反応条件は

94℃で2秒間、72℃で3分間を7サイクル
94℃で2秒間、67℃で3分間を32サイクル
67℃で4分間

である。

【0366】

PCR産物をQIAquick（登録商標）ゲル抽出キット（キアゲン（Qiagen）
、ドイツ所在）を用いてゲル精製し、製造業者の指示に従って、TAクローニングベクタ
ーpCRII（インビトロゲン（Invitrogen））に連結する。連結反応産物を
用いて大腸菌株TOP10（インビトロゲン（Invitrogen））を形質転換する 40
。得られたプラスミドを制限酵素分析によりスクリーニングし、DNA配列決定により確
認する。次いで、ヒトGPAT制御領域をpCRIIベクターからルシフェラーゼリポー
ターベクターpGL3-Basic（プロメガ（Promega））へ再クローニングす
る。得られたヒトGPAT制御領域／リポーター構築物を用いて、種々の哺乳類細胞株を
トランスフェクションし、リポーター活性を測定する。

【0367】

50

実施例 13—酵母の細胞全体またはスフェロプラストを用いる薬物スクリーニング検定

A. スフェロプラストの調製

6×His タグあり／なしヒト SCD 遺伝子で形質転換した出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (またはその他) の OLE1 欠失突然変異体の培養をストックの細胞懸濁液から開始する。酵母を適切な培地中で生育させ、脂肪酸 δ -9-デサチュラーゼをコードする遺伝子の発現を誘導するために 2% ガラクトースを用いる。16 時間のインキュベーションの後、細胞を 4℃、 $2060\times g$ で 5 分間遠心分離し、蒸留水で 1 回洗浄し、遠心分離する。細胞ペレットの容積と重量を測定する。細胞を 0.1 M トリス- SO_4 (pH 9.4)、10 mM DTT に懸濁し (1:2 重量/容積)、30℃ でインキュベートする。10 分間のインキュベーションの後、遠心分離により細胞ペレットを得て、1.2 M ソルビトールで 1 回洗浄し (1:20 重量/容積)、1.2 M ソルビトール、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁する (1:1 重量/容積)。リチケース (*Lyticase*) の 15,800×g (1 分間) の上清を 2000 U/ml の濃度で細胞懸濁液に加え、50 rpm の回転式振とう器で 30℃ でインキュベートする。スフェロプラストへの変換は、40 分間のインキュベーションの後、懸濁液を蒸留水で希釈してから顕微鏡下で観察することにより確認する。70 分間のインキュベーションの後、約 90% の細胞がスフェロプラストに変換される。

10

【0368】

B. スフェロプラストの試験化合物とのインキュベーション

スフェロプラストを 4℃、 $2060\times g$ で 5 分間遠心分離してハーベストし、1.2 M ソルビトールで 1 回洗浄し、誘導条件を維持して約 2.5~3.0 の O.D.₆₀₀ の読み取り値を得るために 1% ブリジ (*Brij*) 58、1.2 M ソルビトールおよび 2% ガラクトースを含む適切な培地に再懸濁する。スフェロプラスト懸濁液の試料の一部 10 ml をいくつかの 125 ml 三角フラスコに移し、各フラスコ中で 200 μ l の各種濃度の試験化合物とともに回転式インキュベータで 270 rpm、30℃ でインキュベートする。30 分間のインキュベーション後に、2~200 μ M (1 μ Ci) の [$1-^{14}\text{C}$] パルミチン酸を培養物に加え、さらに 120 分間インキュベートする。この時点で O.D.₆₀₀ を測定し、スフェロプラストを遠心分離によりハーベストし、0.1% BSA を含む トリス-HCl 緩衝液 (100 mM、pH 8.0) で洗浄する。

20

【0369】

C. 全酵母細胞の試験化合物とのインキュベーション

ヒト SCD 遺伝子で形質転換した出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の OLE1 欠失突然変異体を、1% ブリジ (*Brij*) 58 を含む 9 ml の適切な培地 (O.D.₆₀₀ 0.4、細胞は約 3.2×10^6 個/ml) と 200 μ l の各種濃度の試験化合物とを含むいくつかの 125 ml 三角フラスコ中でインキュベートする。回転式振とう器中で 270 rpm、30℃ で 1 時間インキュベートした後、1 μ Ci の [$1-^{14}\text{C}$] パルミチン酸 (1% ブリジ (*Brij*) 58 を含むインキュベーション培地に溶解) を終濃度 2~200 μ M で細胞懸濁液に加える。阻害物質および放射性標識脂肪酸とともに 5 時間インキュベートした後、ガラクトースを終濃度 2% となるように加えて導入遺伝子の発現を誘導する。酵母をさらに 19 時間インキュベートした後、4℃、 $5000\times g$ で 10 分間遠心分離してハーベストする。細胞を 0.1% BSA を含む トリス-HCl 緩衝液 (100 mM、pH 8.0) で洗浄し、下記のように総脂質を抽出する。

30

40

【0370】

D. 脂質分析

細胞全体またはスフェロプラストのペレットを 10% KOH でけん化して遊離脂肪酸を得、さらにメタノール中 BF_3 を用いてメチル化する。205 nm に設定したダイオード・アレイ検出器、固体シンチレーション・カートリッジ (^{14}C 検出効率 97%) を備えた放射性同位体検出器 (171 型、ベックマン (*Beckman*) [カリフォルニア州所在]) および μ Bondapak (登録商標) C-18 ベックマン (*Beckman*) インサートを含むプレカラムに取り付けた逆相 ODS (C-18) ベックマン (*Beckman*)

50

n) カラム (250 mm × 4.6 mm 内径、粒子径 5 μm) を装着したヒューレットパッカード (Hewlett Packard) 1090、シリーズ I I クロマトグラフ装置を用いて、脂肪酸メチルエステルを高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析する。脂肪酸メチルエステルを流速 1 ml / 分でアセトニトリル / 水 (95 : 5 容積比) を用いてアイソクラクティックで分離し、真正標準品との比較により同定する。

あるいは、脂肪酸メチルエステルをキャピラリーカラム・ガスクロマトグラフィー (GC) で分析する。

【0371】

実施例 14 - 酵母ミクロソームを用いる薬物スクリーニング検定

A. 酵母ミクロソームの調製

6 × His タグ付きまたはタグなしの δ-9-デサチュラーゼで形質転換した出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の OLE1 欠失突然変異体の 2 ~ 5 l 培養を、ガラクトースを含まない適切な培地を用いて約 3.2×10^5 個 / ml の細胞密度 (O. D.₆₀₀ 0.4) で開始する。270 rpm の回転式振とう器で 30 °C で 8 時間インキュベートした後、ガラクトースを終濃度 2 % となるように加える。酵母をさらに 12 時間インキュベートし、4 °C、2060 × g で 10 分間の遠心分離によりハーベストし、水で洗浄する。細胞ペレットをその容積の 1 / 3 に、pH 7.2 の単離用緩衝液 (80 mM Hepes-KOH、10 mM KCl、320 mM スクロース、2 mM PMSF およびプロテアーゼインヒビター混合物) に再懸濁する。細胞懸濁液を液体 N₂ の入った乳鉢に注ぎ、セラミック乳棒を用いて砂とともに粉碎する。酵母粉末をコンカル試験管に移し、ペレットの容積の 2 / 3 の単離用緩衝液を加える。砂を 57 × g で 1 分間遠心分離することにより除去し、懸濁液を 10,000 × g で 20 分間遠心分離して、細胞破片、核およびミトコンドリアを分離した。上清を 106,000 × g で 1 時間遠心分離して、ミクロソームペレットを得、それを 700 μl の単離用緩衝液に再懸濁する。このミクロソーム懸濁液についてタンパク検定を実施する。

【0372】

B. 酵母ミクロソームの試験化合物とのインキュベーション

δ-9-デサチュラーゼの活性を、[1-¹⁴C] 16 : 0 (パルミチン酸) の [1-¹⁴C] 16 : 1 n-7 (パルミトレイン酸) への変換を測定することにより調べる。43.2 mM MgCl₂、1.0 mM ATP、500 μM NADH および 10 μM 補酵素 A ならびに一連の濃度の試験化合物を含む 0.25 ml の 80 mM Hepes-KOH (pH 7.2) 中に加えた終濃度 33 μM の 0.20 μCi 基質脂肪酸を入れたプレインキュベート済み試験管に、500 μg の酵母ミクロソームタンパク質を加えて反応を開始する。同試験管を激しく渦攪拌し、振とう水浴中で 15 分間インキュベート (37 °C) した後、2 ml の 10 % (重量 / 容積) KOH エタノール溶液を加えて、反応を停止させる。インキュベーション混合物中の脂質を N₂ 雰囲気中 80 °C で 45 分間けん化する。次いで試料を水中 5 分間放置してから酸性化する。脂肪酸をヘキサンで抽出し、メタノール中 BF₃ で 90 °C で 30 分間エステル化する。脂肪酸メチルエステルを実施例 13 に記載のように HPLC により分析する。

結果を、1 分間あたり、ミクロソームタンパク質 1 mg あたりに生成したパルミトレイン酸のピコモル数で表す。

【0373】

実施例 15 - 精製酵素を用いる薬物スクリーニング検定

A. 酵母ミクロソームからの δ-9-デサチュラーゼの単離

6 × His でタグ標識した δ-9-デサチュラーゼを含む酵母ミクロソームを Zwittergent (登録商標) 3-14 またはデオキシコール酸塩 / トリトン X100 混合物 (2 重量 %) とともに 4 °C で 2 時間攪拌し、δ-9-デサチュラーゼを可溶化する。あるいは、酵母ミクロソームをアセトン中の 2.5 % 水 (容積比) で処理して、該界面活性剤の可溶化能を高めることが可能である。混合物を 106,000 × g で 1 時間遠心分離する。該酵素を含む上清を、迅速タンパク質液体クロマトグラフィーシステム (ファルマシ

10

20

30

40

50

ア (Pharmacia)) に装着した予め平衡化済みの HiTrap (登録商標) キレート化 (Ni^{2+} 固定イミノジアセテート) カラム (ファルマシア (Pharmacia)) にロードする。カラムを 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) で洗浄する。タグ標識タンパク質を、0~500 mM の範囲のイミダゾールを含む同じ緩衝液で溶離し、Centriprep (登録商標) (アミコン (Amicon)) 濃縮器を用いて限外ろ過によりさらに濃縮する。

【0374】

B. δ -9-デサチュラーゼの試験化合物とのインキュベーション
濃縮した酵素を、1 mM NADH、80 μM シトクロム b_5 、4 μM NADH-シトクロム b_5 レダクターゼ、6 mM 卵ホスファチジルコリン、2% トリトン X-100、0.4% デオキシコール酸ナトリウム、放射性標識 パルミトイル-CoA および一連の濃度の試験化合物を含む トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.2) 中で 30~37°C でインキュベートする。15~90 分間のインキュベーションの後、反応を停止させ、実施例 13 に記載のように脂肪酸メチルエステルを分析する。

【0375】

あるいは、酵素活性を パルミトイル-CoA の存在下または非存在下での NADH 酸化速度により測定することが可能である。

【0376】

実施例 16-実施例 13~15 に記載の薬物スクリーニング検定のラット肝ミクロソームを用いたバリデーション

A. ラット肝ミクロソームの調製

酵素活性の高い時期に、軽ハロタン (鉍油中 15%) 麻酔したウィスター (Wistar) ラットを放血により屠殺した。肝臓をただちに 0.9% 冷 NaCl 溶液ですすぎ、重量を測定し、はさみで細切する。別途指定しない限り、すべての操作を 4°C で行う。0.25 M スクロース、62 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、0.15 M KCl、1.5 mM N-アセチルシステイン、5 mM MgCl_2 および 0.1 mM EDTA を含む溶液中 (1:3 重量/容積) で 4 ストロークのポッター-エルベージェム (Potter-Elvehjem) 組織ホモジナイザーを用いて肝臓をホモジナイズする。ホモジネートを 10,400 $\times g$ で 20 分間遠心分離して、ミトコンドリアと細胞破片を除去する。上清を 3 層チーズクロスでろ過し、105,000 $\times g$ で 60 分間遠心分離する。ミクロソーム・ペレットを小型のガラス/テフロンホモジナイザーで同じホモジナイゼーション溶液に緩やかに再懸濁し、-70°C で保存する。ミトコンドリアの混入がないことを酵素的に評価する。ウシ血清アルブミンを標準としてタンパク質濃度を測定する。

【0377】

B. ラット肝ミクロソームの試験化合物とのインキュベーション
42 mM NaF、0.33 mM ナイアシンアミド、1.6 mM ATP、1.0 mM NADH、0.1 mM 補酵素 A および一連の濃度の試験化合物を含む 1.5 ml のホモジナイゼーション溶液中の終濃度 33.3 μM の 0.20 μCi の基質脂肪酸 (パルミチン酸) を入れたプレインキュベート済の試験管に、2 mg のミクロソームタンパク質を加えて反応を開始する。試験管を激しく渦攪拌し、振とう水浴中 (37°C) で 15 分間インキュベートした後、反応を停止させ、実施例 13 に記載のように脂肪酸を分析する。あるいは、脂肪酸メチルエステルをキャピラリーカラム・ガスクロマトグラフィー (GC) で分析する。

【0378】

実施例 17-アポリポタンパク質 A-1 に関する薬物スクリーニング検定

ApoA-1 と相互作用する試験化合物は、補酵素としての ApoA-1 の機能を妨害して LCAT 活性の喪失をもたらす可能性がある。薬物スクリーニング検定は、LCAT 活性に関するよく知られている酵素検定に基づいている (リー エム および プリチャード ピー エイチ (Li M. and Pritchard P. H.), 2000 年, J. Biol. Chem. 第 275 巻, 18079~18084 ページ および ソルシート マ

スら (Sorci-Thomas et al.)、2000年、J. Biol. Chem. 第275巻、12156～12163ページ)。

【0379】

概要を述べると、精製した組換えApoA-1または精製した血漿ApoA-1を $[^3\text{H}]$ コレステロールおよびホスファチジルコリンと0.8:12.5:250のモル比で(約1.2 μg)、10mMトリス-HCl pH7.4、140mM NaCl、0.25mM EDTA、0.15mMアジ化ナトリウム、0.6%脂肪酸非含有血清アルブミンおよび2mM β -メルカプトエタノール中で混合する。試験化合物を適切な濃度で反応に加える。適切な容積の新鮮血漿を反応混合物に加えて、LCATを供給する。37℃での30分間のインキュベーションの後に、エタノールを加えて反応を停止させる。総脂質を抽出し、シリカゲルGプレートとヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸(容積比70:12:1)とを用いて薄層クロマトグラフィー法により該脂質を分離して、 $[^3\text{H}]$ コレステロールの $[^3\text{H}]$ コレステロールエステルへの変換を測定する。コレステロールエステルスポットの放射活性を、液体シンチレーション計数法により、ベルトールド社(Berthold)の放射性同位体スキャナでプレートをスキャンすることにより、あるいは当技術分野で知られているオートラジオグラフ法により測定する。

10

【0380】

コントロール反応(試験化合物を含まない)と比較した場合の試験反応の変化は、ApoA-1に対する試験化合物の調節作用の尺度である。

あるいは、ファージ・ディスプレイ法に適合させた組合せライブラリーから得られ、ApoA-1に結合する小ペプチドまたはアフィボディ(affibody)を、ノードラ(Nord et al.)、1997年、Nat. Biotechnol. 第15巻、772～777ページに記載の同様な方法を用いて特定する。

20

【0381】

実施例18—グリセロール-3リン酸アシルトランスフェラーゼに関する薬物スクリーニング検定

実施例13、14および15に記載のように、6 $\times$ Hisタグ付きまたはタグなしのGPATをコードするヒトまたは哺乳類の遺伝子で形質転換した出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のアシルトランスフェラーゼ突然変異体から細胞全体、スフェロプラスト、ミクロソーム、ミトコンドリアまたは精製酵素を得る。

30

【0382】

細胞または細胞小器官(すなわちミクロソームまたはミトコンドリア)または精製酵素を種々の濃度の試験化合物の存在下で放射標識したグリセロールおよびパルミトイルCoAもしくは他のアシルCoAとともに2～12時間(細胞)または5～20分間(細胞小器官または精製酵素)インキュベートする。反応をブタノールで停止させ、生成されたリゾホスファチジン酸を、シリカゲルGプレートおよび溶媒混液を用いた2次元薄層クロマトグラフィーにより分離する。一次元目をクロロホルム:メタノール:7Nアンモニア(容積比65:25:4)を用いて行い、二次元目をクロロホルム:メタノール:酢酸:水(容積比170:15:15:2)を用いて行う。放射標識されたリゾホスファチジン酸スポットを含むシリカを削り取り、シンチレーションカウンターで放射活性を計数する。あるいは、質量検出器/オンライン ^{14}C 検出器を用いたHPLC法を使用してもよい。

40

【0383】

実施例19—Spot-14に関する薬物スクリーニング検定

Spot-14は、転写因子のすべての特性を有する核タンパク質である。酵母ツー・ハイブリッドシステムにより、Spot-14が多くの転写因子の場合と同様にホモ2量体化する強い傾向を有することが示された(カニングハムら(Cunningham et al.)、1997年、Endocrinology、第138巻、5184～5188ページ)。

【0384】

したがって、酵母ツー・ハイブリッドシステムを用いてSpot-14のホモ2量体化を

50

阻害する化合物をスクリーニングする。ツー・ハイブリッド検定は、実施例 21 に記載のように実施する。Spot-14 cDNA を、それぞれ DNA 活性化ドメイン (AD) および DNA 結合ドメイン (DBD) を含む プレイ (prey) ベクター および ベイト (bait) ベクター にクローニングする。これらのベクターを適切に改変した酵母株に導入する。Spot-14 のホモ 2 量体化 (ドメインの相互作用) により AD が DBD の近傍にもたらされ、その結果 リポーター遺伝子の発現が誘発される。リポーター遺伝子の発現を、当技術分野でよく知られた技術を用いて検定する。Spot-14 の 2 量体化を阻害する任意の試験化合物で形質転換酵母を処理することにより、選択培地上での酵母の生育が阻害される。

【0385】

実施例 20-METP に関する薬物スクリーニング検定

酵母においてミトコンドリア機能に関与するいくつかの遺伝子が知られている (ベレンキイら (Belenkiy et al.), 2000 年、Biochem. Biophys. Acta. 第 1467 巻、207~218 ページ および コンタミン ブイ および ピカード エム (Contamine V. and Pichard M.), 2000 年、Microbiol. Mol. Biol. Rev. 、第 64 巻、281~315 ページ)。特定のミトコンドリア機能を欠く酵母突然変異体は、温度感受性 および グリセロールもしくはエタノール培地上での生育阻害等のいくつかの表現型を示す。そのような酵母突然変異体を METP 遺伝子で形質転換し、表現型上の復帰突然変異体を分析する。関連ヒト遺伝子による酵母突然変異体の表現型の相補性は、当技術分野でよく知られている (ナカシマら (Nakashima et al.), 1997 年、J. Biol. Chem. 第 272 巻、9567~9572 ページ および アマラバジラ (Amaravadi et al.), 1997 年、Hum. Genet. 第 99 巻、329~333 ページ)。METP を含む復帰突然変異株を用いて、突然変異体の表現型を相補する METP の能力を阻害する新規化学物質をスクリーニングする。

【0386】

ミトコンドリア担体タンパク質と推定されるタンパク質をコードする 2 つの酵母遺伝子、YMC1 および YMC2 (グラフら (Graf et al.), 1993 年、Yeast、第 9 巻、301~305 ページ) は METP と約 30% の同一性を共有しており、機能上の関連性を示している。YMC1 および YMC2 の単一の突然変異体または 2 重突然変異体の表現型を確定する。該表現型は METP により相補されるので、上記のように薬物スクリーニングに用いられる。

【0387】

実施例 21-酵母 1-または 2-ハイブリッドシステムを用いる薬物スクリーニング検定
酵母ワン・ハイブリッドまたはツー・ハイブリッド検定の方法は当業者に既知である (フィールズ エス および ソング オー (Fields S. and Song O.), 1989 年、Nature、第 340 巻、245~246 ページ、ウルマソフら (Ulmasov et al.), 1997 年、Science、第 276 巻、1865~1868 ページ ならびに フルヤマ ケー および サッサ エス (Furuyama K. and Sassa S.), 2000 年、J. Clin. Invest. 第 105 巻、757~764 ページ)。検定用の試薬またはキット、例えば、HybridHunter (登録商標) 酵母ツー・ハイブリッド および RNA-タンパク質 HybridHunter (登録商標) システム (インビトロゲン (Invitrogen))、Matchmaker (登録商標) ワン・ハイブリッド および ツー・ハイブリッドシステム (クロンテック (Clontech)) および HybriZAP (登録商標) ツー・ハイブリッドシステム (ストラタジーン (Stratagene)) が市販されている。

以下の検定法は、本明細書に開示されている脂肪酸により制御される遺伝子のすべてに対して適切なものである。

【0388】

A. 酵母 1-ハイブリッド検定

既知の標的要素または制御領域「ベイト」をリポーター遺伝子（例えばH I S 3）の上流に挿入し、酵母ゲノムに組み込んで新規リポーター株を作る。ベイトDNA配列と相互作用するDNA結合性タンパク質をスクリーニングするために、該酵母株を活性化ドメイン（AD）融合ライブラリーで形質転換する。標的配列へのAD／DNA結合ドメイン（DBD）ハイブリッドタンパク質の結合は、リポーター遺伝子の転写活性化およびその後の選択をもたらす。例えば、H I S 3の発現はヒスチジンを欠く最少培地上でのコロニー増殖を可能にする。DNA結合タンパク質（DBP）をコードするcDNAを単離し、特性を検討する。試験化合物の存在下で標的要素または制御領域をDBPに曝露することにより試験化合物をスクリーニングするために、該相互作用を*in vitro*または*in vivo*で再構築する。当業者によく知られている、DNA／タンパク質結合作用を測定する検定法により、試験化合物の作用を評価する。 10

【0389】

B. 酵母2-ハイブリッド検定

2つの物理的に異なる機能ドメイン、すなわちDNA結合ドメイン（DBD）と活性化ドメイン（AD）とを必要とする。問題のポリペプチドを「ベイト」ベクターにクローニングし、DBDとのハイブリッドタンパク質として発現させる。相互作用する可能性のあるタンパク質をコードするcDNAのライブラリーを「プレイ」ベクター内のADを含む読み枠にクローニングする。ベイトおよびプレイ・ベクターの融合構築物をいくつかの改変酵母株の1つを形質転換する。ベイトおよびプレイハイブリッドタンパク質間の相互作用が起きると、プレイのADがDBDと緊密に接触し、リポーター遺伝子の転写が活性化される。相互作用する陽性のタンパク質を、栄養欠損培地上で平板培養し、リポーター活性の有無をスクリーニングすることにより容易に特定する。試験化合物の存在下で2つの相互作用するタンパク質を曝露することにより試験化合物をスクリーニングするために、これらの2つのタンパク質間の相互作用を*in vitro*または*in vivo*で再構築する。当業者によく知られている、タンパク質／タンパク質結合作用を測定する検定法により、試験化合物の作用を評価する。 20

【0390】

実施例22-INSIG1に関する薬物スクリーニング検定

安定な、INSIG1を過剰発現する細胞株を樹立し、発現しない細胞株を対照とする。過剰発現する細胞株および対照細胞株から細胞膜を単離し、標識した試験化合物とともにインキュベートする。適切なインキュベーション時間の後に膜を回収し、結合していない試験化合物を除去するために洗浄する。当業者によく知られている技術を用いて、INSIG1を含む膜に結合した量を対照の膜に結合した量と比較することにより、試験化合物の特異的結合を測定する。 30

【0391】

あるいは、肝細胞株H35をインスリンによるINSIG1の誘導の存在下または非存在下で用いる。あるいは、肝切除後の再生中の肝細胞から単離された膜を用い、肝切除を受けていない動物由来の膜と比較する。場合によっては、単離された膜でなく細胞全体を用いてもよい。あるいは、精製INSIG1を用いて、人工的な組換えINSIG1／膜複合体を生成させ、INSIG1を含まない膜複合体と比較する。 40

【0392】

実施例23-酵母相補性を用いたグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼに関する薬物スクリーニング検定

出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）のG6PD無発現（null）突然変異体は、有機硫黄源（すなわち、0.1mM L-メチオニン、0.5mM L-システイン、0.2mMグルタチオン、0.2mMホモシステインまたは0.2mM S-アデノシルメチオニン）もしくは無機硫黄源（すなわち、0.5mM硫酸塩、0.5mM亜硫酸塩または0.5mM硫化物）を欠く培地中で生育しない（トーマスら（Thomas et al.）、1991年、EMBO J. 第10巻、547～553ページ）。そのような酵母突然変異体をG6PD遺伝子で形質転換し、表現型上の復帰突 50

然変異体を分析する。酵母突然変異体の表現型の関連ヒト遺伝子による相補は、当技術分野でよく知られている（ナカシマら（Nakashima et al.）、1997年、J. Biol. Chem. 第272巻、9567～9572ページおよびアマラバジラ（Amaravadi et al.）、1997年、Hum. Genet. 第99巻、329～333ページ）。G6PDを含む復帰突然変異株を用いて、突然変異体の表現型を相補するG6PDの能力を阻害する新規化学物質をスクリーニングする。

【0393】

丸ごと全体または透過性化処理された酵母細胞またはスフェロプラストを用いるこのモデルは新規のものであり、G6PD活性に影響を及ぼす試験化合物のスクリーニングに有用である。

10

【0394】

実施例24—精製または粗精製の酵素抽出物を用いたグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼに関する薬物スクリーニング検定

G6PD遺伝子で形質転換した大量のG6PD無発現突然変異酵母を、十分な選択システムを備えた適切な最少培地中で生育させる。過剰生産されたG6PDタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーまたは陰イオン交換クロマトグラフィーにより単離する。酵母ホモジネートを前述（実施例14を参照）のように液体N₂法を用いて得、2', 5'-ADP-セファロースカラムにアプライする。2つの緩衝液系を用いてG6PDタンパク質を溶出させる。第1の溶出緩衝液は5mM EDTAおよび0.02%β-メルカプトエタノールを含むトリス-HCl、pH7.6であり、第2の溶出緩衝液は0.1Mリン酸カリウム、pH7.0である。当技術分野で知られている方法によりタンパク質濃度を測定する。あるいは、酵母の粗抽出物をG6PDタンパク質の供給源として用いる。

20

【0395】

種々の試験化合物によるG6PD活性の調節を、NADP⁺のNADPHへの変換に起因する341nmでの蛍光の増大を追跡することにより分光光度法を用いて測定する。酵素反応を、100μlの精製酵素または酵母の粗抽出物と、900μlのトリス-HCl 50mM（pH8.1）、1mM MgCl₂、200μMグルコース-6-リン酸、100μM NADP⁺と、一連の濃度の各試験化合物とを入れたキュベット中で実施する。NADPHのモル吸光係数として6270を用いて酵素の特異的活性を計算する。

【0396】

実施例25—酵母を用いたGLOLに関する薬物スクリーニング検定

GLO2およびGLO4のような出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）におけるグリオキサラーゼ遺伝子は、哺乳類のGLOLと著しい相同性を有する。酵母のglo2/glo4二重欠失突然変異体（グリオキサラーゼII活性なし）は、GLOL遺伝子による形質転換の適切な宿主である。GLOL遺伝子で形質転換された出芽酵母のglo2/glo4二重欠失突然変異体を、YPD（2%グルコース、2%ペプトン、1%酵母抽出物）または適切なアミノ酸および炭素源（2%グルコースまたは3%グリセロール）を含む合成最少培地（0.17%酵母窒素ベース、0.5%硫酸アンモニウム）中で生育させる。形質転換した酵母のスフェロプラストを実施例13に記載のようにして得る。全酵母細胞を、アルコール（すなわちメタノール、エタノールまたはイソプロピルアルコール）で透過性化する。両モデル細胞を透過性グルタチオン結合体および5, 5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）とともにインキュベートする。チオールエステルの加水分解を当技術分野で知られている技術を用いて412nmで追跡し、GLOL活性をモニターする。種々の濃度の試験化合物を加え、GLOL活性を測定する。

30

40

【0397】

実施例26—酵母相補性を用いたGLOLに関する薬物スクリーニング検定

酵母glo2/glo4二重欠失突然変異体は、メチルグリオキサールの存在下では生育しない。そのような酵母突然変異体をGLOL遺伝子で形質転換し、表現型の復帰突然変異体を分析する。酵母突然変異体の表現型の関連ヒト遺伝子による相補は、当技術分野でよく知られている（ナカシマら（Nakashima et al.）、1997年、J

50

. Biol. Chem. 第272巻、9567～9572ページおよびアマラバジラ (Amaravadi et al.)、1997年、Hum. Genet. 第99巻、329～333ページ)。GLOLを含む復帰突然変異株を用いて、突然変異の表現型を相補するGLOLの能力を阻害する新規化学物質をスクリーニングする。

【0398】

丸ごと全体または透過性化处理された酵母細胞またはスフェロプラストを用いるこのモデルは新規のものであり、GLOL活性に影響を及ぼし、それによりメチルグリオキサールに対する感受性を増大または低下させる試験化合物のスクリーニングに有用である。

【0399】

実施例27—精製酵素を用いたGLOLに関する薬物スクリーニング検定

10

GLOL遺伝子で形質転換した大量のglo2/glo4二重突然変異酵母を生育させ、実施例14に記載の液体N₂法を用いて酵母ホモジネートを得ることにより、過剰生産されたGLOLタンパク質を単離する。ホモジネートを固定化グルタチオンを含むカラムにアプライし、3M NaClを添加したMOPS緩衝液(pH7.2)でGLOLタンパク質を溶出させる。当技術分野でよく知られている方法によりタンパク質濃度を測定する。

【0400】

GLOL活性の調節を、グルタチオン結合体および5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)を含む1mlの100mM MOPS、pH7.2中で37℃で測定する。この反応に、7～200ng/mlの濃度範囲のGLOLおよび適切な濃度の試験化合物も含める。240nmでの吸光度の低下を追跡するか、あるいは412nmでの吸光度の増加によるグルタチオンの生成を追跡することにより酵素活性を測定する。

20

【0401】

実施例28—脂肪酸シンターゼに関する薬物スクリーニング検定

FAS遺伝子で形質転換した大量のFAS無発現突然変異酵母を十分な選択システムを備えた適切な最少培地中で生育させる。実施例14で前述したように液体N₂法を用いて酵母ホモジネートを得る。酵母ホモジネート由来の過剰生産されたFASタンパク質を、段階的なポリエチレングリコールおよび硫酸アンモニウム沈澱、ゲルろ過および陰イオン交換クロマトグラフィーにより単離する。当技術分野でよく知られている方法によりタンパク質濃度を測定する。

30

【0402】

あるいは、酵母の粗抽出物をFASタンパク質の供給源として用いる。

NADPHのNADP⁺への酸化を340nmで分光光度法により追跡するか、あるいは放射標識されたアセチルCoAまたはマロニルCoAのパルミチン酸への取り込みを分析するHPLC法を用いることにより、種々の試験化合物によるFAS活性の調節を測定する。

【0403】

実施例29—酵母相補性を用いる Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼに関する薬物スクリーニング検定

酵母突然変異体の表現型の関連ヒト遺伝子または哺乳類遺伝子による相補は、当技術分野でよく知られている(ナカシマら(Nakashima et al.)、1997年、J. Biol. Chem. 第272巻、9567～9572ページおよびアマラバジラ(Amaravadi et al.)、1997年、Hum. Genet. 第99巻、329～333ページ)。出芽酵母(Saccharomyces cerevisiae)の Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼ突然変異体は、オレイン酸含有試験培地(0.1%酵母抽出物、0.67%酵母窒素ベース、0.02%トウイーン-40、0.1%オレイン酸および0.1%デキストロース；または1%酵母抽出物、2%バクトペプトン、0.2%オレイン酸および0.02%トウイーン-40)中で生育しない。そのような酵母突然変異体を当技術分野でよく知られている技術を用いて哺乳類 Δ^3 、 Δ^2 エノイルCoAイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドで形質転換し、試験培地中の表現型の復帰突

40

50

然変異体を分析する。 Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼを含む復帰突然変異株を用いて、突然変異体の表現型を相補する Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼの能力を阻害する新規化学物質をスクリーニングする。丸ごとまたは透過性化処理された酵母細胞または酵母スフェロプラストを用いるこのモデルは、 Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼ機能に影響を及ぼし、それによりオレイン酸要求性を増大または低下させる試験化合物のスクリーニングに適している。

【0404】

実施例30—精製酵素を用いた Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼに関する薬物スクリーニング検定

哺乳類 Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼ遺伝子で形質転換した大量の Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼ突然変異酵母を生育させ、実施例14に記載の液体N₂法を用いて酵母ホモジネートから過剰生産されたタンパク質を得る。分画遠心法を用いてホモジネートからミトコンドリアペレットを単離する。ペレットを100mlの25mMリン酸緩衝液pH7.4に再懸濁し、氷浴中で2分間超音波処理する。懸濁液を70℃で30秒間加熱し、氷上で冷却し、4℃、15,000×gで15分間遠心分離する。ミトコンドリア可溶化物を25mMリン酸緩衝液(pH6.0)に対して透析し、ベッド容積70mlのCM52セルロースカラムにロードした。非結合タンパク質を25mMリン酸緩衝液pH6.0で溶出させ、 Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼを30mlの25mMリン酸緩衝液pH7.4で溶出させた。溶出液を20mMトリス-HCl(pH8.7)に対して透析し、高速タンパク質液体クロマトグラフィーモノQ陰イオン交換カラム上で20mMトリス-HCl(pH8.7)と1M NaClを含む20mMトリス-HCl(pH8.7)とを用いて勾配溶出により分離する。 Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼは50mM NaClで溶出する。当技術分野でよく知られている方法によりタンパク質濃度を測定する。

【0405】

Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼ活性の試験化合物による調節をビンストックおよびシュルツ(Binstock and Schulz)(1981年、Meth. Enzymol. 第71巻、403~411ページ)に従って、340nmにおいて分光光度法により測定する。反応には、適切な濃度の基質(3-シス-オクテノイルC o Aまたは3-トランス-ヘキセノイルC o A)、試験化合物および精製酵素を含める。

【0406】

あるいは、組換え Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼを含む全酵母または透過性化処理された酵母細胞またはスフェロプラストを検定に用いる。これらの検定に用いる酵母を、 Δ^3 、 Δ^2 エノイルC o A イソメラーゼの内在性の特異的基質を産生するように遺伝学的に改変することも可能である。

【0407】

実施例31—粗精製の可溶化物または精製酵素を用いたCOMTに関する薬物スクリーニング検定

大腸菌または適切な宿主系において十分な量の活性のある組換え哺乳類COMTを生産するために、遺伝子を細菌の発現ベクター、例えばpKEX14に導入する。IPTGによるT7RNAポリメラーゼ遺伝子の誘導後に、COMTが高レベルで産生される(総細菌タンパク質の最大10%)。酵素を当技術分野で知られている手順(ランドストロームら(Lundstrom et al.)、1992年、Biochim. Biophys. Acta. 第1129巻、149~154ページ)を用いて大腸菌から精製する。精製酵素を、COMT活性を調節する薬物をスクリーニングするために用いる。あるいは、細菌の粗精製の可溶化物を検定に用いる。

【0408】

試験化合物によるCOMT活性の調節を当技術分野で知られている方法を用いて測定する(ティルグマンシーおよびカルッキネンエヌ(Tilgmann C. and Kalkkinen N.)、1990年、FEBS Lett.、第264巻、95~99ページ)

ージおよびラウタラ (Lautala et al.)、1999年、J. Chromatogr. B、第736巻、143～151ページ)。その概要を述べると、適切な緩衝液中に5mM $MgCl_2$ 、2mM L-システイン、0.15mM [^{14}C] S-アデノシル-L-メチオニン (0.1 μCi) および1～100 μg の哺乳類COMT (精製酵素または粗精製の可溶化物として提供) を含む250 μl のインキュベーション混合物を37℃で5分間プレインキュベートする。その後、0.5mMカテコール (基質として) および適切な濃度の試験化合物をインキュベーション混合物に加える。10～30分間のインキュベーション期間の後、25 μl の冷4M過塩素酸を加えて反応を終結させる。試料を氷上に10分間保持し、その後22,000×gで5分間遠心分離する。

【0409】

出口容積20 μl の1000 μl 液体シンチレーションフローセルを用いるベックマン (Beckman) 110Bカクテルポンプを備えたインライン放射性同位体フロー検出器を装着したヒューレットパカード (Hewlett-Packard) HPLCクロマトグラフ (1090シリーズII) を用いて、メチル化カテコール生成物をS-アデノシル-L-メチオニンから分離する。あるいは、シラン処理したセリウム活性化白金ガラスを発光物質として充填した300 μl フローセルを使用する。

あるいは、組換えCOMTを含む全酵母または透過性化処理された酵母細胞またはスフェロプラストを薬物スクリーニング検定に用いる。

【0410】

実施例32-ヒトSCD制御領域を用いる薬物スクリーニング検定

ヒトSCD制御領域を含むプラスミドpGh3022.1をヒトSCDプロモーター活性を調節する薬物をスクリーニングするために用いる。当業者に知られている技術を用いて、SCD制御領域の機能を評価するために一過性のトランスフェクションを実施する。

【0411】

製造業者の記載のように、60mm組織培養皿中で10 μl のLipofectamine (登録商標) 2000試薬 (ギブコ (Gibco) BRL) を用いて、HepG2細胞を10 μg のpGh3022.1 (実施例7) および1 μg のベクターpRSV-NEO (ATCC) でトランスフェクションする。24時間インキュベートした後、細胞を2つの150mm組織培養皿に1:2の希釈率で継代し、さらに24時間生育させた。Geneticin (登録商標) (ギブコ (Gibco) BRL) を800 $\mu g/ml$ の濃度で培地に加える。抗生物質の選択圧力下で3～4週間生育させた後、抵抗性クローンを単離し、それらのルシフェラーゼ活性について特徴づけを行う。

【0412】

製造業者の推奨事項に従って、ルシフェラーゼ酵素検定システム (Luciferase Enzyme Assay System) (プロメガ (Promega)) を用いて薬物スクリーニングを行う。その概要を述べると、96ウェルプレートにおいて生育させたトランスフェクション済み細胞を試験化合物に曝露させる。適切なインキュベーション時間の後に、細胞を Mg^{2+} および Ca^{2+} 非含有PBSで洗浄する。細胞を20 μl の1×ルシフェラーゼ細胞培養物溶解試薬 (Luciferase Cell Culture Lysis Reagent) (CCLR、プロメガ (Promega)) を用いて溶解する。プレートを自動インジェクタを備えたルミノメータにのせる。インジェクタによりウェル当たり100 μl のルシフェラーゼ検定試薬 (Luciferase Assay Reagent) (プロメガ (Promega)) が添加され、反応により生じた発光を2秒間の遅延の後に10秒間読み取ってから次のウェルに移り、この操作を繰り返す。試験化合物を含まない細胞培養物を対照として用いる。ルシフェラーゼ活性の有意な差は、試験化合物がヒトSCDプロモーター活性を調節していることを示す。

【0413】

この検定または他のリポーター検定は、脂肪調節性遺伝子の制御領域を用いる薬物スクリーニングに有用である。

【0414】

10

20

30

40

50

実施例 3 3－動物モデルにおける、脂肪調節性遺伝子によりコードされるポリペプチドに対する抗体を用いた薬物スクリーニング検定

脂肪調節性遺伝子によりコードされるポリペプチドに対するモノクローナル抗体を当技術分野で知られている方法を用いて調製する。

ラットを試験群と対照群に無作為に分ける。試験化合物およびプラセボを試験群および対照群にそれぞれ経腸的または非経口的に投与する。試験化合物およびプラセボをボーラスまたは持続投与により与える。適切な投与期間の後に、動物を放血により屠殺し、免疫検定の組織試料を採取する。

【0415】

血液においては、脂肪調節性遺伝子によりコードされる標的ポリペプチドの排出量を、血液を遠心分離し、血漿を対応するモノクローナル抗体に曝露することにより測定する。抗原抗体複合体の量を、マーカーに連結されている二次抗体を用いて検出する。これらの免疫学的生成物を、当技術分野で知られている方法（例えば免疫蛍光法または化学発光法）を用いて定量する。 10

【0416】

同様に、試験動物および対照動物の器官全体または血中の白血球を実施例 1 6 に記載のようにホモジナイズする。本明細書に記載のように、遠心分離により細胞破片を除去し、上清を免疫検定に用いる。

【0417】

この検定法は、正常または疾患（例えば糖尿病または癌）動物モデルにおける脂肪調節性遺伝子の発現を変化させる薬物の特定にも適している。 20

【0418】

実施例 3 4－細胞培養物における、脂肪調節性遺伝子によりコードされるポリペプチドに対する抗体を用いた薬物スクリーニング検定

He p G 2 細胞を試験化合物を含む（試験群）または含まない（対照群）培地中で生育させる。適切な処理期間の後に培地を集め、細胞を P B S で洗浄し、当技術分野で知られている技術を用いて溶解する。脂肪調節性遺伝子によりコードされる排出された標的ポリペプチドを含む培地および細胞可溶化物を実施例 3 3 に記載の免疫検定に用いる。

【0419】

実施例 3 5－アフィニティークロマトグラフィーおよび脂肪調節性遺伝子によりコードされるポリペプチドに対する抗体を用いた薬物スクリーニング検定 30

本明細書に記載（実施例 3 3）したモノクローナル抗体を、当業者に知られている架橋剤を用いてプロテイン G P O R O S（登録商標）カラム（パーセプティブバイオシステムズ（Per Sept ive Biosystems）〔マサチューセッツ州〕）に固定化する（エヴァンスら（Evans et al.）1996 年、Nat. Biotech. 第 14 巻、504～507 ページ）。モノクローナル抗体を含まず、架橋剤で処理されたカラムを対照として用いる。

【0420】

天然または合成ペプチドの組合せライブラリーをカラムに注入する。非結合物質をカラム容積の数倍の P B S（pH 7. 4）で洗浄した後、結合ペプチドを 12 mM H C l で溶出させ、当業者に知られている方法（例えばアセトニトリルの勾配を用いて展開する逆相 H P L C および質量分析）を用いて特徴づけを行う。 40

【0421】

この検定法は、脂肪調節性遺伝子によりコードされるポリペプチドに対して産生させたモノクローナル抗体に対して高い親和性を有する抗原性試験化合物の特定に用いる。特定された試験化合物は、標的ポリペプチドと類似した抗原特性を有するため、疾患における前記標的ポリペプチドの機能を模倣するのに用いられる。

【0422】

実施例 3 6－抗体を用いる診断検定

標的ポリペプチドの産生の変化が疑われる対象から得た分画血液（例えば血漿および白血 50

球)を関連疾患の診断に用いる。白血球は、当技術分野で知られている技術を用いて溶解する。

【0423】

脂肪調節性遺伝子によりコードされる標的ポリペプチドの量を、血漿および白血球可溶化物を対応するモノクローナル抗体に曝露することにより測定する。抗原抗体複合体の量を、マーカーに連結されている二次抗体を用いて検出する。これらの免疫学的生成物を、当技術分野で知られている方法(例えば免疫蛍光法または化学発光法)を用いて定量する。

【0424】

実施例37—ノーザンブロット分析によるRNAの組織分布の測定

A. ラット

ウイスター(Wistar)ラット(約300g)をチャールズリバーカナダリミティッド(Charles River Canada Ltd.)から入手し、通常の飼料を与えて5~6日間飼育した。各ラットを麻酔下で心臓穿刺により屠殺し、ただちにその組織を生理食塩水で灌流した。適切な組織を速やかに摘出し、液体窒素中で凍結した。

【0425】

製造業者のプロトコールに従って、Trizol(登録商標)試薬(ギブコ(Gibco)BRL)を用いて雌ラットの肝臓、脳、腎臓、肺、卵巣、脾臓、心臓、骨格筋、腹部脂肪組織および神経からRNAを単離した。脾臓、心臓、筋、脂肪組織および神経から単離したRNAをその後、製造業者のプロトコールに従ってRNeasy(登録商標)(キアゲン(Qiagen))を用いて精製した。さらに、オーフレイシーおよびローゲオンエフ(Auffray C. and Rougeon F.)(1980年、Eur. J. Biochem. 第107巻、303~314ページ)に記載のように雄ラットの精巣からRNAを単離した。精巣を液体窒素のもとで微粉末に粉碎し、3M LiClおよび6M尿素中でホモジナイズした。同RNAを4℃で沈殿させ、遠心分離によりペレットとした。ペレットを再懸濁し、クロロホルム/イソアミルアルコールで抽出した後、エタノールで沈澱させた。

【0426】

各組織について、6匹のラット(神経の場合)または4匹のラット(神経を除くすべての組織)由来のプールした全RNA10μgを、標準的な手順(サムブルックら(Sambrook et al.)(1989年、Molecular Cloning、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)[ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(Cold Spring Harbour)に所在])を用いて、ホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動に供し、毛細管現象によりナイロン膜(バイオラド(BioRad))に転写した。

【0427】

ノーザンブロット分析を、標準的な手順を用いて実施した(オースベルら(Ausubel et al.)(1994年、Current Protocols in Molecular Biology、ジョンワイリーアンドサンズ(John Wiley & Sons)[ニューヨーク所在])。プローブを、[α-³²P]dCTPおよびRediprime(登録商標)IIランダムプライムラベリングシステム(Random Prime Labelling System)(アマシャムファルマシアバイオテク(Amersham Pharmacia Biotech))を用いてcDNAを標識することにより調製した。ディファレンシャル・ディスプレイ試験(実施例1)において得られたラットMETP、FTF1、A1BGおよびGLOLのcDNAプローブを用いた。0.25×SSC、0.1%SDSを用いた55℃での高いストリンジェンシーで膜を洗浄した。ローディングの標準化のために18SrRNAサブユニットに対するヌクレオチドプローブで膜を探索した。

【0428】

B. ヒト

12種のヒト組織（脳、心臓、骨格筋、結腸、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤、肺および末梢血白血球）由来のポリ（A）⁺RNAを含む膜をクロンテック（Clontech）から購入した（ヒト12レーンMTNブロット）。ノーザンブロット分析を、標準的な手順を用いて実施した（オースベルら（Ausubel et al.）、1994年、Current Protocols in Molecular Biology、ジョンワイリーアンドサンズ（John Wiley & Sons）[ニューヨーク所在]）。プローブを、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPおよびRediprime（登録商標）IIランダムプライムラベリングシステム（Random Prime Labeling System）（アマシャムファルマシアバイオテク（Amersham Pharmacia Biotech））を用いてcDNAを標識することにより調製した。METPのcDNAプローブは、ヒト遺伝子の完全コード配列に一致した。GLOL、FTF1およびALBGのcDNAプローブは、ヒト遺伝子の完全コード配列のそれぞれ塩基1～652、564～1363および214～915に相当した。0.25×SSC、0.1% SDSを用いた55℃での高いストリンジェンシーで膜を洗浄した。

10

【0429】

【表6】

参考文献

- U.S. Pat. No. 3,817,837, June, 1974, Rubinstein et al.
 U.S. Pat. No. 3,850,752, Nov., 1974, Schuurs et al.
 U.S. Pat. No. 3,939,350, Feb., 1976, Kronick et al.
 U.S. Pat. No. 3,996,345, Dec., 1976, Ullman et al.
 U.S. Pat. No. 4,275,149, June, 1981, Litman et al.
 U.S. Pat. No. 4,277,437, July, 1981, Maggio
 U.S. Pat. No. 4,366,241, Dec., 1982, Tom et al. 10
 U.S. Pat. No. 4,399,216, Aug., 1983, Axel et al.
 U.S. Pat. No. 4,704,362, Nov., 1987, Itakura et al.
 U.S. Pat. No. 4,766,075, Aug., 1988, Goeddal et al.
 U.S. Pat. No. 4,784,950, Nov., 1988, Hagen et al.
 U.S. Pat. No. 4,801,542, Jan., 1989, Murray et al.
 U.S. Pat. No. 4,816,567, Mar., 1989, Cabilly et al.
 U.S. Pat. No. 4,935,349, June, 1990, McKnight et al.
 U.S. Pat. No. 5,130,238, July, 1992, Malek 20
 International Patent Application No. WO 88/04300, June, 1988, Cech et al.
 Patent Cooperation Treaty International Publication No. WO 93/05182, Mar., 1993, Bruice
 European Published Application No. 0320308, June, 1989, Backman et al.
 International Patent Application No. WO 00/51430, Sept., 2000, Bergsma et al.
- Adediran, 1996, *Biochimie*, 78: 165-170
 Altschul et al., 1990, *J. Molec. Biol.*, 215: 403-410
 Amaravadi et al., 1997, *Hum. Genet.*, 99: 329-333
 Armstrong et al., 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177: 1056-1061 30
 Askar et al., 1996, *Indian J. Biochem. Biophys.*, 33: 512-518
 Auffray C. and Rougeon F., 1980, *Eur. J. Biochem.*, 107: 303-314
 Ausubel et al., 1994-, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY
 Bautista et al., 1992, *Biochim. Biophys. Acta*, 1119: 74-80
 Been M.D. and Cech T.R., 1986, *Cell*, 47: 207-216
 Belenkiy et al., 2000, *BBA*, 1467: 207-218
 Bell R.M., Coleman R.A., 1980, *Annu. Rev. Biochem.*, 49: 459-487
 Bennett et al., 1995, *J. Mol. Recognit.*, 8: 52-58 40

- Berthou et al., 1995, *Eur. J. Biochem.* 232: 179-187
- Binstock J.F. and Schulz H., 1981, *Meth. Enzymol.*, 71: 403-411
- Borges et al., 1998, *J. Enzyme Inhib.*, 13: 473-483
- Bortoff et al., 1997, *Endocrine*, 7: 199-207
- Breslow et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 6861-6865
- Cameron et al., 1993, *Br. J. Pharmacol.*, 109: 972-979
- Cameron et al., 1999, *Structure Fold. Des.* 7: 1067-1078
- Carillo H. and Lipman D., 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073
- Caskey C.T., 1987, *Science*, 236:1223-1229
- Catanese J.J. and Kress L.F., 1992, *Biochemistry*, 31: 410-418
- Chin et al., 1995, *Am. J. Physiol.*, 269: E691-E700
- Chong B.S. & Mersfelder T.L., 2000, *Ann Pharmacother.*, 34: 1056-1065
- Church et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 1991-1995
- Clarke et al., 1990, *J. Nutr.*, 120: 218-224
- Clarke et al., 1990, *J. Nutr.*, 120: 225-231
- Connolly B. A., 1987, *Nucl. Acid Res.*, 15: 3131-3139
- Contamine V. and Pichard M., 2000, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 281-315
- Copsey et al., 1988, *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs*, Stockton Press, New York
- Cotter et al., 1995, *Diabetic Neuropathy: New Concepts and Insights*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 115-120
- Cotton et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 4397-4401
- Cserzo et al., 1997, *Prot. Eng.*, 10: 673-676
- Cunningham et al., 1997, *Endocrinology*, 138: 5184-5188
- Cunningham et al., 1998, *Thyroid*, 8: 815-825
- Dao et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 2860-2864
- Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, NY, NY
- Deutcher, M., ed., 1990, *Guide to Protein Purification. Meth. in Enzymol.*, 182
- Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid Res.*, 12(1): 387-395
- Diamond et al., 1993, *J. Biol Chem.*, 268: 15185-15192
- Dines et al., 1993, *Diabetologia*, 36:1132-1138
- Dines et al., 1996, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 55: 159-165
- Erickson et al., 1992, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 27: 271-289
- Ericsson et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 7298-7305

10

20

30

40

- Evans et al., 1996., *Nat. Biotech.* 14: 504-507
- Fields S. and Song O., 1989, *Nature*, 340: 245-246
- Flavell et al., 1978, *Cell*, 15: 25-41
- Foretz et al., 1999, *Biochem. J.*, 34: 371-376
- Furuyama K. and Sassa S., 2000, *J. Clin. Invest.*, 105: 757-764
- Ganesh et al., 1999, *Bioche. Biophys. Acta*, 1439: 415-423
- Geever et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 5081-5085
- Goding J.W., 1996, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology*, 3rd edition, Academic Press, NY 10
- Graf et al., 1993, *Yeast*, 9: 301-305
- Gribskov M. and Devereux J., eds., 1991, *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, NY
- Griffin A.M. and Griffin H.G., eds., 1994, *Computer Analysis of Sequence Data, Part 1*, Humana Press, NJ
- Grillasca et al., 1997, *FEBS Lett.*, 401: 38-42
- Gulberg and Marsden, 1975, *Pharmacol. Rev.*, 27: 135-306 20
- Gurvitz et al., 1999, *Biochem. J.*, 344: 903-914
- Gyuris et al., 1993, *Cell*, 75: 791-803
- Haber et al., 1993, *Hepatology*, 22: 906-914
- Haddad et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261:13268-13277
- Hamy et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 3548-3553
- Hanahan et al., 1983, *J. Mol. Biol.*, 166: 557-580
- Harlow E. and Lane D.(eds.), 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Haseloff J. and Gerlach W.L., 1988, *Nature*, 334: 585-591
- Hassan et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 8883-8888 30
- Henrik et al., 1997, *Prot. Eng.*, 10: 1-6
- Hinnen et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 1929-1933
- Honma et al., 1999, *Molecular Brain Research*, 69: 93-103
- Horrobin D.F., 1990, *Pathophysiology and Roles in Clinical Medicine*, Wiley-Liss; NY
- Houbenweyl et al., 1987, *Methods of Organic Chemistry*, Wansch E. (ed), Vol. 15 I and II, Thieme, Germany
- Hsu et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, 271: 13584-13592
- Huse et al., 1989, *Science*, 246: 1275-1281 40

- Hwang et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 12997-13002
- Innis M.A. and Gelfand D.H., 1989, *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Innis M.A., Gelfand D.H., Shinsky J.J. and White T.J. (eds), Academic Press, NY, pp. 3-12
- Ishioka et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 2363-2367
- Izant J.G. and Weintraub H., 1984, *Cell*, 36:1007-1015
- Janssen et al., 1994, *Genomics*, 23: 223-228
- Jayakumar et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 8695-8699
- Jayakumar et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 14509-14514 10
- Jerkins et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 1416-1421
- Johanson et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 9459-9471
- Jorga et al., 2000, *Clin Pharmacol Ther.*, 67: 610-620
- Joyeux et al., 1990, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70: 1438-1444
- Jump et al., 1990, *Mol. Endocrinol.*, 4: 1655-1660
- Jump et al., 1994, *J. Lipid Res.*, 35: 1076-1084
- Karlin et al., 1976, *J. Lipid Res.*, 17: 30-37
- Kastner et al., 1994, *Neuroscience*, 62: 449-457
- Kim et al., 2000, *J. Lipid. Res.*, 41: 1310-1316 20
- Kinlaw et al., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264: 19779-19783
- Kinlaw et al., 1993, *Endocrinology*, 133: 645-650
- Kletzien et al., 1994, *FASEB J.*, 8: 174-181
- Kohler G. and Milstein C., 1975, *Nature*, 256: 495-497
- Kraemer et al., 1993, *J. Lipid Res.*, 34: 663-671
- Kuhajda et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 6379-6389
- Landegren et al., 1988, *Science*, 241: 1077-1080
- Landegren et al., 1989, *Science*, 242: 229-237 30
- Lautala et al., 1999, *J. Chromatogr. B*, 736: 143-151
- Lesk A.M., ed., 1988, *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, NY
- Li et al., 1994, *Int. J. Cancer*, 57: 348-352
- Li M. and Pritchard P.H., 2000, *J. Biol. Chem.*, 275: 18079-18084
- Liang P. and Pardee A.B., 1992, *Science*, 257: 967-971
- Liaw C.W. and Towle H.C., 1984, *J. Biol. Chem.*, 259: 7253-7260
- Liu H.C. and Towle H.C., 1994, *Mol. Endocrinol.*, 8: 1021-1037
- Llewellyn et al., 1987, *J. Mol. Biol.*, 195: 115-123 40

- Lundstrom et al., 1991, *DNA Cell Biol.*, 10: 181-189
- Lundstrom et al., 1992, *Biochim. Biophys. Acta*, 1129: 149-154
- Lupas et al., 1991, *Science*, 252: 1162-1164
- Mack E.W., 1990, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 13th edition
- Madsen et al., 1998, *J. Lipid Research*, 39: 583-593
- Margolskee et al., 1988, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2837-2847
- Mazza G. and Domah B.D.(eds.), 2000, *Herbs, Botanicals and Teas*, Technomic Publishers, Lancaster, PA 10
- McLaughlin et al., 1988, *J. Virol.*, 62: 1963-1973
- Mei et al., 1998, *Biochemistry*, 37: 14204-14212
- Merrifield, 1964, *J. Am. Chem. Assoc.*, 85: 2149-2154
- Miyazaki et al., 2000, *J. Biol. Chem.*, 275: 30132-30138
- Moncur et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 6989-6994
- Moore et al., 1986, *Carcinogenesis*, 7: 1419-1424
- Moss et al., 1987, *Annu. Rev. Immunol.*, 5: 305-324 20
- Muller-Newten G. and Stoffel W., 1991, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 372: 613-624
- Myers et al., 1985, *Science*, 230: 1242-1246
- Myers et al., 1986, *Cold Spring Harbour Sym. Quant. Biol.*, 51: 275-284
- Nagase et al., 2000, *DNA Res.*, 7: 273-281
- Nakashima et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 9567-9572
- Nord et al., 1997, *Nat. Biotechnol.*, 15: 772-777
- Ntambi et al., 1999, *J. Lipid Res.*, 40: 1549-1558
- Okano et al., 1988, *EMBO J.*, 7: 3407-3412
- Orkin et al., 1988, *Prog. Med. Genet.*, 7: 130-142 30
- Palosaari P.M. and Hiltunen J.K., 1990, *J. Biol Chem.*, 265: 2446-2449
- Peng et al., 1997, *Genomics*, 43: 278-284
- Phillippe et al., 1994, *Eur. J. Biochem.*, 226: 377-384
- Qi et al., 1994, *Toxicon*, 32: 1459-1469
- Qi et al., 1995, *Toxicon*, 33: 241-245
- Rasmussen et al., 1987, *Meth. Enzymol.*, 139: 642-654
- Roe et al., 1990, *J. Clin. Invest.*, 85: 1703-1707
- Rosenberg et al., 1985, *Nature*, 313: 703-706 40

- Saggerson B.D. and Carpenter C.A., 1987, *Biochem. J.*, 243: 289-292
- Saiki et al., 1985, *Science*, 230:1350-1353
- Saiki, et al., 1986, *Nature*, 324:163-166
- Salminen et al., 1990, *Gene*, 93: 241-247
- Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, 2nd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
- Semenkovich C.F., 1997, *Prog. Lipid Res.*, 36: 43-53
- Shin et al., 1991, *J. Biol. Chem.*, 266: 23834-23839
- Smith D.W., ed., 1993, *Biocomputing: Informatics and Genome Project*, Academic Press, NY
- Sorci-Thomas et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275: 12156-12163
- Soutar et al., 1975, *Biochemistry*, 14: 3057-3064
- Srivastava et al., 2000, *Eur. J. Biochem.*, 267: 4272-4280
- Taviaux et al., 1997, *Cytogenet. Cell Genet.*, 76: 219-220
- Tenhunen et al., 1994, *Eur. J. Biochem.*, 223: 1049-1059
- Tenhunen J., 1996, *DNA Cell Biol.*, 15: 461-473
- Thiede et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261: 1323-1325
- Thomas et al., 1991, *EMBO J.*, 10: 547-553
- Tilgmann C. and Kalkkinen N., 1990, *FEBS Lett.*, 264: 95-99
- Tilgmann C. and Ulmanen I., 1996, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 684: 147-461
- Tomlinson et al., 1998, *J. Nutr.*, 118: 408-415
- Ulmasov et al., 1997, *Science*, 276: 1865-1868
- Ursini et al., 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 170: 1203-1209
- Vieira-Coelho M. and Soares-da-Silva P., 1999, *Brain Res.*, 821: 69-78
- von Heijne G., 1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, NY
- Wakil, 1989, *Biochemistry*, 28: 4523-4530
- Waldmann T. A., 1991, *Science*, 252: 1657-1661
- Wallace et al., 1986, *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, 51: 257-261
- Wanders et al., 1992, *J. Inherit. Metab. Dis.*, 15: 643-644
- Waters K.M. and Ntambi J.M., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 27773-27777
- Wei et al., 2000, *Ann. Neurol.*, 47: 286-296
- Wilentz et al., 2000, *Pediatr. Dev. Pathol.*, 3: 525-531
- Xie et al., 1999, *Mol. Pharmacol.*, 56: 31-38
- Yet et al., 1993, *Biochemistry*, 32: 9486-9491
- Yoshida et al., 1999, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 45: 411-421
- Zaug A.J. and Cech T.R., 1986, *Science*, 231: 470-475
- Zaug et al., 1984, *Science*, 224: 574-578
- Zaug et al., 1986, *Nature*, 324: 429-433
- Zhang et al., 1999, *Biochem. J.*, 340: 252-264

【図面の簡単な説明】

【図 1】ラットミトコンドリアエネルギー輸送タンパク質 M E T P のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す図。これらの配列は、配列番号 1, 2 に相当する。

【図 2】ヒトミトコンドリアエネルギー輸送タンパク質 M E T P のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す図。これらの配列は、配列番号 3, 4 に相当する。

【図 3】ラット (r M E T P) およびヒト (h M E T P) のミトコンドリアエネルギー輸送タンパク質間のペアワイズアライメントを示す図。これらの配列は、配列番号 2, 4 に相当する。

【図 4】ヒトミトコンドリアエネルギー輸送タンパク質遺伝子ファミリーの 4 つのメンバーである M E T P (配列番号 4)、M C A T (ミトコンドリアカルニチン／アシルカルニチントランスロカーゼ)、T X T P (トリカルボキシレート輸送タンパク質) および U C P 2 (ミトコンドリア脱共役タンパク質 2) の間の多重アライメントを示す図。囲い枠でこのタンパク質ファミリーの P R O S I T E シグネチャ・モチーフである P S O O 2 1 5 を強調する。 10

【図 5】ヒト M E T P のトランスメンブラン領域の D e n s e A l i g n m e n t S u r f a c e (D A S) 法による予測を示すグラフ。

【図 6】ヒト M E T P 遺伝子の制御領域のヌクレオチド配列を示す図。部位 - 1 は A T G のすぐ上流のヌクレオチドである。この配列は配列番号 5 に相当する。

【図 7】ラットグリオキサラーゼ I I 様タンパク質 (G L O L) のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す図。これらの配列は配列番号 6, 7 に相当する。 20

【図 8】ヒトグリオキサラーゼ I I 様タンパク質 (G L O L) のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す図。これらの配列は配列番号 8, 9 に相当する。

【図 9】ラット (r G L O L) およびヒト (h G L O L) のグリオキサラーゼ I I 様タンパク質間のペアワイズアライメントを示す図。これらの配列は、配列番号 7, 9 に相当する。

【図 10】ヒトグリオキサラーゼ I I 様タンパク質 (G L O L ; 配列番号 9) およびヒトグリオキサラーゼ I I (G L O) の間のペアワイズアライメントを示す図。ドメイン 1 (下線部分) におけるこれら 2 つのタンパク質間の高度な類似性と金属イオン配位に關与する非変異残基 (アスタリスクにより表す) が示されている。 30

【図 11】黒丸で示す 2 つの亜鉛イオンと楕円で囲んだドメイン 1 (G L O L のモデル化の鑄型) を有するヒトグリオキサラーゼ I I 酵素の三次元リボン表示を示す図。

【図 12】モデル化したヒト G L O L の三次元リボン表示を示す図。

【図 13】ヒト G L O L 遺伝子の制御領域のヌクレオチド配列を示す図。

部位 - 1 は A T G のすぐ上流のヌクレオチドである。この配列は配列番号 10 に相当する。

【図 14】ラット脂肪応答性転写因子 F T F 1 のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す図。これらの配列は配列番号 11, 12 に相当する。

【図 15】ヒト脂肪応答性転写因子 F T F 1 のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す図。これらの配列は配列番号 13, 14 に相当する。 40

【図 16】マウス O A S I S 遺伝子 (M U S) ならびにラット (R A T) およびヒト (H U M) の F T F 1 タンパク質間の多重アライメントを示す図。これらの配列は配列番号 12, 14 に相当する。

【図 17】D N A 鑄型への c - f o s および c - j u n 結合状態の三次元リボン表示を示す図。

【図 18】D N A 鑄型への c - f o s およびモデル化 F T F 1 結合状態の三次元リボン表示を示す図。

【図 19】ヒト F T F 1 遺伝子の制御領域のヌクレオチド配列を示す図。部位 - 1 は A T G のすぐ上流のヌクレオチドである。この配列は配列番号 15 に相当する。

【図 20】ラット α - 1 B 糖タンパク質 A 1 B G のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列 50

を示す図。これらの配列は配列番号16, 17に相当する。

【図21】ヒト α -1B糖タンパク質A1BGのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す図。これらの配列は配列番号18, 19に相当する。

【図22】ラット(rA1BG)およびヒト(hA1BG)の α -1B糖タンパク質間のペアワイズアライメントを示す図。これらの配列は配列番号17, 19に相当する。

【図23】ヒトキラー細胞阻止受容体KIR2DL2の細胞外リガンド結合部分の三次元リボン表示を示す図。

【図24】ヒトA1BGのモデル化した第4および第5ドメインの三次元リボン表示を示す図。

【図25】ヒトA1BG遺伝子の制御領域のヌクレオチド配列を示す図。部位-1はATGのすぐ上流のヌクレオチドである。この配列は配列番号20に相当する。

【図26】ヒトSCD遺伝子の制御領域のヌクレオチド配列を示す図。部位-1はATGのすぐ上流のヌクレオチドである。この配列は配列番号21に相当する。

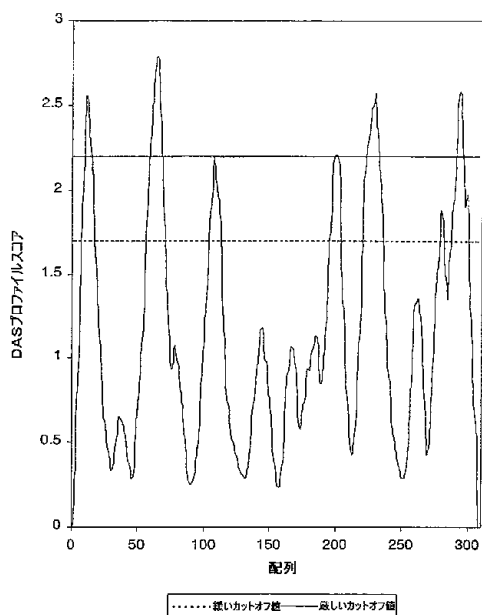
【図27】マウスSCD1(mSCD1)、マウスSCD2(mSCD2)およびヒトSCD(hSCD)のプロモーター間の多価不飽和脂肪酸応答領域(PUFA-RR)の比較を示す図。部位-1はATGのすぐ上流のヌクレオチドである。

【図28】ヒトグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼhGPATのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す図。これらの配列は配列番号24, 25に相当する。

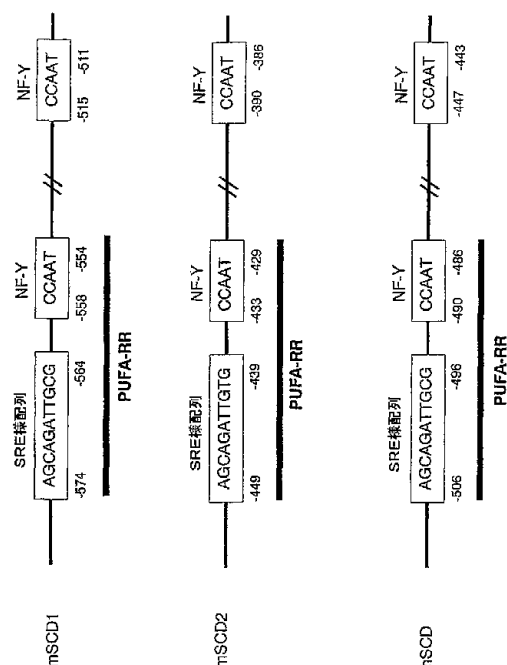
【図29】ヒト(hGPAT)、ラット(rGPAT)およびマウス(mGPAT)グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼタンパク質間の多重アライメントを示す図。この配列は配列番号25に相当する。

【図30】ヒトGPAT遺伝子の制御領域のヌクレオチド配列を示す図。部位-1はATGのすぐ上流のヌクレオチドである。この配列は配列番号26に相当する。

【図5】



【図27】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
23 May 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/40666 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/12.
A01K 67/027, C07K 14/00, 16/00, C12N 5/10, G01N
33/50, 33/531520 Ashlee Dr., Coldbrook, Nova Scotia B4R 1A1
(CA). JENKINS, D., Kenneth [CA/CA]; 1804 Gerlad
Drive, Coldbrook, Nova Scotia B4R 1A3 (CA). NWAKA,
Solomon, O. [NG/CA]; 2075 Langille Drive, Coldbrook,
Nova Scotia B4R 1C3 (CA).

(21) International Application Number: PCT/CA01/01632

(22) International Filing Date:
19 November 2001 (19.11.2001)(74) Agent: HELLER, David, J., RIDOLT & MAYBEE LLP,
One Queen Street East, Suite 2400, Toronto, Ontario M5C
3B1 (CA).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/248,589 17 November 2000 (17.11.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): XENON
GENETICS INC. [CA/CA]; #501 - 520 West 6th Ave.,
Vancouver, British Columbia V5Z 4L5 (CA).(81) Designated States (national): AR, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/40666 A2

(54) Title: FAT REGULATED GENES, USES THEREOF, AND COMPOUNDS FOR MODULATING SAME

(57) Abstract: The present invention relates to methods for identifying genes regulated by fat and their subsequent use in determin-
ing compositions for use in the treatment of disease, by utilizing the identified genes and their proteins. The identified compositions
regulate the expression of the fat regulated genes or modulate the activity of their protein products. The nucleotide and amino acid
sequences for MITR, a novel mitochondrial carrier protein and FTF1, a fat responsive transcription factor, are taught. The nucleotide
sequence for A1BG, a plasma glycoprotein is taught. The nucleotide and amino acid sequences for human GPAT and rat GLOL are
taught. Control sequences for human METP, GLOL, FTF1, SCD, GPAT and A1BG are taught. Polyunsaturated fatty acid regulation
functions are taught for SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, Apo A-1, INSIG1, FTF1, GLOL, A1GB, Spot-14, delta-3,
delta 2 acyl CoA isomerase, and METP.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Fat Regulated Genes, Uses Thereof, and Compounds for Modulating Same**FIELD OF THE INVENTION**

This invention relates to methods for the identification of (a) compositions that modulate the activities of proteins whose genes are fat regulated, (b) compositions that modulate the activity of fat regulated genes and (c) compositions that effectively regulate the expression of the fat regulated genes, and to compositions so identified.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Deficiencies in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have been associated with a number of diseases such as eczema, cardiovascular disorders, inflammation, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome and diabetes (Horrobin D.F., 1990, *Pathophysiology and Roles in Clinical Medicine*, Wiley-Liss, NY and Mazza G. and Donati B.D. (eds.), 2000, *Herbs, Botanicals and Teas*, Technomic Publishers, Lancaster, PA). Supplementing diet with PUFAs have been attempted as a treatment for a number of these conditions. The level of success for such applications has varied considerably.

It has been observed that PUFAs can alleviate and correct some of the symptoms of diabetic neuropathy (Dines et al., 1993, *Diabetologia*, 36: 1132-1138 and Cotter et al., 1995, *Diabetic Neuropathy: New Concepts and Insights*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 115-120). Researchers have speculated that the production or modulation of the cyclooxygenase and lipoxygenase metabolites of the n-3 and n-6 fatty acid families is responsible for some of these beneficial effects. Cameron et al. (1993, *Br. J. Pharmacol.*, 109: 972-979) and Dines et al. (1996, *Prostaglandins Leukotr. Essent. Fatty Acids*, 55: 159-165) both hypothesized that by increasing the levels of vasodilator prostaglandins or by reducing vasoconstrictor and platelet aggregatory prostaglandins, symptoms of diabetic neuropathy may be alleviated. Only limited success in developing fatty acids as drugs has been achieved. In part this is due to the complex metabolism of orally administered fatty acids which do not behave like many of the xenobiotic drugs.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention teaches an isolated polynucleotide segment, comprising a polynucleotide sequence which is selected from the group consisting of: (a) a sequence comprising SEQ ID NO:1; (b) a sequence comprising SEQ ID NO:3; (c) a sequence comprising SEQ ID NO:6; (d) a sequence comprising SEQ ID NO:11; (e) a sequence comprising SEQ ID NO:13; (f) a sequence comprising SEQ ID NO:16; (g) a sequence comprising SEQ ID NO:18; (h) a sequence comprising SEQ ID NO: 24; (i) a sequence which is at least 80% homologous with a sequence of any of (a) to (h); (j) a sequence which is at least 90% homologous with a sequence of any of (a) to (h); (k) a sequence which is at least 95% homologous with a sequence of any of (a) to (h); (l) a sequence which is at least 98% homologous with a sequence of any of (a) to (h); (m) a sequence which is at least 99% homologous with a sequence of any of (a) to (h); (n) a sequence which hybridizes to any of (a) to (m) under stringent conditions; and, (o) a sequence which is a functional derivative of any of (a) to (m). The invention includes an isolated polynucleotide segment, comprising a polynucleotide sequence which retains substantially the same biological function or activity as the polynucleotide of the invention. In an embodiment, the isolated polynucleotide segment is cDNA.

The invention teaches an isolated polypeptide segment comprising an isolated polypeptide selected from the group consisting of: (a) a sequence comprising SEQ ID NO:2; (b) a sequence comprising SEQ ID NO:4; (c) a sequence comprising SEQ ID NO:7; (d) a sequence comprising SEQ ID NO:12; (e) a sequence comprising SEQ ID NO:14; (f) a sequence comprising SEQ ID NO:17; (g) a sequence comprising SEQ ID NO: 25; (h) a sequence which is at least 80% homologous with a sequence of any of (a) to (g); (i) a sequence which is at least 90% homologous with a sequence of any of (a) to (g); (j) a sequence which is at least 95% homologous with a sequence of any of (a) to (g); (k) a sequence which is at least 98% homologous with a sequence of any of (a) to (g); and, (l) a sequence which is at least 99% homologous with a sequence of any of (a) to (g).

The invention includes a host cell comprising a polypeptide segment of the invention in a host cell which is heterologous to the segment. The invention also teaches a process for producing a polypeptide of a segment of the invention comprising the step of culturing the host cell of the invention under conditions sufficient for the production of the polypeptide. The invention

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

includes a polypeptide sequence which retains substantially the same biological function or activity as the polypeptide in a segment of the invention.

5 The invention also teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polypeptide segment of the invention, comprising the steps of: (a) selecting a control animal having the segment and a test animal having the segment; (b) treating the test animal using a compound; (c) determining the relative quantity or relative activity of an expression product of the segment or of the segment, as between the control animal and the test animal. The animals may be mammals. The mammals may be rats.

10 In another embodiment, the invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polypeptide segment of the invention, comprising the steps of: (a) selecting a host cell of the invention; (b) cloning the host cell and separating the clones into a test group and a control group; (c) treating the test group using a compound; and (d) determining the relative quantity or relative activity of an expression product of the segment or of the segment, as between the test group and the control group.

20 In another embodiment, the invention includes a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polypeptide segment of the invention, comprising the steps of: (a) selecting a test group having a host cell of the invention, a part thereof or an isolated polypeptide thereof and a control group; (b) treating the test group using a compound; and (c) determining the relative quantity or relative activity of a product of the segment or of the segment, as between the test group and the control group.

25 In another embodiment, the invention teaches an isolated polynucleotide segment, comprising a polynucleotide sequence which is selected from the group consisting of: (a) a sequence comprising SEQ ID NO:5; (b) a sequence comprising SEQ ID NO:10; (c) a sequence comprising SEQ ID NO:15; (d) a sequence comprising SEQ ID NO:20; (e) a sequence comprising SEQ ID NO:21; (f) a sequence comprising SEQ ID NO:26; (g) a sequence which is at least 80% homologous with a sequence of any of (a) to (f); (h) a sequence which is at least 90% homologous with a sequence of any of (a) to (f); (i) a sequence which is at least 95% homologous with a sequence of any of (a) to (f); (j) a sequence which is at least 98% homologous with a sequence of any of (a) to (f); (k) a sequence which is at least 99% homologous with a sequence of any of (a)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

to (f); and; (l) a sequence which hybridizes to any of (a) to (k) under stringent conditions. The isolated polynucleotide segment may be genomic DNA.

5 The invention also teaches a vector comprising a polynucleotide segment of the invention. The vector may be heterologous to the segment. The vector may contain or encode a tag. The invention teaches a host cell comprising a polynucleotide segment of the invention in a host cell which is heterologous to the segment.

10 In other embodiments, the invention includes an isolated polynucleotide fragment selected from the group consisting of: (a) a sequence having at least 15 sequential bases of nucleotides of a segment of the invention; (b) a sequence having at least 30 sequential bases of nucleotides of a segment of the invention; and (c) a sequence having at least 50 sequential bases of nucleotides of a segment of the invention.

15 The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polynucleotide segment of the invention, comprising the steps of: (a) selecting a control animal having the segment and a test animal having the segment; (b) treating the test animal using a compound; and, (c) determining the relative quantity of an expression product of the segment, as between the control animal and the test animal. The animals may be mammals.
20 The mammals may be rats.

The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polynucleotide segment of the invention, comprising the steps of: (a) selecting a host cell of the invention; (b) cloning the host cell and separating the clones into a test group and a
25 control group; (c) treating the test group using a compound; and (d) determining the relative quantity of an expression product of the segment, as between the test group and the control group.

The invention further teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polynucleotide segment of the invention, comprising the steps of: (a) selecting a test
30 group having a host cell of the invention, a part thereof or an isolated polynucleotide thereof and a control group; (b) treating the test group using a compound; and (c) determining the relative quantity or relative activity of a product of the segment or of the segment, as between the test group and the control group.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

In another embodiment, the invention teaches a composition for treating a disorder involving fatty acid regulated genes, the composition comprising a compound which modulates a segment according to the invention and a pharmaceutically acceptable carrier. The invention further teaches the use of a composition of the invention for treating a disorder involving fatty acid regulated genes.

The invention also teaches a method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder involving fatty acid regulated genes in a subject, the method comprising detecting a germline alteration in a segment of the invention in the subject, comprising comparing the germline sequence of a segment of the invention from a tissue sample from the subject with the germline sequence of a wild-type of the segment, wherein an alteration in the germline sequence of the subject indicates the presence of or a predisposition to the disorder.

The invention teaches a method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder involving fatty acid regulated genes in a subject, the method comprising comparing the sequence of a polypeptide of the invention from a tissue sample from the subject with the sequence of a wild-type of the polypeptide, wherein an alteration in the sequence of the subject as compared to the wild-type indicates the presence of or a predisposition to the disorder involving genes altered by fatty acids.

The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polynucleotide, wherein the polynucleotide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of: (a) selecting a control animal having the polynucleotide and a test animal having the polynucleotide; (b) treating the test animal using a compound; and, (c) determining the relative quantity of an expression product of the polynucleotide, as between the control animal and the test animal.

The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polynucleotide, wherein the polynucleotide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of: (a) selecting a host cell comprising the

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

polynucleotide wherein such host cell is heterologous to the polynucleotide; (b) cloning the host cell and separating the clones into a test group and a control group; (c) treating the test group using a compound; and (d) determining the relative quantity of an expression product of the polynucleotide, as between the test group and the control group.

5

The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polynucleotide, wherein the polynucleotide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of: (a) selecting a test group having a host cell comprising the polynucleotide wherein such host cell is heterologous to the polynucleotide, a part thereof or an isolated polynucleotide thereof and a control group; (b) treating the test group using a compound; and

10

(c) determining the relative quantity or relative activity of a product of the polynucleotide or of the polynucleotide, as between the test group and the control group.

15

The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polypeptide, wherein the polypeptide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, A1BG, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of: (a) selecting a control animal having the polypeptide and a test animal having the polypeptide; (b) treating the test animal using a compound; (c) determining the relative quantity or relative activity of an expression product of the polypeptide or of the polypeptide, as between the control animal and the test animal.

20

The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polypeptide, wherein the polypeptide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, A1BG, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of: (a) selecting a host cell comprising the polypeptide wherein such host cell is heterologous to the polypeptide; (b) cloning the host cell and separating the clones into a test group and a control group; (c) treating the test group using a compound; and (d) determining the relative quantity or relative activity of an expression product of the polypeptide or of the polypeptide, as between the test group and the control group.

25

30

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polypeptide, selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLO1, A1BG, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of: (a) selecting a test group having a host cell comprising the polypeptide wherein such host cell is heterologous to the polypeptide, a part thereof or an isolated polypeptide thereof and a control group; (b) treating the test group using a compound; and (c) determining the relative quantity or relative activity of a product of the polypeptide or of the polypeptide, as between the test group and the control group.

10 The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a human polynucleotide, wherein the human polynucleotide is a control region of a gene selected from the group consisting of G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of: (a) selecting a control animal having the human polynucleotide and a test animal having the human polynucleotide; (b) treating the test animal using a compound; and, (c) determining the relative quantity of an expression product of an operably linked polynucleotide to the human polynucleotide, as between the control animal and the test animal.

20 The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a human polynucleotide, wherein the human polynucleotide is a control region of a gene selected from the group consisting of G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of: (a) selecting a host cell comprising the human polynucleotide wherein such host cell is heterologous to the polynucleotide; (b) cloning the host cell and separating the clones into a test group and a control group; (c) treating the test group using a compound; and (d) determining the relative quantity of an expression product of an operably linked polynucleotide to the human polynucleotide, as between the test group and the control group.

30 The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a human polynucleotide, wherein the human polynucleotide is a control region of a gene selected from the group consisting of G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of: (a) selecting a test group having a host cell comprising the human polynucleotide wherein such host cell is heterologous to the

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

polynucleotide, a part thereof or an isolated polynucleotide thereof and a control group; (b) treating the test group using a compound; and (c) determining the relative quantity of an expression product of an operably linked polynucleotide to the human polynucleotide, as between the test group and the control group.

5

The invention teaches a composition for treating a disorder involving fatty acid regulated genes, the composition comprising a compound which modulates a polynucleotide from the coding sequence selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase and a pharmaceutically acceptable carrier.

10

The invention teaches a composition for treating a fatty acid disorder comprising a compound which modulates a polypeptide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, A1BG, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase and a pharmaceutically acceptable carrier.

15

The invention teaches compositions for treating a fatty acid disorder comprising a compound which modulates a control region selected from the group consisting of G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase and a pharmaceutically acceptable carrier.

20

In another embodiment, the invention teaches a method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder involving fatty acid regulated genes in a subject, the method comprising detecting a germline alteration in a polynucleotide representing the coding sequence selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase in the subject, comprising comparing the germline sequence of the polynucleotide from a tissue sample from the subject with the germline sequence of a wild-type of the polynucleotide, wherein an alteration in the germline sequence of the subject indicates the presence of or a predisposition to the disorder.

25

30

The invention also teaches a method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder involving fatty acid regulated genes in a subject, the method comprising detecting a germline alteration in a human polynucleotide representing the control region selected from the group

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

consisting of G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase in the subject, comprising comparing the germline sequence of the human polynucleotide from a tissue sample from the subject with the germline sequence of a wild-type of the human polynucleotide, wherein an alteration in the germline sequence of the subject indicates the presence of or a predisposition to the disorder.

The invention also teaches a method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder involving fatty acid regulated genes in a subject, the method comprising comparing the sequence of a polypeptide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, A1BG, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase from a tissue sample from the subject with the sequence of a wild-type of the polypeptide, wherein an alteration in the sequence of the subject as compared to the wild-type indicates the presence of or a predisposition to the disorder involving genes altered by fatty acids.

The invention further teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes a disorder involving fatty acid regulated genes, the method comprising the steps of: (a) selecting a control animal and a test animal both having a gene selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, FTF1, GLOL, A1GB, Spot-14, delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, and METP or a control region sequence thereof; (b) treating the test animal using a compound; and, (c) determining the relative quantity of an expression product of the gene, as between the control animal and the test animal.

The invention also teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes a disorder involving fatty acid regulated genes, the method comprising the steps of: (a) selecting a host cell containing a gene selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, FTF1, GLOL, A1GB, Spot-14, delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, and METP or a control region sequence thereof; (b) cloning the host cell and separating the clones into a test group and a control group; (c) treating the test group using a compound; and, (d) determining the relative quantity of an expression product of the gene, as between the test group and the control group.

The invention teaches a method for detecting the presence of or the predisposition for a disorder involving fatty acid regulated genes, the method comprising determining the level of expression

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

of an expression product of a gene selected from a polynucleotide segment of the invention in a subject relative to a predetermined control level of expression, wherein a modified expression of the expression product as compared to the control is indicative of the presence of or the predisposition for a disorder involving genes altered by fatty acids.

5

The invention teaches a method for detecting the presence of or the predisposition for a disorder involving genes altered by fatty acids, the method comprising determining the level of expression of an expression product of a gene selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD3, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14, delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, FTF1, GLO1, AIBG and METP, in a subject relative to a predetermined control level of expression, wherein a modified expression of the expression product as compared to the control is indicative of the presence of or the predisposition for a disorder involving genes altered by fatty acids.

10

15 In another embodiment, the invention teaches an antibody immunoreactive with a polypeptide of the invention or an immunogenic portion thereof. In embodiments, the antibody is immunoreactive with a polypeptide selected from the group consisting of FTF1, GLO1 and METP or an immunogenic portion thereof.

20

The invention teaches a method for screening a medium for a polypeptide of the invention or selected from the group consisting of FTF1, GLO1 and METP, comprising: (a) labelling an antibody of the invention with a marker molecule to form a conjugate; (b) exposing the conjugate to the medium; and (c) determining whether there is binding between the conjugate and a biomolecule in the medium, wherein the binding indicates the presence of the polypeptide.

25

The invention teaches a method for screening a medium for a polypeptide of the invention or selected from the group consisting of FTF1, GLO1 and METP, comprising: (a) exposing an antibody of the invention to the medium; (b) exposing the antibody to a marker molecule; and (c) determining whether there is binding between the marker molecule and a biomolecule in the medium, wherein the binding indicates the presence of the polypeptide.

30

The invention teaches a method for identifying genes or proteins regulated by fat, comprising: (a) selecting a species of animals and separating them into a test group and a control group; (b)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- feeding the test group and the control group a fat free diet for a period of time; (c) subsequently providing the test group enterally or parenterally with highly purified polyunsaturated fatty acids for a second period of time; (d) subsequently removing tissues from the control group and the test group; (e) comparing RNA from the tissues of the control group with tissues from the test group and selecting RNA which is expressed at a different level as between the test group and the control group; and (f) determining the genes or proteins associated with the selected RNA. The period of time may be at least 2 weeks. The second period of time is at least 2 weeks. The comparing may be by differential display and Northern blotting.
- 10 The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of two or more human polynucleotides, wherein the human polynucleotides are control regions of genes selected from the group consisting of METP, GLOL, FTF1, A1BG, SCD, GPAT, G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, the method comprising the steps of: (a) selecting two or more host cells comprising the human
- 15 polynucleotides wherein such host cells are heterologous to the polynucleotides; (b) cloning the host cells and separating the clones into a test group and a control group; (c) treating the test group using a compound; and (d) determining the relative quantities of expression products of operably linked polynucleotides to the human polynucleotides, as between the test group and the control group.
- 20 The invention teaches a method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of two or more human polynucleotides, wherein the human polynucleotides are control regions of genes selected from the group consisting of METP, GLOL, FTF1, A1BG, SCD, GPAT, G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase,
- 25 comprising the steps of: (a) selecting a test group having two or more host cells containing the human polynucleotides wherein such host cells are heterologous to the polynucleotides, parts thereof or isolated polynucleotides thereof and a control group; (b) treating the test group using a compound; and (c) determining the relative quantities of expression products of operably linked polynucleotides to the human polynucleotides, as between the test group and the control group.
- 30 The invention teaches a composition for treating a disorder involving fatty acid regulated genes comprising a compound which modulates two or more human polynucleotide control regions of genes selected from the group consisting of METP, GLOL, FTF1, A1BG, SCD, GPAT, G6PD,

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoil-CoA isomerase and a pharmaceutically acceptable carrier.

5 The invention teaches a method for detecting the presence of or the predisposition for a disorder involving genes altered by fatty acids, the method comprising determining the level of expression of two or more expression products of genes selected from the group consisting of human SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14, delta-3, delta-2-enoil-CoA isomerase, FTF1, GLOL, AIBG and MEIP, in a subject relative to a predetermined control level of
10 expression, wherein any modified expression of the expression products as compared to the control indicates the presence of or the predisposition for a disorder involving genes altered by fatty acids.

The comparing or determining of the invention may be performed by a method selected from the group consisting of immunoblotting, immunocytochemistry, enzyme-linked immunosorbent
15 assay, DNA fingerprinting, in situ hybridization, polymerase chain reaction, reverse transcription polymerase chain reaction, radioimmunoassay, immunoradiometric assay and immunoenzymatic assay.

The compositions of the invention may be selected from the group consisting of small organic
20 molecules, peptides, polypeptides, antisense molecules, oligonucleotides, polynucleotides, fatty acids, antibodies of the invention, and functional and chemical derivatives thereof.

The invention teaches the use of a composition of the invention for treating a fatty acid disorder.

25 The disorder may be a PUFA disorder. The disorder may be selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders (including but not limited to hypertriglyceridemia, dyslipidemia, atherosclerosis, coronary artery disease, cerebrovascular disease and peripheral vascular disease), inflammation (including but not limited to sinusitis, asthma, pancreatitis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acne), body weight disorders (including but not limited to obesity, cachexia and
30 anorexia), psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The invention will now be described with reference to the drawings, wherein:

- FIG. 1. Figure 1 shows the nucleotide sequence and the amino acid sequence of the rat mitochondrial energy transfer protein, METP. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 1 and 2.
- 5 FIG. 2. Figure 2 shows the nucleotide sequence and the amino acid sequence of the human mitochondrial energy transfer protein, METP. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 3 and 4.
- 10 FIG. 3. Figure 3 shows a pairwise alignment between the rat (rMETP) and human (hMETP) mitochondrial energy transfer proteins. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 2 and 4.
- 15 FIG. 4. Figure 4 shows a multiple alignment among four members of the human mitochondrial energy transfer protein gene family, METP (SEQ. ID. No. 4), MCAT (mitochondrial carnitine/acylcarnitine translocase), TXTP (tricarboxylate transport protein) and UCP2 (mitochondrial uncoupling protein 2), highlighting in the box the PROSITE signature motif, PS00215, for this protein family.
- 20 FIG. 5. Figure 5 shows a graph illustrating the Dense Alignment Surface (DAS) method prediction for transmembrane regions for the human METP.
- FIG. 6. Figure 6 shows the nucleotide sequence of the control region of the human METP gene, position -1 being the nucleotide immediately upstream of the ATG. This sequence corresponds to SEQ. ID. NO. 5.
- 25 FIG. 7. Figure 7 shows the nucleotide sequence and the amino acid sequence of the rat glyoxalase II-like protein, GLOL. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 6 and 7.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- FIG. 8. Figure 8 shows the nucleotide sequence and the amino acid sequence of the human glyoxalase II-like protein, GLOL. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 8 and 9.
- FIG. 9. Figure 9 shows a pairwise alignment between the rat (rGLOL) and human (hGLOL) glyoxalase II-like proteins. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 7 and 9.
- FIG. 10. Figure 10 shows a pairwise alignment between the human glyoxalase II-like protein (GLOL; SEQ. ID. NO. 9) and human glyoxalase II (GLO), indicating the high degree of similarity between these two proteins in domain one (underlined) and the invariant residues involved in metal ion coordination (marked by asterisks).
- FIG. 11. Figure 11 shows a three dimensional ribbon representation of the human glyoxalase II enzyme with the two zinc ions indicated as filled circles and domain one, the template upon which GLOL was modeled, surrounded by an oval.
- FIG. 12. Figure 12 shows a three dimensional ribbon representation of the modeled human GLOL.
- FIG. 13. Figure 13 shows the nucleotide sequence of the control region of the human GLOL gene, position -1 being the nucleotide immediately upstream of the ATG. This sequence corresponds to SEQ. ID. NO. 10.
- FIG. 14. Figure 14 shows the nucleotide sequence and the amino acid sequence of the rat fat responsive transcription factor, FTF1. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 11 and 12.
- FIG. 15. Figure 15 shows the nucleotide sequence and the amino acid sequence of the human fat responsive transcription factor, FTF1. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 13 and 14.
- FIG. 16. Figure 16 shows a multiple alignment among the mouse OASIS gene (MUS) and the rat (RAT) and human (HUM) FTF1 proteins. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 12 and 14.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- FIG. 17. Figure 17 shows a three dimensional ribbon representation of c-fos and c-jun binding to a DNA template.
- FIG. 18. Figure 18 shows a three dimensional ribbon representation of c-fos and the modeled FTF1 binding to a DNA template.
- FIG. 19. Figure 19 shows the nucleotide sequence of the control region of the human FTF1 gene, position -1 being the nucleotide immediately upstream of the ATG. This sequence corresponds to SEQ. ID. Nos. 15.
- FIG. 20. Figure 20 shows the nucleotide sequence and the amino acid sequence of the rat alpha-1B-glycoprotein, A1BG. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 16 and 17.
- FIG. 21. Figure 21 shows the nucleotide sequence and the amino acid sequence of the human alpha-1B-glycoprotein, A1BG. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 18 and 19.
- FIG. 22. Figure 22 shows a pairwise alignment between the rat (rA1BG) and human (hA1BG) alpha-1B-glycoproteins. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 17 and 19.
- FIG. 23. Figure 23 shows a three dimensional ribbon representation of the extracellular ligand-binding portion of the human killer cell inhibitory receptor, KIR2DL2.
- FIG. 24. Figure 24 shows a three dimensional ribbon representation of the modeled fourth and fifth domains of the human A1BG.
- FIG. 25. Figure 25 shows the nucleotide sequence of the control region of the human A1BG gene, position -1 being the nucleotide immediately upstream of the ATG. This sequence corresponds to SEQ. ID. NO. 20.
- FIG. 26. Figure 26 shows the nucleotide sequence of the control region of the human SCD gene, position -1 being the nucleotide immediately upstream of the ATG. This sequence corresponds to SEQ. ID. NO. 21.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

FIG. 27. Figure 27 shows a comparison of the polyunsaturated fatty acids response region (PUFA-RR) among the promoters for the mouse SCD1 (mSCD1), the mouse SCD2 (mSCD2) and the human SCD (hSCD; SEQ. ID. Nos. 22 and 23), position -1 being the nucleotide immediately upstream of the ATG.

5 FIG. 28. Figure 28 shows the nucleotide sequence and the amino acid sequence of the human glycerol-3-phosphate acyltransferase, hGPAT. These sequences correspond to SEQ. ID. Nos. 24 and 25.

FIG. 29. Figure 29 shows a multiple alignment among the human (hGPAT), the rat (rGPAT) and mouse (mGPAT) glycerol-3-phosphate acyltransferase proteins. This sequence
10 corresponds to SEQ. ID. NO. 25.

FIG. 30. Figure 30 shows the nucleotide sequence of the control region of the human GPAT gene, position -1 being the nucleotide immediately upstream of the ATG. This sequence corresponds to SEQ. ID. NO. 26.

DETAILED DESCRIPTION OF EMBODIMENTS

It is well established that fatty acids are important in maintaining cellular membranes and processes. They are also seen as having important, yet poorly understood roles in human disease. Since the clinical effects of fatty acids are so variable, the present inventors postulated that fatty acids could be
15 regulating specific genes in certain disease conditions. To date, little is known about how fatty acids regulate genes or gene expression.

The present inventors used a fat free dietary model supplemented with various PUFAs, to elicit tissue fatty acid changes. By using this dietary model and differential display techniques, the present inventors identified genes which are regulated by fatty acids. Some of these identified genes are novel
20 while some are well known. The inventors' discovery of fat regulated genes leads to a better understanding of why certain diseases can be treated more effectively with fatty acids. The present invention thus teaches the development of compounds for the treatment of human or mammalian fatty acid metabolism disorders.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Drugs that modify fatty acid metabolism should produce more dramatic changes in fatty acid levels than would be possible through dietary intervention. This enables the development of effective therapeutics which would not be possible using fatty acids as drugs.

Definitions

- 5 The following illustrative explanations are provided to facilitate understanding of certain terms used frequently herein. The explanations are provided as a convenience and are not limitative of the invention.

10 **Agonist** refers to any molecule or pharmaceutical agent, such as a drug or hormone, which enhances the activity of another molecule.

Antagonist refers to any molecule or pharmaceutical agent, such as a drug or hormone, which inhibits or extinguishes the activity of another molecule.

- 15 **Chemical Derivative.** As used herein, a molecule is said to be a "chemical derivative" of another molecule when it contains additional chemical moieties not normally a part of the molecule. Such moieties can improve the molecule's solubility, absorption, biological half life, and the like. The moieties can alternatively decrease the toxicity of the molecule, eliminate or attenuate any undesirable side effect of the molecule, and the like. Moieties capable of mediating such effects are disclosed in
20 Mack E.W., 1990, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 13th edition

Procedures for coupling such moieties to a molecule are well known in the art.

- 25 **Compositions** include genes, proteins, polynucleotides, peptides, compounds, drugs, and pharmacological agents.

- Control region** refers to a nucleic acid sequence capable of, or required for, assisting or impeding initiation, termination, or otherwise regulating the transcription of a gene. The control region may include a promoter, enhancer, silencer and/or any other regulatory element. A control region also
30 includes a nucleic acid sequence that may or may not be independently or exclusively sufficient to

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

initiate, terminate, or otherwise regulate transcription, however, is capable of effecting such regulation in association with other nucleic acid sequences.

5 **Desaturase** refers to a fatty acid desaturase, which is an enzyme capable of generating a double bond in the hydrocarbon region of a fatty acid molecule.

Disorder as used herein refers to derangement or abnormality of structure or function. Disorder includes disease.

10 **Drug.** Drugs include, but are not limited to proteins, peptides, degenerate peptides, agents purified from conditioned cell medium, organic molecules, inorganic molecules, antibodies or oligonucleotides. The drug can be naturally occurring or synthetically or recombinantly produced.

15 **Enhancer** is a nucleic acid sequence comprising a DNA regulatory element that enhances or increases transcription when bound by a specific transcription factor or factors. Moreover, an enhancer may function in either orientation and in any location (upstream or downstream relative to the promoter) to effect and generate increased levels of gene expression when bound by specific factors. In addition, according to the present invention, an enhancer also refers to a compound (i.e. test compound) that increases or promotes the enzymatic activity of the fatty acid regulated gene, and/or
20 increases or promotes the transcription of the gene.

Fatty Acids are a class of compounds comprising a long saturated or mono or polyunsaturated hydrocarbon chain and a terminal carboxyl group.

25 **Functional Derivative.** A "functional derivative" of a sequence, either protein or nucleic acid, is a molecule that possesses a biological activity (either functional or structural) that is substantially similar to a biological activity of the protein or nucleic acid sequence. A functional derivative of a protein can contain post-translational modifications such as covalently linked carbohydrate, depending on the necessity of such modifications for the performance of a specific function. The term
30 "functional derivative" is intended to include the "fragments," "segments," "variants," "analogs," or "chemical derivatives" of a molecule.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Gene refers to a nucleic acid molecule or a portion thereof, the sequence of which includes information required for the production of a particular protein or polypeptide chain. The polypeptide can be encoded by a full-length sequence or any portion of the coding sequence, so long as the functional activity of the protein is retained. A gene may comprise regions preceding and following the coding region as well as intervening sequences (introns) between individual coding segments (exons). A "heterologous" region of a nucleic acid construct (i.e. a heterologous gene) is an identifiable segment of DNA within a larger nucleic acid construct that is not found in association with the other genetic components of the construct in nature. Thus, when the heterologous gene encodes a mammalian fatty acid regulated gene, the gene will usually be flanked by a promoter that does not flank the structural genomic DNA in the genome of the source organism.

Host system may comprise a cell, tissue, organ, organism or any part thereof, which provides an environment or conditions that allow for, or enable, transcription and/or translation.

Identity, similarity, homology or homologous, refer to relationships between two or more polynucleotide sequences, as determined by comparing the sequences. In the art, identity also means the degree of sequence relatedness between polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by the match between strings of such sequences. Both identity and similarity can be readily calculated (Lesk A.M., ed., 1988, *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, NY; Smith D.W., ed., 1993, *Biocomputing: Informatics and Genome Project*, Academic Press, NY; Griffin A.M. and Griffin H.G., eds., 1994, *Computer Analysis of Sequence Data, Part 1*, Humana Press, NJ; von Heijne G., 1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, NY and Gribskov M. and Devereux J., eds., 1991, *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, NY). While there exist a number of methods to measure identity and similarity between two polynucleotide sequences, both terms are well known to skilled artisans (von Heijne G., 1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, NY; Gribskov M. and Devereux J., eds., 1991, *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, NY; Carillo H. and Lipman D., 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073). Methods commonly employed to determine identity or similarity between sequences include, but are not limited to those disclosed in Carillo H. and Lipman D., 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073. Methods to determine identity and similarity are codified in computer programs. Computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, GCG program package (Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid Res.*, 12: 387-395), BLASTP, BLASTN and FASTA (Altschul et al., 1990, *J. Molec. Biol.*, 215: 403-410).

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Isolated means altered "by the hand of man" from its natural state; i.e., that, if it occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a naturally occurring polynucleotide naturally present in a living organism in its natural state is not "isolated," but the same polynucleotide separated from coexisting materials of its natural state is "isolated", as the term is employed herein. As part of or following isolation, such polynucleotides can be joined to other polynucleotides, such as DNA, for mutagenesis, to form fusion proteins, and for propagation or expression in a host, for instance. The isolated polynucleotides, alone or joined to other polynucleotides such as vectors, can be introduced into host cells, in culture or in whole organisms. Introduced into host cells in culture or in whole organisms, such DNA still would be isolated, as the term is used herein, because they would not be in their naturally occurring form or environment. Similarly, the polynucleotides may occur in a composition, such as a media formulations, solutions for introduction of polynucleotides, for example, into cells, compositions or solutions for chemical or enzymatic reactions, for instance, which are not naturally occurring compositions, and, therein remain isolated polynucleotides within the meaning of that term as it is employed herein.

Mutation. A "mutation" is any detectable change in the genetic material. A mutation can be any (or a combination of) detectable, unnatural change affecting the chemical or physical constitution, mutability, replication, phenotypic function, or recombination of one or more deoxyribonucleotides; nucleotides can be added, deleted, substituted for, inverted, or transposed to new positions with and without inversion. Mutations can occur spontaneously and can be induced experimentally by application of mutagens or by site-directed mutagenesis. A mutant polypeptide can result from a mutant nucleic acid molecule.

Nucleic acid construct refers to any genetic element, including, but not limited to, plasmids and vectors, that incorporate polynucleotide sequences. For example, a nucleic acid construct may be a vector comprising a promoter or control region that is operably linked to a heterologous gene.

Operably linked as used herein indicates the association of a promoter or control region of a nucleic acid construct with a heterologous gene such that the presence or modulation of the promoter or control region influences the transcription of the heterologous gene, including genes for reporter sequences. Operably linked sequences may also include two segments that are transcribed onto the same RNA transcript. Thus, two sequences, such as a promoter and a "reporter sequence" are operably

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

linked if transcription commencing in the promoter produces an RNA transcript of the reporter sequence.

- Plasmids.** Starting plasmids disclosed herein are either commercially available, publicly available, or can be constructed from available plasmids by routine application of well known, published procedures. Many plasmids and other cloning and expression vectors that can be used in accordance with the present invention are well known and readily available to those of skill in the art. Moreover, those of skill readily may construct any number of other plasmids suitable for use in the invention.
- Polynucleotides(s)** of the present invention may be in the form of RNA, such as mRNA, or in the form of DNA, including, for instance, cDNA and genomic DNA obtained by cloning or produced by chemical synthetic techniques or by a combination thereof. The DNA may be double-stranded or single-stranded. Single-stranded polynucleotides may be the coding strand, also known as the sense strand, or it may be the non-coding strand, also referred to as the anti-sense strand. Polynucleotides generally refers to any polynucleotide or polynucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. Thus, for instance, polynucleotides as used herein refers to, among others, single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions or single-, double- and triple-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded, or triple-stranded, or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, polynucleotide as used herein refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The strands in such regions may be from the same molecule or from different molecules. The regions may include all of one or more of the molecules, but more typically involve only a region of some of the molecules. One of the molecules of a triple-helical region often is an oligonucleotide. As used herein, the term polynucleotide also includes DNA or DNA that contain one or more modified bases. Thus, DNA or DNA with backbones modified for stability or for other reasons are "polynucleotides" as that term is intended herein. Moreover, DNA or DNA comprising unusual bases, such as inosine, or modified bases, such as tritylated bases, to name just two examples, are polynucleotides as the term is used herein. It will be appreciated that a great variety of modifications have been made to DNA and RNA that serve many useful purposes known to those of skill in the art. The term polynucleotide as it is employed herein embraces such chemically, enzymatically or metabolically modified forms of polynucleotides, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells,

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

including simple and complex cells, *inter alia*. Polynucleotides embraces short polynucleotides often referred to as oligonucleotide(s). It will also be appreciated that RNA made by transcription of this doubled stranded nucleotide sequence, and an antisense strand of a nucleic acid molecule of the invention or an oligonucleotide fragment of the nucleic acid molecule, are contemplated within the scope of the invention. An antisense sequence is constructed by inverting the sequence of a nucleic acid molecule of the invention, relative to its normal presentation for transcription. Preferably, an antisense sequence is constructed by inverting a region preceding the initiation codon or an unconserved region. The antisense sequences may be constructed using chemical synthesis and enzymatic ligation reactions using procedures known in the art.

Promoter refers to a nucleic acid sequence comprising a DNA regulatory element capable of binding RNA polymerase directly or indirectly to initiate transcription of a downstream (3' direction) gene. In accordance with the present invention, a promoter of a nucleic acid construct that includes a nucleotide sequence, wherein the nucleotide sequence may be linked to a heterologous gene such that the induction of the promoter influences the transcription of the heterologous gene.

Purified. A "purified" protein or nucleic acid is a protein or nucleic acid preparation that is generally free of contaminants, whether produced recombinantly, chemically synthesized or purified from a natural source.

Recombinant refers to recombined or new combinations of nucleic acid sequences, genes, or fragments thereof which are produced by recombinant DNA techniques and are distinct from a naturally occurring nucleic acid sequence

Regulatory element refers to a deoxyribonucleotide sequence comprising the whole, or a portion of, a nucleic acid sequence to which an activated transcriptional regulatory protein, or a complex comprising one or more activated transcriptional regulatory proteins, binds so as to transcriptionally modulate the expression of an associated gene or genes, including heterologous genes.

Reporter gene is a nucleic acid coding sequence whose product is a polypeptide or protein that, is not otherwise produced by the host cell or host system, or which is produced in minimal or negligible amounts in the host cell or host system, and which is detectable by various known methods such that the reporter gene product may be quantitatively assayed to analyse the level of transcriptional activity

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

in a host cell or host system. Examples include genes for luciferase, chloramphenicol acetyl transferase (CAT), beta-galactosidase, secreted placental alkaline phosphatase and other secreted enzymes.

- 5 Silencer refers to a nucleic acid sequence or segment of a DNA control region such that the presence of the silencer sequence in the region of a target gene suppresses the transcription of the target gene at the promoter through its actions as a discrete DNA segment or through the actions of trans-acting factors that bind to these genetic elements and consequently effect a negative control on the expression of a target gene.

10

Stringent hybridization conditions are those which are stringent enough to provide specificity, reduce the number of mismatches and yet are sufficiently flexible to allow formation of stable hybrids at an acceptable rate. Such conditions are known to those skilled in the art and are described, for example, in Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, 2nd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY or Ausubel et al., 1994-, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY. By way of example only, stringent hybridization with short nucleotides may be carried out at 5-10°C below the T_M using high concentrations of probe such as 0.01-1.0 pmole/ml. Preferably, the term "stringent conditions" means hybridization will occur only if there is at least 95% and preferably at least 97% identity between the sequences.

15

Tag refers to a specific short amino acid sequence, or the oligonucleotide sequence that encodes it, wherein said amino acid or nucleic acid sequence may comprise or encode, for example, a c-myc epitope and/or a string of six histidine residues recognizable by commercially available antibodies. In practice, a tag facilitates the subsequent identification and purification of a tagged protein.

20

Tagged protein as used herein refers to a protein comprising a linked tag sequence. For example, a tagged protein includes a mammalian fatty acid regulated polypeptide linked to a c-myc epitope and six histidine residues at the carboxyl terminus of the amino acid sequence.

25

- 30 Test compounds as used herein encompass small molecules (e.g. small organic molecules), pharmacological compounds or agents, peptides, proteins, antibodies or antibody fragments, and nucleic acid sequences, including DNA and RNA sequences.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Transfection refers to a process whereby exogenous or heterologous DNA (i.e. a nucleic acid construct) is introduced into a recipient eukaryotic host cell. Therefore, in eukaryotic cells, the acquisition of exogenous DNA into a host cell is referred to as transfection. In prokaryotes and eukaryotes (for example, yeast and mammalian cells) introduced DNA may be maintained on an episomal element such as a plasmid or integrated into the host genome. With respect to eukaryotic cells, a stably transfected cell is one in which the introduced DNA has become integrated into a chromosome so that it is inherited by daughter cells through chromosome replication. This stability is demonstrated by the ability of the eukaryotic cell to establish cell lines or clones comprised of a population of daughter cells containing the introduced DNA.

Transformation refers to a process whereby exogenous or heterologous DNA (i.e. a nucleic acid construct) is introduced into a recipient prokaryotic host cell. Therefore, in prokaryotic cells, the acquisition of exogenous DNA into a host cell is referred to as transformation. Transformation in eukaryotes refers to the conversion or transformation of eukaryotic cells to a state of unrestrained growth in culture, resembling a tumorigenic condition. In prokaryotes and eukaryotes (for example, yeast and mammalian cells) introduced DNA may be maintained on an episomal element such as a plasmid or integrated into the host genome. With prokaryotic cells, a stably transformed bacterial cell is one in which the introduced DNA has become integrated into a chromosome so that it is inherited by daughter cells through chromosome replication. This stability is demonstrated by the ability of the prokaryotic cell to establish cell lines or clones comprised of a population of daughter cells containing the introduced DNA.

Transfection/transformation as used herein refers to a process whereby exogenous or heterologous DNA (e.g. a nucleic acid construct) has been introduced into a eukaryotic or prokaryotic host cell or into a host system.

Variant(s) of polynucleotides are polynucleotides that differ in nucleotide sequence from another, reference polynucleotide. A "variant" of a protein or nucleic acid is meant to refer to a molecule substantially similar in structure and biological activity to either the protein or nucleic acid. Thus, provided that two molecules possess a common activity and can substitute for each other, they are considered variants as that term is used herein even if the composition or secondary, tertiary, or quaternary structure of one of the molecules is not identical to that found in the other, or if the amino acid or nucleotide sequence is not identical. Generally, differences are limited so that the nucleotide

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

sequences of the reference and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. Changes in the nucleotide sequence of the variant may be silent. That is, they may not alter the amino acids encoded by the polynucleotide. Where alterations are limited to silent changes of this type a variant will encode a polypeptide or polynucleotide with the same amino acid sequence as the reference. Changes in the nucleotide sequence of the variant may alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Such nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide or polynucleotide encoded by the reference sequence.

Vector. A plasmid or phage DNA or other DNA sequence into which DNA can be inserted to be cloned. The vector can replicate autonomously in a host cell, and can be further characterized by one or a small number of endonuclease recognition sites at which such DNA sequences can be cut in a determinable fashion and into which DNA can be inserted. The vector can further contain a marker suitable for use in the identification of cells transformed with the vector. Markers, for example, are tetracycline resistance or ampicillin resistance. The words "cloning vehicle" are sometimes used for "vector."

- 10 As hereinbefore mentioned, the present inventors have identified and sequenced various DNA sequences encoding genes associated with fatty acid metabolism and their promoters, herein referred to as "subject polynucleotide(s)". The proteins, peptides and polypeptides produced by or expressed from the subject polynucleotides are herein referred to as "subject polypeptides."
- 15 It will be appreciated that the invention includes nucleotide or amino acid sequences which have substantial sequence homology with, respectively, the subject polynucleotides or polypeptides. The term "sequences having substantial sequence homology" means those nucleotide and amino acid sequences which have slight or inconsequential sequence variations from the subject polynucleotides; i.e. the homologous sequences function in substantially the same manner to produce substantially the same polypeptides as the actual sequences. The variations may be attributable to local mutations or structural modifications. It is expected that a sequence having 85-90% sequence homology with the DNA sequence of the invention will provide functional subject polypeptides which retain substantially the same biological function or activity as the polynucleotide encoded by the subject polynucleotides. Further embodiments of the invention are polynucleotides that are at least 70% identical over their entire length to a subject polynucleotide, and polynucleotides which are
- 20
- 25

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

complementary to such polynucleotides. Other embodiments are polynucleotides that comprise a region that is at least 80% identical over their entire length to a subject polynucleotide and polynucleotides complementary thereto. This includes polynucleotides at least 90% identical over their entire length to the same, and among these embodiments are polynucleotides with at least 95%
5 homology. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred among those with at least 95%, and among these those with at least 98% and at least 99% are particularly highly preferred, with at least 99% being the more preferred.

Differential Gene Expression in Liver of Rats Fed Diets Supplemented with PUFAs

10

The present inventors have identified genes that were modulated or regulated by dietary fat using a differential display technique (Liang P. and Pardee A.B., 1992, *Science*, 257: 967-971). Groups of female Wistar rats were fed fat free diet for two weeks. After two weeks all groups but one (controls) were supplemented with highly purified PUFAs for an additional two weeks. The rats were sacrificed
15 and tissues were removed to obtain RNA for differential display and Northern blotting. Differential display identified genes regulated by dietary fat by comparing mRNA populations from rat liver.

20

For the study, the rats were divided into six groups and fed fat free diet for 14 days. Each group was fed fat free diet for an additional two weeks with the following supplements: group 1 - no supplement (fat free control); group 2 - linoleic acid (LA, 18:2n-6); group 3 - gamma-linolenic acid (GLA, 18:3n-6); group 4 - alpha-linolenic acid (ALA, 18:3n-3); group 5 - eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and group 6 - docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3). Fatty acids were administered in the diet at a fatty acid-specific concentration of 5% (w/w), as described in Example 1. The rats were fed *ad libitum*.

25

The protocol used in the present differential display experiment is based on, and closely followed, the Clontech Delta Differential Display Kit (Clontech Catalog No. K1810-1). Each primer combination was used with reverse-transcribed cDNA from three rats from each treatment group and all experiments were done independently in duplicate.

30

The inventors' preliminary differential display studies showed no differences between control and LA-treated groups. These previous studies along with other technical reasons led the present inventors

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

to choose groups 1 (no supplement, fat free control), 3 (GLA) and 6 (DHA) for the complete differential display screen.

5 Rat liver cDNA was amplified using 90 combinations of 10 arbitrary P primers and 9 anchored T primers as well as 55 combinations of P primers only. Control, GLA and DHA samples were prepared in triplicate for a total of nine samples for each primer pair. Typically, reactions for five primer pairs were carried out at the same time. These samples were run together on a polyacrylamide gel. The experiment was repeated to verify the results. A total of 2610 individual reactions were performed and analyzed. Only bands which were differentially expressed in both experiments were further
10 characterized.

Results

15 Inspection of the differential display gels revealed 144 bands that appeared to be differentially expressed in at least two independent experiments. Each experiment included three rats from each of the diet groups 1, 3 and 6. A total of 84 unique bands, being the PCR products of P and T primers, were identified as well as an additional 60 duplicate bands apparently resulting from an amplification reaction using only one of the two primers present in the reaction. One hundred of the 144
20 differentially displayed hits were cloned into pCRII (Invitrogen) using the TA-cloning technique, and used for Northern blot analyses. The 100 Northern blots resulted in the confirmation of 61 clones which were differentially expressed and 39 clones which were not. The Northern blot membranes contained rat liver RNA isolated from the control, LA-, GLA-, EPA- and DHA-treated animal groups.

25 Subsequent sequencing of the 61 positively-identified clones on Northern blots led to the identification of 28 unique DNA sequences belonging to 14 different genes. The mRNA levels of eleven of these genes are higher under fat free conditions and reduced when fed PUFAs while the mRNA level of three of these genes are lower under fat free conditions compared to PUFA supplementation. These 14 genes are described in Tables 1 and 2.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Genes Discovered

I. *METP Gene and Polypeptide*

5 One of the differentially expressed bands identified during the study was a rat partial cDNA clone identified as belonging to an uncharacterized and unknown mitochondrial carrier protein gene, which was designated METP (mitochondrial energy transfer protein). Using GeneTrapper™ technology (Gibco BRL), the rat METP gene was cloned. The full length coding sequence (CDS) was determined by DNA sequencing (Figure 1).

10 Using bioinformatic techniques, the human gene was located in GenBank's HIGS database on a fragment of genomic DNA from chromosome 14 (GenBank Accession No. AL135838). Oligonucleotide primers were synthesized and the proposed human gene sequence was verified by cloning and DNA sequencing (Figure 2). Exons were mapped onto genomic DNA from AL135838 and the gene was found to comprise 6 coding exons.

Using bioinformatic techniques, the control region of the human METP gene was identified and mapped out. The control region between positions -1 and -1500 from the ATG is shown in Figure 6.

20 The human and rat gene were compared and found to be 87% identical (89% positive) at the amino acid sequence level (Figure 3).

The human and rat proteins were found to belong to the mitochondrial energy transfer (carrier) protein family and contain 3 signature motifs which are characteristic of this protein family. Figure 4 shows a multiple alignment among four members of the human mitochondrial energy transfer protein gene family, METP, M/CAT (mitochondrial carnitine/acylcarnitine translocase; Genbank Accession Number NP_000378), TCTP (tricarboxylate transport protein; Genbank Accession Number P53007) and UCP2 (mitochondrial uncoupling protein 2; Genbank Accession Number NP_003346), highlighting in the box the PROSITE signature motif, PS00215, for this protein family. The motifs for the human protein are located at amino acid positions 19-28, 115-124 and 237-246 (boxed areas in Figure 4). The consensus pattern for the motif is P-x-[DE]-x-[LIVAT]-[RK]-x-[LRH]-[LIVMFY]-[QGAIIVM] (Prosite pattern PS00215).

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

A multiple sequence alignment showing the relationship among METP and closely related human proteins of the mitochondrial carrier protein family is shown in Figure 4.

- 5 The rat and human METP protein has a tripartite domain structure, which is indicative of this family of proteins. A graphic of the dot matrix analysis of the protein sequence was generated (data not shown). Each of the internally similar domains contains 2 transmembrane regions and a short loop. This is evident based on the Dense Alignment Surface (DAS) prediction (Cserzo et al., 1997, *Prot. Eng.*, 10: 673-676) result shown in Figure 5 for the human gene where the six peaks reaching the
- 10 strict cutoff limit are the predicted transmembrane regions.

Using the rat partial cDNA clone as the probe for Northern blotting, the relative abundance of mRNA for this gene in rat liver was shown to be dramatically increased after PUFA treatment (Tables 1 and 2).

- 15 Northern blot studies evaluating tissue distribution (see Example 37) in human and rat showed that METP transcript is only detected in liver.

- These observations confirm that METP is a liver specific mitochondrial carrier protein regulated by
- 20 polyunsaturated fatty acids. The present inventors' data suggest that mRNA abundance is increased in STZ-induced diabetic rats. Thus, the present invention describes a novel drug target, i.e. METP, which includes the use of the gene as well as the promoter to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of the gene or activity of the gene product.

- 25 II. *GLO1 Gene and Polypeptide*

- Another of the differentially expressed bands identified during the study was a rat partial cDNA clone highly similar to a human gene of unknown function. This human gene is referred to as a "mRNA expressed in thyroid gland" in GenBank Accession Nos. D83198 and NM_014297. Although the CDS
- 30 for this human gene sequence has been submitted to GenBank there are no existing publications for it.

GenBank's EST division was searched using BLASTN to identify rodent sequences containing the 5' end of the gene. Using a forward primer designed from one such identified mouse EST (GenBank

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Accession No. AW106717) and a reverse primer from the cloned rat partial cDNA, the full length coding sequence (CDS) of the rat GLOL (glyoxalase II-like) gene was determined. The sequence is shown in Figure 7.

- 5 The human sequence in GenBank was verified by PCR cloning (using primers designed from D83198) and DNA sequencing (Figure 8).

- Using bioinformatic techniques, the human gene was located in GenBank's BTGS division on a sequence assigned to chromosome 19 (GenBank Accession No. AC068785). Exons were mapped
10 onto this genomic DNA and the gene was found to contain 6 coding exons.

- Using bioinformatic techniques, the control region of the human GLOL gene was identified and mapped out. By searching GenBank's EST division using BLASTN with the human GLOL CDS, a collection of human ESTs containing 5' UTR for the gene was identified. This experiment revealed
15 the presence of an upstream intron 437 bp long. The present inventors' results differed from that listed in GenBank Accession No. D83198 in which the end of this intron is incorrectly identified as 5' UTR. The present inventors further identified an area containing highly repetitive elements upstream from the -905 position. The control region between positions -438 and -905 from the ATG was identified and is shown in Figure 13.

- 20 The amino acid sequences for the rat and the human genes were compared and found to be 92% identical or 95% similar (Figure 9).

- The present inventors determined that GLOL is a member of the metallo-beta-lactamase superfamily
25 of proteins. The protein is composed of two domains. Domain 1 comprises residues 1-168 and has homology to other metallo-beta-lactamases, while domain 2 comprises residues 169-227. Apart from the beta-lactamases a number of other proteins belong to this family. These proteins include thiolesterases, members of the glyoxalase II family that catalyse the hydrolysis of S-D-lactoyl-glutathione to form glutathione and D-lactic acid and a competence protein that is essential for natural
30 transformation in *Neisseria gonorrhoeae* and appears to be a transporter involved in DNA uptake. Except for the competence protein these proteins bind two zinc ions per molecule as cofactor.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

The human gene was searched against the Protein Data Bank's 3D structural database using BLASTP to identify possible structures against which GLOL may be modeled. The PDB ID code entries 1QH5 (human glyoxalase II with S-[N-hydroxy-N-bromophenylcarbamoyl] glutathione) and 1QH3 (human glyoxalase II with cacodylate and acetate ions present in the active site) were shown to be similar enough based on the primary sequence to warrant an effective modeling (25% identical, 43% similar over a stretch of amino acids 175 residues long in the GLOL sequence). The three dimensional representation of the human glyoxalase II is presented in Figure 11.

The model of GLOL is for domain one (residue 1-168 in GLOL). The three dimensional representation of the GLOL is presented in Figure 12. All 7 of the major amino acid residues involved in metal coordination in the human glyoxalase II (Genbank Accession Number NP_005317), listed below, are completely conserved in GLOL in primary structure (Figure 10) and are highly conserved in tertiary structural space.

Residue in glyoxalase II	Residue in GLOL
E54	H52
H56	H54
D58	D56
H59	H57
H110	H108
D134	D127
H173	H168

Other important residues involved in the binding of glutathione to glyoxalase II or to the formation of the active site (Cameron et al., 1999, *Structure Fold. Des.* 7: 1067-1078) are listed below along with how these residues correlate to similar residues in GLOL.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Residue in glyoxalase II	Residue in GLOL
D29	D25
T53	T31
T111	T109
G133	G126
C141	C134
K143	R136
E174	D169
Y175	Y170

These models provide important confirmation of the catalytic activity of GLOL and point to residues that are critical at the active site.

5

Using the rat partial cDNA clone as the probe for Northern blotting, the relative abundance of mRNA for the GLOL gene in rat liver was dramatically decreased after PUFA treatment (see Tables 1 and 2).

10

Northern blot studies evaluating tissue distribution in rat showed that GLOL transcript is expressed in all tissues examined, with high levels in liver and kidney. Similar studies in human also showed ubiquitous expression with high levels in liver, kidney and skeletal muscle and highest levels in colon.

These observations confirm that GLOL is a ubiquitously expressed glyoxalase II-like protein regulated by polyunsaturated fatty acids. Thus, the present invention describes a novel drug target, i.e.

15

GLOL, which includes the use of the gene as well as the promoter to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of the gene or activity of the gene product.

III. FTF1 Gene and Polypeptide

20

Another of the differentially expressed bands identified during the study was a rat partial cDNA clone orthologous to the mouse OASIS gene. Using 5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE), the 5' end of the rat FTF1 (fat responsive transcription factor 1) gene was cloned and the full length coding sequence (CDS) determined by DNA sequencing (Figure 14).

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Honma et al. (1999, *Mol. Brain Res.*, 69: 93-103) have identified and characterized the mouse OASIS gene (old-astrocyte specifically-induced substance). They indicate that the gene encodes a transcription factor belonging to the CREB/ATF gene family and have shown that it contains a leucine zipper motif and basic DNA-binding domain. These investigators showed that expression of the gene was induced upon cryo-injury to the mouse brain. They did not indicate any association of this transcription factor with PUFAs or with diabetes.

The human gene was identified by searching GenBank's HTGS database with the mouse OASIS amino acid sequence using TBLASTN and the mouse OASIS cDNA sequence using BLASTN. Exons were mapped onto this sequence (GenBank Accession No. AC009647) of genomic DNA using standard bioinformatics methods and the gene was identified as being composed of 12 exons. The human gene was cloned using primers designed using the sequence for hFTF1 derived from the GenBank HTGS database and the full length CDS was sequenced (Figure 15).

Using bioinformatic techniques, the present inventors identified and mapped out the control region of the human FTF1 gene. By searching GenBank's EST division, they identified a collection of human ESTs containing 5' UTR for the gene and identified an area containing highly repetitive elements upstream from the -883 position. The control region between position -1 and -883 from the AUG is shown in Figure 19.

A multiple sequence alignment indicating the similarities among the human and rat FTF1 genes and the mouse OASIS gene is presented in Figure 16. The human and rat FTF1 genes are 91% identical or 93% similar. The human and mouse genes are 90% identical while the rat and mouse genes are 95% identical.

GenBank's PDB database containing three-dimensional structures was searched using BLASTP to identify possible structures against which FTF1 may be modeled. A portion of the structure of the transcription factor c-jun (PDB ID code: 1FOS, c-jun proto-oncogene [transcription factor ap-1] dimerized with c-fos and complexed with DNA) was identified as the template structure (Figure 17). FTF1 was 37% identical to c-jun over a 43 amino acid stretch of sequence.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Using comparative modeling, amino acid residue positions 295-337 were modeled onto the structure of c-jun. This corresponds to the basic DNA binding region as well as the leucine zipper motif (Figures 18).

- 5 The human FTF1 gene contains the "bZIP transcription factors basic domain signature" (amino acids 295-310) and the "leucine zipper pattern" motifs (amino acids 332-353) as assessed by PROSITE. These motifs fall within the coiled coil prediction region (amino acids 285-359). The 3D-modeled region contains the bZIP basic domain signature and the N-terminal end of the beginning of the leucine zipper towards the C-terminus.

- 10 Residues 285-359 were mapped with high certainty as containing an amino acid sequence highly favored to form a coiled coil structure using the COILS v2.1 software (Lupas et al., 1991, *Science*, 252: 1162-1164). This coiled coil structure can be seen in the 3D model presented in Figure 18.

- 15 Using the rat partial cDNA clone as the probe for Northern blotting, the relative abundance of mRNA for the FTF1 gene in rat liver was dramatically decreased after PUFA treatment (Tables 1 and 2).

- 20 Northern blot studies evaluating tissue distribution in rat showed that FTF1 transcript is expressed in all tissues examined, with highest levels in adipose, ovaries and nerve. Similar studies in human showed high levels of expression in colon, placenta, lung, small intestine and heart.

- These observations confirm that FTF1 is a widely expressed transcription factor regulated by polyunsaturated fatty acids. Thus, the present invention describes a novel drug target, i.e. FTF1, which includes the use of the gene and/or the use of the promoter to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of fat regulated transcription factors.
- 25

IV. *A1BG Gene and Polypeptide*

- Another of the differentially expressed bands identified during the study was a rat partial cDNA clone highly similar to human alpha-1b-glycoprotein (A1BG). Using 5'- rapid amplification of cDNA ends (RACE), the 5' end of the rat A1BG was cloned and the full length coding sequence (CDS) was determined by DNA sequencing (Figure 20).
- 30

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

The mature human AIBG protein (474 amino acid residues) has been previously purified and the amino acid sequence of the protein determined by conventional protein sequencing (Ishiooka et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 2363-2367) but the gene has never been cloned or characterized.

- 5 The sequenced protein for AIBG did not begin with a methionine. Since AIBG is a plasma protein, it was hypothesized that the nascent protein should contain a signal sequence for the secretory pathway. Using a TBLASTN query with the human protein sequence in GenBank's EST division (dbest), the present inventors discovered a human EST (W25099) for the 5' end of the AIBG gene, which contained the missing exons for the beginning of the transcript. This EST extended the knowledge of
10 the 5' end of the gene to include 15 nucleotides of 5' UTR in exon 1 and most of exon 2 (see below).

- Using bioinformatic techniques, the human AIBG gene was located in the GenBank HTGS database on a fragment of genomic DNA from chromosome 19 using a TBLASTN query with the human protein sequence (GenBank Accession No. AC012313). Exons were mapped onto this sequence
15 showing that the gene was constructed of 8 exons. Oligonucleotide primers were synthesized and the human gene sequence was verified by cloning and DNA sequencing. The human AIBG gene sequence is presented in Figure 21.

- The amino acid sequence in this newly discovered N-terminus contains 21 residues that conform well
20 to classic signal sequences with a predicted cleavage site that generates the N-terminus of the mature protein. Both a neural network and a hidden Markov model predicted the same cleavage site with high probability (Henrik et al., 1997, *Prot. Eng.*, 10: 1-6). Therefore, the nascent protein contains 495 amino acid residues rather than 474 residues as previously reported.

- 25 Using bioinformatic techniques, the present inventors identified and mapped out the control region of the human AIBG gene. As previously indicated, they had identified a human EST (GenBank Accession No. W25099) containing 15 bp of 5' UTR. Searching GenBank's EST division, they further identified a transcriptionally active region upstream from the -430 position. The control region between positions -1 and -430 from the ATG is shown in Figure 25.

- 30 The rat and human AIBG were compared and found to be 44% identical or 55% similar at the amino acid sequence level (Figure 22).

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

A1BG belongs to the immunoglobulin superfamily of proteins with signature motifs for the immunoglobulin and major histocompatibility complex (MHC) domains. A1BG shows a pentameric domain structure. Each domain contains a disulfide bridge. The human protein is glycosylated at 4 asparagines throughout the sequence and contains a glucosamine attachment site.

5

The human A1BG was searched against the pdb database to identify proteins with known structures that were similar enough for an effective modeling. A number of natural killer (NK) cell inhibitory receptors (KIR) structures were identified as good candidates. KIR2DL2 was chosen as the appropriate structure for comparative modeling (PDB ID code: 2DLI - Killer Immunoglobulin Receptor 2dl2, Trigonal Form). See Figure 23.

10

NK cells activate their cytolytic killing against certain pathogen-infected or tumor cells with a concomitant discrimination between self and nonself, thereby directing the NK-mediated lysis only against appropriate target cells. One mechanism to achieve self-recognition is through regulation by cell surface inhibitory receptors. These receptors are capable of interacting with class I MHC molecules expressed on the target cell surface, abnormal cells being deficient in class I major histocompatibility complex molecules.

15

As shown in Figure 24, the last two domains of A1BG were modeled using this template structure due to the fact that the extracellular MHC class I-binding portion of KIR2DL2 is made up of only 2 domains.

20

Partial amino acid sequencing of antihemorrhagic factors from opossum (Catenese J.J. and Kress L.F., 1992, *Biochemistry*, 31: 410-418) and mongoose (Qi et al., 1994, *Toxicon*, 32: 1459-1469 and Qi et al., 1995, *Toxicon*, 33: 241-245) show a high degree of similarity to A1BG. These are plasma glycoprotein AHF1/AHF2 from mongoose (antihemorrhagic factor against snake venom metalloproteinases) and plasma glycoprotein oprin from opossum (proteinase inhibitor active against snake venom metalloproteinases). The known sequence of AHF1/AHF2 is approximately 50% identical to A1BG while the known sequence of oprin is approximately 35% identical, strongly suggesting that these proteins are, in fact, the orthologs to the human A1BG. It should be noted, however, that the human A1BG is reported not to have antihemorrhagic activity (Ishioka et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 2362-2367).

25

30

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

The present inventors' data are consistent with other reports and publications on A1BG, however, no other investigators have identified a role for this protein. The present inventors have observed that alpha-1b-glycoprotein is similar to the natural killer cell inhibitory receptor structures, which are important in controlling immune system functioning.

5 Using the rat partial cDNA clone as the probe for Northern blotting, the relative abundance of mRNA for the A1BG gene in rat liver was increased after PUFA supplementation (see Tables 1 and 2). The increased expression of A1BG mRNA was quite varied among the individual supplemented fatty acids with the highest expression observed in the DHA-treated group.

10 Northern blot studies evaluating tissue distribution in human and rat showed that A1BG transcript is highly liver specific.

These observations confirm that A1BG is a plasma protein produced by the liver and regulated by polyunsaturated fatty acids. The present inventors' data suggest that mRNA abundance is decreased in STZ-induced diabetic rats. Thus, the present invention describes a novel drug target, i.e. A1BG, which includes the use of the gene as well as the promoter to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of the gene or activity of the gene product, and for new test compounds effective against immunological diseases.

20 V. *SCD Genes and Polypeptides*

Two more differentially expressed bands identified during the study were rat partial cDNA clones for rat stearoyl-CoA desaturases (SCD1 and SCD2, GenBank Accession Nos. J02585 and AB032243, respectively) with known metabolic function. Furthermore, work from the present inventors' laboratory shows that mRNA expression as well as SCD activity is reduced in streptozotocin (STZ)-induced diabetes. This is also true for SCD1 mRNA expression in diabetic mice (Waters K.M. and Ntambi J.M., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 27773-27777). Conversely, the human SCD mRNA expression is high in some cancerous tissues (Li et al., 1994, *Int. J. Cancer*, 57: 348-352). These data suggest that the rat SCD1 and SCD2 genes, as well as human SCD gene, are transcriptionally regulated by dietary fat (especially PUFAs, see Table 2) and in disease (Ntambi J.M., 1999, *J. Lipid Res.*, 40: 1549-1558).

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

The mouse and rat proteins have also been characterized and the function established (Miyazaki et al., 2000, *J. Biol. Chem.*, 275: 30132-30138 and Thiede et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261: 1323-1325). SCD1 is proposed to desaturate either palmitoyl-CoA (16:0) or stearoyl-CoA (18:0), while SCD2 is proposed to exhibit selectivity for desaturases of 18:0 relative to 16:0 (Kim et al., 2000, *J. Lipid Res.*, 41: 1310-1316). The functional analysis of the human SCD protein has not been reported (Zhong et al., 1999, *Biochem. J.*, 340: 252-264).

Polyclonal antibodies against rat SCD have been produced and used in immunoblot analyses (Hassan et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 8883-8888).

In mouse, promoter elements responsible for PUFA repression of SCD1 and SCD2 have been identified (Ntambi J. M., 1999, *J. Lipid Res.*, 40: 1549-1558). A highly conserved region of the two isoform mouse promoters are 77% identical. These elements include sterol regulatory element (SRE), CCAAT-binding factor or nuclear factor (NF-Y) binding site and enhancer binding protein sequences (C/EBP) which are collectively called PUFA-responsive region (PUFA-RR). Despite the clear transcriptional regulation of human SCD in disease, the human SCD control region has not been investigated.

GenBank's HTGS division was searched using BLASTN and the available human SCD cDNA sequence (GenBank Accession Nos. Y13647 and AF097514), to identify human sequences containing the human SCD control region. The search identified a genomic sequence assigned to chromosome 10 (GenBank Accession No. AL139819) containing 6 exons which correspond to the human cDNA. The first exon contains the ATG and 5' UTR of the human SCD cDNA. The sequence upstream to the ATG from position -1 to -2006 bp was mapped out and a 1970 bp fragment of the sequence was cloned by PCR using specific primers. The nucleotide sequence is shown in Figure 26.

The nucleotide sequence of the human SCD control region was compared with the mouse SCD1 and SCD2 control regions (Figure 27). The PUFA-RR elements present in the mouse SCD1 and SCD2 promoters are conserved in the human SCD control region. It is likely that these motifs within the control region of the human SCD regulate the expression of the human SCD gene by PUFAs.

Therefore, the present inventors cloned the human control region, which mediates transcription of the SCD gene. As an embodiment of the invention, the present inventors synthesized a human SCD

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

promoter/reporter construct to be used for screening chemical libraries for test compounds which might be useful in the treatment of lipid related diseases.

5 These observations demonstrate novel methods for identifying target test compounds against a novel drug target, i.e. SCD, which includes the use of the gene as well as the promoter to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of the gene or activity of the gene product.

VI. *Apolipoprotein A-1 Gene and Polypeptide*

10 Another of the differentially expressed bands identified during the study was a rat partial cDNA for apolipoprotein A-1 (ApoA-1). The apolipoprotein A-1 cDNA has been cloned from rat (Haddad et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261:13268-13277; GenBank Accession No. J02597) and human (Breslow et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 6861-6865; GenBank Accession No. NM_000039).

15 ApoA-1 is the major protein component of high density lipoprotein (HDL) in the plasma. ApoA-1 is a cofactor for lecithin/cholesterol acyltransferase (LCAT) which is responsible for the formation of most plasma cholesteryl esters (Soutar et al., 1975, *Biochemistry*, 14: 3057-3064). Transfection studies using the mouse and human ApoA-1 promoters have been described (Srivastava et al., 2000, *Eur. J. Biochem.*, 267: 4272-4280). This protein is often measured by radioimmunoassay using
20 antibodies (Karlin et al., 1976, *J. Lipid Res.*, 17: 30-37). The use of combinatorial libraries adapted for monovalent phage display, to isolate proteins (affibodies) that bind selectively to human ApoA-1, has been described (Nord et al., 1997, *Nat. Biotechnol.*, 15: 772-777).

25 PUFAs have been reported to decrease ApoA-1 mRNA levels (Berthou et al., 1995, *Eur. J. Biochem.* 232: 179-187) consistent with the results from the present inventors' Northern blot data (see Table 2). The present inventors' data suggest that mRNA abundance is increased in STZ-induced diabetic rats.

These observations demonstrate a novel methods for identifying target test compounds against a novel
30 drug target, i.e. ApoA-1, which includes the use of the gene as well as the promoter to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of the gene or activity of the gene product.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

VII. *Delta-3, delta-2-enoyl-CoA Isomerase Gene*

Another of the differentially expressed bands identified during the study was a rat partial cDNA for the mitochondrial beta-oxidation auxiliary enzyme delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase (GenBank Accession No. X61184), involved in the metabolism of PUFAs (Palosaari P.M. and Hiltunen J.K., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265: 2446-2449 and Muller-Newton G. and Stoffel W., 1991, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 372: 613-624). This enzyme catalyses the conversion of *cis*-delta-3-enoyl-CoA to *trans*-delta-2-enoyl-CoA. The rat gene is induced by 3-fia fatty acids (Madsen et al., 1998, *J. Lipid Res.*, 39: 583-593).

The present inventors have shown that mRNA expression is induced in STZ-induced diabetic rats. Several human genetic diseases are associated with genes/enzymes of beta-oxidation, for example, carnitine transport defect, Zellweger syndrome, X-linked adrenoleukodystrophy (Wanders et al., 1992, *J. Inher. Metab. Dis.*, 15: 643-644; Roe et al., 1990, *J. Clin. Invest.*, 85: 1703-1707 and Wei et al., 2000, *Ann. Neurol.*, 47: 286-296).

The human gene encoding the delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase has been cloned (Janssen et al., 1994, *Genomics*, 23: 223-228; GenBank No. NM_001919). The control region of the human gene has been published (Janssen et al., 1994, *Genomics*, 23: 223-228). The protein has been purified and antibodies raised (Muller-Newton G. and Stoffel W., 1991, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 372: 613-624). The assay for the enzyme activity using substrates like *trans*-3-hexenoyl-CoA is known by persons skilled in the art (Gurvitz et al., 1999, *Biochem. J.*, 344: 903-914 and Palosaari P.M. and Hiltunen J.K., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265: 2446-2449).

Using the rat partial cDNA clone as the probe for Northern blotting the present inventors show that PUFAs increase delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase mRNA levels (see Tables 1 and 2).

These observations demonstrate novel methods for identifying target test compounds against a drug target, i.e. delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, which includes the use of rat and human genes as well as promoters to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of the gene or activity of the gene product.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

VIII. Fatty Acid Synthase Gene and Polypeptide

One of the differentially expressed bands was identified as fatty acid synthase (FAS). FAS cDNAs have been characterized from several species including rat (GenBank Accession Nos. X62888 and M76767) and human (GenBank Accession Nos. U26644 and U29344).

FAS catalyzes the synthesis of the long chain fatty acid palmitate from acetyl-CoA, malonyl-CoA and NADPH (Wakil S.J., 1989, *Biochemistry*, 28: 4523-4530). It exists as a homodimer with each peptide subunit about 260 kD in size. The subunit carries seven distinct component activities (beta-ketoacyl synthase; acetyl-CoA and malonyl-CoA transacylases; beta-hydroxyacyl dehydratase; enoyl reductase; beta-ketoacyl reductase; thioesterase) and a site for the prosthetic group 4'-phosphopantetheine (acyl carrier protein). Human FAS purified from recombinant *E. coli* exhibits all of these activities (Jayakumar et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 14509-14514); Jayakumar et al. (1995, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 8695-8699) purified FAS to near homogeneity from a human hepatoma cell line, HepG2.

The expression of FAS is under nutritional and hormonal regulation (Semenkovich C.F., 1997, *Prog. Lipid Res.*, 36: 43-53). Using the rat partial cDNA clone as the probe for Northern blotting the present inventors' data (Tables 1 and 2) are consistent with data reported previously showing that PUFAs decrease FAS mRNA levels (Clarke et al., 1990, *J. Nutr.*, 120: 225-231 and Armstrong et al., 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177: 1056-1061). Moreover, its expression is altered in streptozotocin-induced diabetes (Saggerson F.D. and Carpenter C.A., 1987, *Biochem. J.*, 243: 289-292), which is consistent with the present inventors' results that suggest mRNA abundance is reduced in STZ-induced diabetic rats.

The rat promoter for FAS has been well characterized in both cultured cells and transgenic mice using reporter assay systems (Semenkovich C.F., 1997, *Prog. Lipid Res.*, 36: 43-53). Two promoters have been described for the human FAS gene, one very similar to the rat gene and another, promoter II consisting of ~260 base pairs of the 3' terminus of the first intron (Hsu et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, 271: 13584-13592).

Antibodies against human FAS are available and have been used for immunohistochemistry and Western blotting (Joyeux et al., 1990, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70: 1438-1444; Jayakumar et al.,

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

1996, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 14509-14514 and Wilentz et al., 2000, *Pediatr. Dev. Pathol.*, 3: 525-531).

FAS has been proposed as a potential selective target for antineoplastic therapy (Kuhajda et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 6379-6389). A drug screening assay has been described for the FAS protein (Patent Cooperation Treaty International Patent Application No. WO 00/51430).

The present inventors teach novel methods for identifying target test compounds which includes the use of human promoters to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of the FAS gene.

IX. *Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Gene and Polypeptide*

One of the differentially expressed bands identified during the study was a rat partial cDNA for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene. G6PD cDNAs have been cloned from rat (GenBank Accession No. X07467) and human (GenBank Accession No. X03674).

G6PD catalyzes the first reaction in the pentose phosphate pathway leading to the production of pentose phosphates and reducing power in the form of NADPH for reductive biosynthesis and maintenance of the redox state of the cell.

Human G6PD has been purified from recombinant *E. coli* (Bautista et al., 1992, *Biochim. Biophys. Acta*, 1119: 512-518) and from various other sources including human erythrocytes (Adediran S.A., 1996, *Biochimie*, 78: 165-170) and rat brain (Askar et al., 1996, *Indian J. Biochem. Biophys.*, 33: 512-518).

G6PD is subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients and oxidant stress (Kletzien et al., 1994, *FASEB J.*, 8: 174-181). PUFAs have been reported to decrease G6PD mRNA levels (Tomlinson et al., 1998, *J. Nutr.*, 118: 408-415 and Yoshida et al., 1999, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 45: 411-421) consistent with the results from the present inventors' Northern blot findings (see Table 2).

Promoters for both rat and human G6PD have been cloned and characterized using reporter assay systems (Ursini et al., 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 170: 1203-1209; Kletzien et al., 1994,

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

FASEB J., 8: 174-181 and Phillippe et al., 1994, *Eur. J. Biochem.*, 226: 377-384). Antibodies against G6PD are available (Dao et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 2860-2864 and Moore et al., 1986, *Carcinogenesis*, 7: 1419-1424).

- 5 The present inventors teach novel methods for identifying target test compounds for G6PD, which includes the use of rat and human genes as well as promoters to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of the gene or activity of the gene product.

X. *Glycerol-3-phosphate Acyltransferase Gene and Polypeptide*

10

A mitochondrial and a microsomal isoform of GPAT have been described. One of the differentially expressed bands identified during the study was a rat partial cDNA for the mitochondrial isoform of the glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) gene. Only the rat and the mouse cDNAs for the mitochondrial isoenzyme have been cloned (Ganesh et al., 1999, *Biochim. Biophys. Acta*, 1439: 415-423, GenBank Accession No. AF021348 and Shin et al., 1991, *J. Biol. Chem.*, 266: 23834-23839, GenBank Accession No. NM_008149).

15

Using bioinformatic techniques, the human gene was located in GenBank's HTGS database on a fragment of genomic DNA from chromosome 10 (GenBank Accession No. AL391986).

20

Oligonucleotide primers were synthesized and the proposed human gene sequence was verified by cloning and DNA sequencing (Figure 28). Exons were mapped onto genomic DNA from AL135838 and the gene was found to comprise 20 coding exons. Nagase et al. (2000, *DNA Res.*, 7: 273-281) have cloned an incomplete cDNA containing only the carboxyl end of this human GPAT CDS (GenBank Accession No. AB046780). Although the CDS for this human gene sequence has been submitted to GenBank, there are no annotations thereon which would suggest its functional identity as the glycerol-3-phosphate acyltransferase gene. It is merely identified as a "mRNA for KIAA1560 protein".

25

A multiple sequence alignment indicating the identities and similarities among the human, rat (Genbank Accession Number AAB71605) and mouse (Genbank Accession Number NP_032175) GPAT genes is presented in Figure 29. The human and mouse genes are 93% identical or 96% similar while the human and rat genes are 92% identical or 95% similar.

30

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

To date, only the characterization of the mouse promoter has been described (Jenkins et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 1415-1421 and Ericsson et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 7298-7305).

Using bioinformatic techniques, the control region of the human GPAT gene was identified and mapped out. By searching GenBank's EST division using BLASTN with the human GPAT CDS, a human EST containing 205 bp of 5' UTR for the gene was identified (GenBank Accession No. AV695288). This experiment revealed the presence of two additional upstream exons containing exclusively 5' UTR, the first intron being over 31 kb in length. The control region between positions 32535 and -34534 from the ATG is shown in Figure 30.

GPAT catalyzes the acylation of *sn*-glycerol-3-phosphate to form 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate, thereby providing the committed step for the formation of glycerolipids (Bell R.M. and Coleman R.A., 1980, *Annu. Rev. Biochem.*, 49: 459-487). Antibodies have been generated against the mouse mitochondrial protein (Yet et al., 1993, *Biochemistry*, 32: 9486-9491).

Using the rat partial cDNA clone as the probe for Northern blot analysis, the present inventors show for the first time that PUFAs decrease GPAT mRNA levels (see Tables 1 and 2).

The present inventors have thus demonstrated a novel drug target, i.e. GPAT, including the use of rat and human genes as well as promoters to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of the gene or activity of the gene product.

XI. Spot-14 Gene and Polypeptide

One of the differentially expressed bands identified during the study was a rat partial cDNA for the Spot-14 gene. Spot-14 sequences are known in human (Grillasca et al., 1997, *FEBS Lett.*, 401: 38-42, GenBank Accession No. Y08409), rat (Liaw C.W. and Towle H.C., 1984, *J. Biol. Chem.*, 259: 7253-7260, GenBank Accession No. K01934) and mouse (Grillasca et al., 1997, *FEBS Lett.*, 401: 38-42, GenBank Accession No. X95279). Expression of the rat and mouse Spot-14 gene has been extensively studied in liver and adipose tissue. The Spot-14 protein, found in the nuclei of lipogenic tissues using Spot-14-specific antibodies, is induced synergistically by thyroid hormone (T3) and dietary carbohydrate (Kinlaw et al., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264: 19779-19783; Kinlaw et al., 1993,

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Endocrinology, 133: 645-650; Clarke et al., 1990, *J. Nutr.*, 120: 218-224; Jump et al., 1994, *J. Lipid Res.*, 35: 1076-1084 and Liu H.C. and Towle H.C., 1994, *Mol. Endocrinol.*, 8: 1021-1037).

Spot-14 has been implicated in lipogenesis, more specifically being a metabolic integrator that increases lipogenesis in normal and cancerous tissue (Cunningham et al., 1998, *Thyroid*, 8: 815-825). The THRSP gene is expressed in human liver and adipocytes, particularly in lipomatous nodules. Moreover, its expression is altered in streptozotocin-induced diabetes (Jump et al., 1990, *Mol. Endocrinol.*, 4: 1655-1660) which is consistent with the present inventors' results that suggest mRNA abundance is reduced in STZ-induced diabetic rats. The present inventors' Northern blot data (Table 2) are consistent with data reported previously showing that PUFAs decrease Spot-14 mRNA levels (Forcetz et al., 1999, *Biochem. J.*, 341: 371-376).

Grillasca et al. (1997, *FEBS Lett.*, 401: 38-42) cloned the human and mouse genes (also called THRSP) and promoters, and found that it has the same organization as the rat gene and predicts a highly conserved amino acid sequence (more than 80%). Taviaux et al. (1997, *Cytogenet. Cell Genet.*, 76: 219-220) mapped the THRSP gene to 11q13.5-q14.1 by fluorescence *in situ* hybridization.

Enhanced long-chain fatty acid synthesis may occur in breast cancer. It is necessary for tumor growth indicative of a poor prognosis. The Spot-14 protein activates genes encoding the enzymes of fatty acid synthesis. Amplification of chromosome region 11q13, where the THRSP gene resides, also predicts a poor prognosis in breast tumors. Moncur et al. (1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 6989-6994) localized the THRSP gene between markers D11S906 and D11S937, at the telomeric end of the amplified region at 11q13, and found that it was amplified and expressed in breast cancer-derived cell lines. Other findings supported a role for the protein as a determinant of tumor lipid metabolism. Expression of Spot-14 provided a pathophysiologic link between 2 prognostic indicators in breast cancer: enhanced lipogenesis and 11q13 amplification.

The present invention teaches a method for identifying test compounds for a drug target, i.e. Spot-14, which includes the use of rat and human genes as well as promoters to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of the gene or activity of the gene product.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

XII. *Catechol-O-methyltransferase Gene and Polypeptide*

One of the differentially expressed bands identified during the study was a rat partial cDNA for the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene (Salminen et al., 1990, *Gene*, 93: 241-247 and

5 Lundstrom et al., 1991, *DNA Cell Biol.*, 10: 181-189).

COMT inactivates a variety of catechol containing molecules in different organisms by methylating one of the phenolic hydroxyl groups in the substrate (Gulberg and Marsden, 1975, *Pharmacol. Rev.*, 27: 135-306). In mammals, neurotransmitters, hormones, and drugs containing the catechol moiety, such as L-DOPA used in the treatment of Parkinson's disease, are inactivated by COMT (Tenhunen J., 1996, *DNA Cell Biol.* 15: 461-473). Inhibitors of COMT are believed to be beneficial for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases (Jorga et al., 2000, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 67: 610-620 and Chong B.S. and Mersfelder T.L., 2000, *Ann. Pharmacother.*, 34: 1056-1065).

15 The human and rat COMT genes and promoters have been described (Tenhunen et al., 1994, *Eur. J. Biochem.*, 223: 1049-1059; Xie et al., 1999, *Mol. Pharmacol.*, 56: 31-38 and Tenhunen J., 1996, *DNA Cell Biol.*, 15: 461-473). COMT has been purified and antibodies against it have been described (Tilgmann C. and Ulfman L., 1996, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 684: 147-461 and Kastner et al., 1994, *Neuroscience*, 62: 449-457).

20 Enzymatic assays for COMT using adrenaline as substrate, have been published and are well known by persons skilled in the art (Vicini-Coelho M. and Soares-da-Silva P., 1999, *Brain Res.*, 821: 69-78 and Borges et al., 1998, *J. Enzyme Inhib.* 13: 473-483).

25 Using the rat partial cDNA clone as the probe for Northern blotting, the present inventors show for the first time that PUFAs decrease COMT mRNA levels (see Tables 1 and 2).

The present inventors have thus demonstrated a novel method for identifying test compounds which target COMT expression, which includes the use of rat and human genes as well as promoters to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of the gene or activity of the gene product.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

XIII *INSIG1 Gene and Polypeptide*

One of the differentially expressed bands identified during the study was a rat partial cDNA for the insulin-induced gene 1 (INSIG1). INSIG1 sequences are known in human (Peng et al., 1997, *Genomics*, 43: 278-284, GenBank Accession No. U96876) and rat where it was originally named CL-6 (Diamond et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 15185-15192, GenBank Accession No. L13619).

Rat CL-6 is the most highly insulin-induced gene in a liver cell line and expressed in proliferating liver during regeneration and development (Bortoff et al., 1997, *Endocrine*, 7: 199-207; Chin et al., 1995, *Am. J. Physiol.*, 269: E691-E700 and Haber et al., 1993, *Hepatology*, 22: 906-914).

The human gene shares 80% identity with the rat gene within the translated region. By fluorescence in situ hybridization the gene was mapped to 7q36 (Peng et al., 1997, *Genomics*, 43: 278-284). The predicted molecular weights for the human and rat proteins are 30 and 28 kDa, respectively. INSIG1 has five potential membrane spanning domains and an experimental molecular weight of approximately 43 kDa (Diamond et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 15185-15192) determined by using anti-CL-6 antisera in Western blots against the rat protein.

INSIG1 is known to be involved in liver regeneration and is highly induced by insulin. The protein has no clear homology to functional domains of other proteins. The highest expression is in liver and kidney followed by heart and muscle (Diamond et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 15185-15192). Promoter studies have been conducted with human INSIG1 using luciferase assay (Peng et al., 1997, *Genomics*, 43: 278-284).

Using the rat partial cDNA clone as the probe for Northern blotting the present inventors show for the first time that PUFAs decrease INSIG1 mRNA levels (see Tables 1 and 2).

The present inventors have thus demonstrated a novel method for identifying test compounds which target INSIG1 expression, which includes the use of rat and human genes as well as promoters to screen for novel drugs or chemical entities that modulate expression of the gene or activity of the gene product.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Subject Polynucleotides and Polypeptides

The subject polynucleotides and polypeptides may be employed as research reagents and materials for discovery of treatments of and diagnostics for disease, particularly human disease, as further
5 discussed herein.

Nucleotide Probes

The nucleic acid molecules of the invention allow those skilled in the art to construct nucleotide
10 probes for use in the detection of nucleotide sequences in biological materials. As described herein, a number of unique restriction sequences for restriction enzymes are incorporated in the nucleic acid molecule identified in the sequence listings of the subject polynucleotides, and these provide access to nucleotide sequences which code for polypeptides unique to the subject polynucleotides of the invention. Nucleotide sequences unique to the subject polynucleotides or isoforms thereof can also be
15 constructed by chemical synthesis and enzymatic ligation reactions carried out by procedures known in the art.

A nucleotide probe may be labeled with a detectable marker such as a radioactive label which provides for an adequate signal and has sufficient half-life such as ^{32}P , ^3H , ^{14}C or the like. Other
20 detectable markers which may be used include antigens that are recognized by a specific labeled antibody, fluorescent compounds, enzymes, antibodies specific for a labeled antigen, and chemiluminescent compounds. An appropriate label may be selected with regard to the rate of hybridization and binding of the probe to the nucleotide to be detected and the amount of nucleotide available for hybridization. The nucleotide probes may be used to detect genes related to or analogous
25 to the subject polynucleotides of the invention.

Accordingly, the present invention also provides a method of detecting the presence of nucleic acid molecules encoding a polypeptide related to or analogous to the subject polynucleotides in a sample comprising contacting the sample under hybridization conditions with one or more of the nucleotide
30 probes of the invention labeled with a detectable marker, and determining the degree of hybridization between the nucleic acid molecule in the sample and the nucleotide probes.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Hybridization conditions which may be used in the method of the invention are known in the art and are described for example in Sambrook et al., *supra*. The hybridization product may be assayed using techniques known in the art. The nucleotide probe may be labeled with a detectable marker as described herein and the hybridization product may be assayed by detecting the detectable marker or the detectable change produced by the detectable marker.

Primers

The identification of the nucleic acid molecule of the invention also permits the identification and isolation, or synthesis of nucleotide sequences which may be used as primers to amplify a polynucleotide molecule of the invention, for example in polymerase chain reaction (PCR). The length and bases of the primers for use in the PCR are selected so that they will hybridize to different strands of the desired sequence and at relative positions along the sequence such that an extension product synthesized from one primer when it is separated from its template can serve as a template for extension of the other primer into a nucleic acid of defined length.

Primers which may be used in the invention are oligonucleotides i.e. molecules containing two or more deoxyribonucleotides of the nucleic acid molecule of the invention which occur naturally as in a purified restriction endonuclease digest or are produced synthetically using techniques known in the art such as, for example, phosphoric ester and phosphodiester methods or automated techniques (see, Connolly B. A., 1987, *Nucl. Acid Res.*, 15: 3131-3139). The primers are capable of acting as a point of initiation of synthesis when placed under conditions which permit the synthesis of a primer extension product which is complementary to the DNA sequence of the invention e.g. in the presence of nucleotide substrates, an agent for polymerization such as DNA polymerase and at suitable temperature and pH. Preferably, the primers are sequences that do not form secondary structures by base pairing with other copies of the primer or sequences that form a hair pin configuration. The primer may be single or double-stranded. When the primer is double-stranded it may be treated to separate its strands before using it to prepare amplification products. The primer preferably contains between about 7 and 25 nucleotides.

The primers may be labeled with detectable markers which allow for detection of the amplified products. Suitable detectable markers are radioactive markers such as ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I and ^3H , luminescent markers such as chemiluminescent markers, preferably luminol and fluorescent markers, preferably

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

dansyl chloride, fluorescein-5-isothiocyanate and 4-fluor-7-nitrobenz-2-oxa-1,3 diazole and cofactors such as biotin. It will be appreciated that the primers may contain non-complementary sequences provided that a sufficient amount of the primer contains a sequence which is complementary to a nucleic acid molecule of the invention or oligonucleotide sequence thereof, which is to be amplified.

5 Restriction site linkers may also be incorporated into the primers allowing for digestion of the amplified products with the appropriate restriction enzymes facilitating cloning and sequencing of the amplified product.

Assays - Amplifying Sequences

10

Thus, a method of determining the presence of a nucleic acid molecule having a sequence encoding the subject polynucleotides or a predetermined oligonucleotide fragment thereof in a sample, is provided comprising treating the sample with primers which are capable of amplifying the nucleic acid molecule or the predetermined oligonucleotide fragment thereof in a polymerase chain reaction to form amplified sequences, under conditions which permit the formation of amplified sequences and, assaying for amplified sequences.

15

The polymerase chain reaction refers to a process for amplifying a target nucleic acid sequence as generally described in Innis M.A. and Gelfand D.H., 1989, PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis M.A., Gelfand D.H., Shinsky J.J. and White T.J. (eds), Academic Press, NY, pp. 3-12, which are incorporated herein by reference. Conditions for amplifying a nucleic acid template are described in Innis M.A. and Gelfand D.H., 1989, PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis M.A., Gelfand D.H., Shinsky J.J. and White T.J. (eds), Academic Press, NY, pp. 3-12, which is also incorporated herein by reference.

20

25

The amplified products can be isolated and distinguished based on their respective sizes using techniques known in the art. For example, after amplification, the DNA sample can be separated on an agarose gel and visualized, after staining with ethidium bromide, under ultraviolet (UV) light. DNA may be amplified to a desired level and a further extension reaction may be performed to incorporate nucleotide derivatives having detectable markers such as radioactive labeled or biotin labeled nucleoside triphosphates. The primers may also be labeled with detectable markers. The detectable markers may be analyzed by restriction and electrophoretic separation or other techniques known in the art.

30

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

The conditions which may be employed in the methods of the invention using PCR are those which permit hybridization and amplification reactions to proceed in the presence of DNA in a sample and appropriate complementary hybridization primers. Conditions suitable for the polymerase chain reaction are generally known in the art. For example, see Innis M.A. and Gelfand D.H., 1989, PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis M.A., Gelfand D.H., Shinsky J.J. and White T.J. (eds), Academic Press, NY, pp. 3-12, which is incorporated herein by reference. Preferably, the PCR utilizes polymerase obtained from thermophilic bacterium *Thermus aquaticus* (Taq polymerase, GeneAmp Kit, Perkin Elmer Cetus) or other thermostable polymerase may be used to amplify DNA template strands.

It will be appreciated that other techniques such as the Ligase Chain Reaction (LCR) and Nucleic-Acid Sequence Based Amplification (NASBA) may be used to amplify a nucleic acid molecule of the invention. In LCR, two primers which hybridize adjacent to each other on the target strand are ligated in the presence of the target strand to produce a complementary strand (Bockman, 1991 and European Published Application No. 0320308, published Jun. 14, 1989). NASBA is a continuous amplification method using two primers, one incorporating a promoter sequence recognized by an RNA polymerase and the second derived from the complementary sequence of the target sequence to the first primer (U.S. Pat. No. 5,130,238 to Malek).

Vectors

The present invention also teaches vectors which comprise a polynucleotide or polynucleotides of the present invention, host cells which are genetically engineered with vectors of the invention and the production of polynucleotides of the invention by recombinant techniques.

In accordance with this aspect of the invention the vector may be, for example, a plasmid vector, a single or double-stranded phage vector, or a single or double-stranded RNA or DNA viral vector. In certain embodiments in this regard, the vectors provide for specific expression. Such specific expression may be inducible expression or expression only in certain types of cells or both inducible and cell-specific. Particular among inducible vectors are vectors that can be induced for expression by environmental factors that are easy to manipulate, such as temperature and nutrient additives. A variety of vectors suitable to this aspect of the invention, including constitutive and inducible

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

expression vectors for use in prokaryotic and eukaryotic hosts, are well known and employed routinely by those of skill in the art. Such vectors include, among others, chromosomal, episomal and virus-derived vectors, e.g., vectors derived from bacterial plasmids, from bacteriophage, from transposons, from yeast episomes, from insertion elements, from yeast chromosomal elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, pseudorabies viruses and retroviruses, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, such as cosmids and phagemids. All of these may be used for expression in accordance with this aspect of the present invention.

10 The following vectors, which are commercially available, are provided by way of example. Among vectors for use in bacteria are pQE-9, pQE-16, pQE-30, pQE-40, pQE-50 and pQE-60 (Qiagen); pCRII, pCRII-TOPO, pTrcHis and pBAD-TOPO (Invitrogen); pGEM-3Z, pGEMEX-1, pET-5 (Promega); pBS phagemid vectors, Phagescript vectors, Bluescript vectors, pCAL, pET-3 and pSPUTK (Stratagene); pTc99A, pKK223-3, pKK232-8 and pRIT2T (Pharmacia); pMAL (New England Biolabs); and pBR322 (ATCC 37017). Among eukaryotic vectors are pGAPZ, pYES2, pYES2/CT and pcDNA3.1 (Invitrogen); pCAT3 and pGL3 (Promega); pCMV-Script, pXT1, pDual, pCMVLacI, pBSC, HybriZAP2.1, ImmunoZAP and pRS (Stratagene); and pSVK3, pSVL and pMSG (Pharmacia). These vectors are listed solely by way of illustration of the many commercially available and well known vectors that are available to those of skill in the art for use in accordance with this aspect of the present invention. It will be appreciated that any other plasmid or vector suitable for, for example, introduction, maintenance, propagation or expression of a polynucleotide or polypeptide of the invention in a host may be used in this aspect of the invention. Generally, any vector suitable to maintain, propagate or express polynucleotides to express a polypeptide or polynucleotide in a host may be used for expression in this regard.

25 The DNA sequence in the expression vector is operatively linked to appropriate expression control sequence(s), including, for instance, a promoter to direct mRNA transcription. Promoter regions can be selected from any desired gene using vectors that contain a reporter transcription unit lacking a promoter region, such as a chloramphenicol acetyl transferase (CAT) transcription unit, downstream of restriction site or sites for introducing a candidate promoter fragment; i.e., a fragment that may contain a promoter. As is well known, introduction into the vector of a promoter-containing fragment at the restriction site upstream of the CAT gene engenders production of CAT activity, which can be detected by standard CAT assays. Vectors suitable to this end are well known and readily available.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

such as pKK232-8 and pCAT3. Promoters for expression of polynucleotides of the present invention include not only well known and readily available promoters, but also promoters that readily may be obtained by the foregoing technique, using a reporter gene. Among known prokaryotic promoters suitable for expression of polynucleotides and polypeptides in accordance with the present invention are the *E. coli lacI* and *lacZ* promoters, the T3 and T7 promoters, the *gpt* promoter, the lambda PR and PL promoters, and the *trp* promoter. Among known eukaryotic promoters suitable in this regard are the CMV immediate early promoter, the HSV thymidine kinase promoter, the early and late SV40 promoters, the promoters of retroviral LTRs, such as those of the Rous sarcoma virus (RSV), and metallothionein promoters, such as the mouse metallothionein-I promoter.

Vectors for propagation and expression generally will include selectable markers and amplification regions, such as, for example, those set forth in Sambrook et al., *supra*.

Host Cells

As hereinbefore mentioned, the present invention also teaches host cells which are genetically engineered with vectors of the invention.

Polynucleotide constructs in host cells can be used in a conventional manner to produce the gene product encoded by the recombinant sequence. The subject polynucleotides or polypeptides products or isoforms or parts thereof, may be obtained by expression in a suitable host cell using techniques known in the art. Suitable host cells include prokaryotic or eukaryotic organisms or cell lines, for example bacterial, mammalian, yeast, or other fungi, viral, plant or insect cells. Methods for transforming or transfecting cells to express foreign DNA are well known in the art (See for example, Itakura et al., U.S. Pat. No. 4,704,362; Hinnen et al., 1978; Murray et al., U.S. Pat. No. 4,801,542; McKnight et al., U.S. Pat. No. 4,935,349; Hagen et al., U.S. Pat. No. 4,784,950; Axel et al., U.S. Pat. No. 4,399,216; Goeddel et al., U.S. Pat. No. 4,766,075 and Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, 2nd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY all of which are incorporated herein by reference). Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such as *Streptococci*, *Staphylococci*, *E. coli*, *Streptomyces* and *Bacillus subtilis*; fungal cells, such as yeast cells and *Aspergillus* cells; insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9 cells; animal cells such as CHO, COS-1, ZR-75-1, Chang, HeLa, C127, 3T3, HepG2, BHK, 293 and Bowes melanoma cells; and plant cells.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Host cells can be genetically engineered to incorporate polynucleotides and express polynucleotides of the present invention. Introduction of polynucleotides into the host cell can be effected by calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, transfection, microinjection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic introduction, infection or other methods. Such methods are described in many standard laboratory manuals, such as Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, NY and Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, 2nd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.

Production of the Subject Polypeptides

As hereinbefore mentioned, the present invention also teaches the production of polynucleotides of the invention by recombinant techniques.

The subject polynucleotides encode polypeptides which are the mature protein plus additional amino- or carboxyl-terminal amino acids, or amino acids interior to the mature polypeptide (when the mature form has more than one polypeptide chain, for instance). Such sequences may play a role in processing of a protein from precursor to a mature form, may allow protein transport, may lengthen or shorten protein half-life or may facilitate manipulation of a protein for assay or production, among other things. Generally, as is the case *in vivo*, the additional amino acids may be processed away from the mature protein by cellular enzymes.

A precursor protein, having the mature form of the polypeptide fused to one or more prosequences may be an inactive form of the polypeptide. When prosequences are removed such inactive precursors generally are activated. Some or all of the prosequences may be removed before activation. Generally, such precursors are called proproteins.

Thus, a polynucleotide of the present invention may encode a mature protein, a mature protein plus a leader sequence (which may be referred to as a preprotein), a precursor of a mature protein having one or more prosequences which are not the leader sequences of a preprotein, or a preproprotein, which is a precursor to a proprotein, having a leader sequence and one or more prosequences, which generally are removed during processing steps that produce active and mature forms of the polypeptide.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

The polypeptides of the invention may be prepared by culturing the host/vector systems described above, in order to express the recombinant polypeptides. Recombinantly produced subject protein or parts thereof, may be further purified using techniques known in the art such as commercially available protein concentration systems, by salting out the protein followed by dialysis, by affinity chromatography, or using anion or cation exchange resins.

Mature proteins can be expressed in mammalian cells, yeast, bacteria, or other cells under the control of appropriate promoters. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using DNA derived from the DNA constructs of the present invention. Appropriate cloning and expression vectors for use with prokaryotic and eukaryotic hosts are described by Sambrook et al., *supra*.

Polynucleotides of the invention, encoding the heterologous structural sequence of a polynucleotide or polypeptide of the invention generally will be inserted into a vector using standard techniques so that it is operably linked to the promoter for expression. The polynucleotide will be positioned so that the transcription start site is located appropriately 5' to a ribosome binding site. The ribosome binding site will be 5' to the AUG that initiates translation of the polynucleotide or polypeptide to be expressed. Generally, there will be no other open reading frames that begin with an initiation codon, usually AUG, and lie between the ribosome binding site and the initiation codon. Also, generally, there will be a translation stop codon at the end of the expressed polynucleotide and there will be a polyadenylation signal in constructs for use in eukaryotic hosts. Transcription termination signal appropriately disposed at the 3' end of the transcribed region may also be included in the polynucleotide construct.

For secretion of the translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum, into the periplasmic space or into the extracellular environment, appropriate secretion signals may be incorporated into the expressed polynucleotide or polypeptide. These signals may be endogenous to the polynucleotide or they may be heterologous signals. Microbial cells employed in expression of proteins can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents, or other such methods known to those skilled in the art. A subject polynucleotide or polypeptide can be recovered and purified from recombinant cell cultures by known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography is employed for purification. Well known techniques for refolding protein may be employed to regenerate active conformation when the polynucleotide is denatured during isolation and or purification.

5

A nucleic acid molecule of the invention may be cloned into a glutathione S-transferase (GST) gene fusion system for example the pGEX-1T, pGEX-2T and pGEX-3X of Pharmacia. The fused gene may contain a strong *lac* promoter, inducible to a high level of expression by IPTG, as a regulatory element. Thrombin or factor Xa cleavage sites may be present which allow proteolytic cleavage of the desired polypeptide from the fusion product. The glutathione S-transferase-subject polypeptide fusion protein may be easily purified using a glutathione sepharose 4B column, for example from Pharmacia. The 26 kDa glutathione S-transferase polypeptide can be cleaved by thrombin (pGEX-1T or pGEX-2T) or factor Xa (pGEX-3X) and resolved from the polypeptide using the same affinity column. Additional chromatographic steps can be included if necessary, for example Sephadex or DEAE cellulose. The two enzymes may be monitored by protein and enzymatic assays and purity may be confirmed using SDS-PAGE.

The subject protein or parts thereof may also be prepared by chemical synthesis using techniques well known in the chemistry of proteins such as solid phase synthesis (Merrifield, 1964, *J. Am. Chem. Assoc.*, 85: 2149-2154) or synthesis in homogenous solution (Houbenweyl et al., 1987, *Methods of Organic Chemistry*, Wansch E. (ed), Vol. 15 I and II, Thieme, Germany).

Within the context of the present invention, the subject polypeptide includes various structural forms of the primary protein which retain biological activity. For example, the subject polypeptide may be in the form of acidic or basic salts or in neutral form. In addition, individual amino acid residues may be modified by oxidation or reduction. Furthermore, various substitutions, deletions or additions may be made to the amino acid or nucleic acid sequences, the net effect being that biological activity of the subject polypeptide is retained. Due to code degeneracy, for example, there may be considerable variation in nucleotide sequences encoding the same amino acid.

30

The polypeptide may be expressed in a modified form, such as a fusion protein, and may include not only secretion signals but also additional heterologous functional regions. Thus, for instance, a region of additional amino acids, particularly charged amino acids, may be added to the carboxyl- or amino-

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

terminus of the polypeptide to improve stability and persistence in the host cell during purification or during subsequent handling and storage. Also, fusion proteins may be added to the polynucleotide or polypeptide to facilitate purification. Such regions may be removed prior to final preparation of the polynucleotide or polypeptide. The addition of peptide moieties to polynucleotides or polypeptides to engender secretion or excretion, to improve stability or to facilitate purification, among others, are familiar and routine techniques in the art. In drug discovery, for example, proteins have been fused with antibody Fc portions for the purpose of high-throughput screening assays to identify antagonists (see Bennett et al., 1995, *J. Mol. Recognit.*, 8: 52-58, and Johanson et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 9459-9471).

Antibodies

With respect to protein-based testing, antibodies can be generated to the fat regulated gene product using standard immunological techniques, fusion proteins or synthetic peptides as described herein.

Monoclonal antibodies can also be produced using now conventional techniques such as those described in Waldmann T.A., 1991, *Science*, 252: 1657-1662 and Harlow E. and Lane D. (eds.), 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Harbour Press, Cold Harbour, NY. It will also be appreciated that antibody fragments, i.e. Fab' fragments, can be similarly employed. Immunoassays, for example ELISAs, in which the test sample is contacted with antibody and binding to the gene product detected, can provide a quick and efficient method of determining the presence and quantity of the fatty acid regulated gene product. For example, the antibodies can be used to test the effect of pharmaceuticals in subjects enrolled in clinical trials.

Thus, the present invention also provides polyclonal and/or monoclonal antibodies and fragments thereof, and immunologic binding equivalents thereof, which are capable of specifically binding to the subject polypeptides and fragments thereof or to polynucleotide sequences from the subject polynucleotide region, particularly from the subject polypeptide locus or a portion thereof. The term "antibody" is used both to refer to a homogeneous molecular entity, or a mixture such as a serum product made up of a plurality of different molecular entities. Polypeptides may be prepared synthetically in a peptide synthesizer and coupled to a carrier molecule (e.g., keyhole limpet hemocyanin) and injected over several months into rabbits. Rabbit sera is tested for immunoreactivity to the subject polypeptide or fragment. Monoclonal antibodies may be made by injecting mice with the protein polypeptides, fusion proteins or fragments thereof. Monoclonal antibodies are screened by

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

ELISA and tested for specific immunoreactivity with subject polypeptide or fragments thereof (Harlow E. and Lane D. (eds.), 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Harbour Press, Cold Harbour, NY). These antibodies are useful in assays as well as pharmaceuticals.

- 5 Once a sufficient quantity of desired polypeptide has been obtained, it may be used for various purposes. A typical use is the production of antibodies specific for binding. These antibodies may be either polyclonal or monoclonal, and may be produced by *in vitro* or *in vivo* techniques well known in the art. For production of polyclonal antibodies, an appropriate target immune system, typically mouse or rabbit, is selected. Substantially purified antigen is presented to the immune system in a
- 10 fashion determined by methods appropriate for the animal and by other parameters well known to immunologists. Typical routes for injection are in footpads, intramuscularly, intraperitoneally, or intradermally. Of course, other species may be substituted for mouse or rabbit. Polyclonal antibodies are then purified using techniques known in the art, adjusted for the desired specificity.
- 15 An immunological response is usually assayed with an immunoassay. Normally, such immunoassays involve some purification of a source of antigen, for example, that produced by the same cells and in the same fashion as the antigen. A variety of immunoassay methods are well known in the art, such as in Harlow E. and Lane D. (eds.), 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Harbour Press, Cold Harbour, NY, or Goding J.W., 1996, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production*
- 20 *and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology*, 3rd edition, Academic Press, NY.

- Monoclonal antibodies with affinities of 10^8 M⁻¹ or preferably 10^9 to 10^{10} M⁻¹ or stronger will typically be made by standard procedures as described in Harlow E. and Lane D. (eds.), 1988,
- 25 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Harbour Press, Cold Harbour, NY or Goding J.W., 1996, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology*, 3rd edition, Academic Press, NY. Briefly, appropriate animals will be selected and the desired immunization protocol followed. After the appropriate period of time, the spleens of such animals are excised and individual spleen cells fused,
- 30 typically, to immortalized myeloma cells under appropriate selection conditions. Thereafter, the cells are clonally separated and the supernatants of each clone tested for their production of an appropriate antibody specific for the desired region of the antigen.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Other suitable techniques involve *in vitro* exposure of lymphocytes to the antigenic polypeptides, or alternatively, to selection of libraries of antibodies in phage or similar vectors (Huse et al., 1989, *Science*, 246: 1275-1281). The polypeptides and antibodies of the present invention may be used with or without modification. Frequently, polypeptides and antibodies will be labeled by joining, either

5 covalently or non-covalently, a substance which provides for a detectable signal. A wide variety of labels and conjugation techniques are known and are reported extensively in both the scientific and patent literature. Suitable labels include radionuclides, enzymes, substrates, cofactors, inhibitors, fluorescent agents, chemiluminescent agents, magnetic particles and the like. Patents teaching the use of such labels include U.S. Pat. Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437;

10 4,275,149 and 4,366,241. Also, recombinant immunoglobulins may be produced (see U.S. Pat. No. 4,816,567).

Generation of Polyclonal Antibody Against the Subject Polynucleotide

15 Segments of the subject polynucleotide coding sequence are expressed as fusion protein in *E. coli*. The overexpressed protein is purified by gel elution and used to immunize rabbits and mice using a procedure similar to the one described by Harlow E. and Lane D. (eds.), 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Harbour Press, Cold Harbour, NY. This procedure has been shown to generate antibodies against various other proteins (for example, see Kraemer et al., 1993, *J. Lipid*

20 *Res.*, 34: 663-671).

Briefly, a stretch of coding sequence selected from the subject polynucleotide is cloned as a fusion protein in plasmid pET5A (Novagen, WI) or pMAL system (New England Biolabs). After induction with IPTG, the overexpression of a fusion protein with the expected molecular weight is verified by

25 SDS-PAGE. Fusion protein is purified from the gel by electroelution. The identification of the protein as the subject polypeptide fusion product can be verified by protein sequencing at the N-terminus. Next, the purified protein is used as immunogen in rabbits. Rabbits are immunized with 100 µg of the protein in complete Freund's adjuvant and boosted twice in 3 week intervals, first with 100 µg of immunogen in incomplete Freund's adjuvant followed by 100 µg of immunogen in PBS. Antibody

30 containing serum is collected two weeks thereafter.

This procedure is repeated to generate antibodies against the mutant forms of the subject polypeptide. These antibodies, in conjunction with antibodies to wild type subject polypeptide, are used to detect

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

the presence and the relative level of the mutant forms in various tissues and biological fluids.

Generation of Monoclonal Antibodies Specific for the Subject Polypeptide

- 5 Monoclonal antibodies are generated according to the following protocol. Mice are immunized with immunogen comprising intact subject polypeptide or its peptides (wild type or mutant) conjugated to keyhole limpet hemocyanin using glutaraldehyde or EDC as is well known.
- 10 The immunogen is mixed with an adjuvant. Each mouse receives four injections of 10 to 100 µg of immunogen and after the fourth injection blood samples are taken from the mice to determine if the serum contains antibody to the immunogen. Serum titer is determined by ELISA or RIA. Mice with sera indicating the presence of antibody to the immunogen are selected for hybridoma production.
- 15 Spleens are removed from immune mice and a single cell suspension is prepared as described by Harlow E. and Lane D. (eds.), 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Harbour Press, Cold Harbour, NY. Cell fusions are performed essentially as described by Kohler G. and Milstein C., 1975, *Nature*, 256: 495-497. Briefly, P3.65.3 myeloma cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) are fused with immune spleen cells using polyethylene glycol as described by Harlow E. and
- 20 Lane D. (eds.), 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Harbour Press, Cold Harbour, NY. Cells are plated at a density of 2×10^5 cells/well in 96 well tissue culture plates. Individual wells are examined for growth and the supernatants of wells with growth are tested for the presence of subject polypeptide specific antibodies by ELISA or RIA using wild type or mutant target protein. Cells in positive wells are expanded and subcloned to establish and confirm monoclonality.
- 25 Clones with the desired specificities are expanded and grown as ascites in mice or in a hollow fiber system to produce sufficient quantities of antibody for characterization and assay development.

Sandwich Assay for the Subject Polypeptide

- 30 Monoclonal antibody is attached to a solid surface such as a plate, tube, bead, or particle. Preferably, the antibody is attached to the well surface of a 96-well ELISA plate. A 100 µl sample (e.g., serum, urine, tissue cytosol) containing the subject polypeptide/protein (wild-type or mutant) is added to the

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

solid phase antibody. The sample is incubated for 2 hrs at room temperature. Next the sample fluid is decanted, and the solid phase is washed with buffer to remove unbound material. One hundred µl of a second monoclonal antibody (to a different determinant on the subject polypeptide/protein) is added to the solid phase. This antibody is labeled with a detector molecule or atom (e.g., ¹²⁵I, enzyme, fluorophore, or a chromophore) and the solid phase with the second antibody is incubated for two hrs at room temperature. The second antibody is decanted and the solid phase is washed with buffer to remove unbound material.

10 The amount of bound label, which is proportional to the amount of subject polypeptide/ protein present in the sample, is quantitated. Separate assays are performed using monoclonal antibodies which are specific for the wild-type subject polypeptide as well as monoclonal antibodies specific for each of the mutations identified in subject polypeptide.

15 *Detecting Presence of or Predisposition for Disorders Affected by Lipid Metabolism and Monitoring Treatment of Same*

As previously discussed, lipid metabolism is frequently dysregulated in disease. It is likely that genetic polymorphisms in fat regulated genes will contribute to disease susceptibility.

20 The subject polynucleotides taught herein are useful to detect genetic polymorphisms of the subject polynucleotides, or to detecting changes in the level of expression of the subject polynucleotides, as a diagnostic tool. Detection of an aberrant form of the subject polynucleotide, or a decrease or increase in the level of expression of the subject polynucleotide in a eukaryote, particularly a mammal, and especially a human, will provide a method for diagnosis of a disease. Eukaryotes (herein also "individual(s)"), particularly mammals, and especially humans, exhibiting genetic polymorphisms of the subject polynucleotides, or changes in expression of the subject polynucleotides may be detected by a variety of techniques.

30 Since fat regulated genes are widely expressed, test samples of the subject can be obtained from a variety of tissues including blood. A fat regulated gene test can also be included in panels of prenatal tests since fat regulated genes, DNA, RNA or protein can also be assessed in amniotic fluid. Quantitative testing for fat regulated gene transcript and gene product is thus also contemplated within

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

the scope of the present invention.

Nucleic acid and protein-based methods for screening genetic polymorphisms in fat regulated genes are all within the scope of the present teachings. For example, knowing the sequence of the fat regulated gene, DNA or RNA probes can be constructed and used to detect mutations in fat regulated genes through hybridization with genomic DNA in a tissue such as blood using conventional techniques. RNA or cDNA probes can be similarly probed to screen for mutations in fat regulated genes or for quantitative changes in expression. A mixture of different probes, i.e. "probe cocktail", can also be employed to test for more than one mutation.

With respect to nucleic acid-based testing, genomic DNA may be used directly for detection of a specific sequence or may be amplified enzymatically *in vitro* by using PCR prior to analysis (Saiki et al., 1985, *Science*, 230: 1350-1353 and Saiki et al., 1986, *Nature*, 324: 163-166). Reviews of this subject have been presented by Caskey C.T., 1989, *Science*, 236: 1223-1228 and by Landegren et al., 1989, *Science*, 242: 229-237. The detection of specific DNA sequence may be achieved by methods such as hybridization using specific oligonucleotides (Wallace et al., 1986, *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, 51: 257-261), direct DNA sequencing (Church et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 1991-1995, the use of restriction enzymes (Flavell et al., 1978, *Cell*, 15: 25-41; Geever et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 5081-5085), discrimination on the basis of electrophoretic mobility in gels with denaturing reagent (Myers et al., 1986, *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, 51: 275-284), RNase protection (Myers et al., 1985, *Science*, 230: 1242-1246), chemical cleavage (Colton et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 4397-4401), and the ligase-mediated detection procedure (Landegren et al., 1988, *Science*, 241: 1077-1080). Using PCR, characterization of the level of or condition of the subject polymucleotides present in the individual may be made by comparative analysis.

With respect to protein-based testing, antibodies can be generated to the fat regulated gene product using standard immunological techniques, fusion proteins or synthetic peptides as described herein.

With the characterization of the fat regulated gene product and its function, functional assays can also be used for fatty acid regulated gene diagnosis and screening and to monitor treatment. For example, enzymatic testing to determine levels of gene function, rather than direct screening of the fat regulated

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

gene or product, can be employed. Testing of this nature has been utilized in other diseases and conditions, such as in Tay-Sachs.

The invention thus provides a process for detecting disease by using methods known in the art and methods described herein to detect changes in expression of or mutations to the subject polynucleotides. For example, decreased expression of a subject polynucleotide can be measured using any one of the methods well known in the art for the quantification of polynucleotides, such as, for example, PCR, RT-PCR, DNase protection, Northern blotting and other hybridization methods. Thus, the present invention provides a method for detecting disorders affected by lipid metabolism, and a method for detecting a genetic pre-disposition for such diseases including eczema, cardiovascular disorders (including but not limited to hypertriglyceridemia, dyslipidemia, atherosclerosis, coronary artery disease, cerebrovascular disease and peripheral vascular disease), inflammation (including but not limited to sinusitis, asthma, pancreatitis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acne), body weight disorders (including but not limited to obesity, cachexia and anorexia), psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.

Drug Screening Assays

The present teachings provide methods for screening compounds to identify those which enhance (agonist) or block (antagonist) the action of subject polypeptides or polynucleotides, such as its interaction with fatty acid binding molecules. The identification of the subject polynucleotides in inherited fatty acid disorders, combined with advances in the field of transgenic methods, provides the information necessary to further study human diseases. This is extraordinarily useful in modeling familial forms of fatty acid disorders and other diseases of fatty acid metabolism including eczema, cardiovascular disorders (including but not limited to hypertriglyceridemia, dyslipidemia, atherosclerosis, coronary artery disease, cerebrovascular disease and peripheral vascular disease), inflammation (including but not limited to sinusitis, asthma, pancreatitis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acne), body weight disorders (including but not limited to obesity, cachexia and anorexia), psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications. Drug screening assays are made effective by use of the control regions of the genes described in the present invention or part of it, in a yeast based DNA-protein interaction assay (yeast one-hybrid). The use of the genes described here, or parts thereof, or the transcribed RNA in a yeast

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

protein-protein interaction (2-hybrid) or protein-RNA interaction assays for drug screening also provide effective drug screening methods. Such interacting molecules can also be reconstructed *in vitro* for drug screening purposes.

- 5 For example, to screen for agonists or antagonists, a synthetic reaction mix, a cellular compartment, such as a membrane, cell envelope or cell wall, or a preparation of any thereof, may be prepared from a cell that expresses a molecule that binds a subject polynucleotide. The preparation is incubated with labeled polynucleotide in the absence or the presence of a candidate molecule which may be an agonist or antagonist. The ability of the candidate molecule to bind the binding molecule is reflected in decreased binding of the labeled ligand.

- 10 Fatty acid-like effects of potential agonists and antagonists may be measured, for instance, by determining activity of a reporter system following interaction of the candidate molecule with a cell or appropriate cell preparation, and comparing the effect to a baseline (control) measurement. Reporter systems that may be useful in this regard include, but are not limited to, colorimetric labeled substrate converted into product, a reporter gene that is responsive to changes in fatty acid enzyme activity, and binding assays known in the art.

- 20 Another example of an assay for antagonists is a competitive assay that combines a subject polypeptide and a potential antagonist with membrane-bound subject polypeptide-binding molecules, recombinant subject polypeptide binding molecules, natural substrates or ligands, or substrate or ligand mimetics, under appropriate conditions for a competitive inhibition assay. A subject polypeptide can be labeled, such as by radioactivity or a colorimetric compound, such that the number of subject polypeptide molecules bound to a binding molecule or converted to product can be determined accurately to assess the effectiveness of the potential antagonist.

- 30 Potential antagonists include small organic molecules, peptides, polypeptides and antibodies that bind to a polynucleotide or polypeptide of the invention and thereby inhibit or extinguish its activity. Potential antagonists also may be small organic molecules, peptides, polypeptides, such as closely related proteins or antibodies that bind the same sites on a binding molecule, without inducing subject polypeptide-induced activities, thereby preventing the action of the subject polypeptide by excluding the subject polypeptide from binding. Potential antagonists include antisense molecules (Okano et al.,

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

1988, *EMBO J.*, 7: 3407-3412). Potential antagonists include compounds related to and derivatives of the subject polypeptides.

Potential antagonists include small organic molecules, peptides, polypeptides and antibodies that bind to a polynucleotide or polypeptide of the invention and thereby inhibit or extinguish its activity. Potential agonists may be selected from the group consisting of small organic molecules, peptides, polypeptides, antisense molecules, oligonucleotides, polynucleotides, fatty acids, and chemical and functional derivatives thereof.

Developing modulators of the biological activities of specific fat regulated proteins requires differentiating fat regulated isozymes present in a particular assay preparation. The classical enzymological approach of isolating fat regulated proteins from natural tissue sources and studying each new isozyme may be used. Another approach has been to identify assay conditions which might favor the contribution of one isozyme and minimize the contribution of others in a preparation. Still another approach is the separation of fat regulated proteins by immunological means. Each of the foregoing approaches for differentiating fat regulated isozymes is time consuming. As a result many attempts to develop selective fat regulated protein modulators have been performed with preparations containing more than one isozyme. Moreover, fat regulated protein preparations from natural tissue sources are susceptible to limited proteolysis and may contain mixtures of active proteolytic products that have different kinetic, regulatory and physiological properties than the full length fat regulated proteins.

Recombinant subject polypeptide products of the invention greatly facilitate the development of new and specific modulators. The need for purification of an isozyme can be avoided by expressing it recombinantly in a host cell that lacks endogenous fat regulated protein activity. Once a compound that modulates the activity of the fat regulated protein is discovered, its selectivity can be evaluated by comparing its activity on the particular subject enzyme to its activity on other fat regulated isozymes. Thus, the combination of the recombinant subject polypeptide products of the invention with other recombinant fat regulated protein products in a series of independent assays provides a system for developing selective modulators of particular fat regulated proteins. Selective modulators may include, for example, antibodies and other proteins or peptides which specifically bind to the subject polypeptide or polynucleotide, oligonucleotides which specifically bind to the subject polypeptide (see Patent Cooperation Treaty International Publication No. WO 93/05182 which describes methods

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

for selecting oligonucleotides which selectively bind to target biomolecules) or the subject polynucleotide (e.g., antisense oligonucleotides) and other non-peptide natural or synthetic compounds which specifically bind to the subject polynucleotide or polypeptide. Mutant forms of the subject polynucleotide which alter the enzymatic activity of the subject polypeptide or its localization in a cell are also contemplated. Crystallization of recombinant subject polypeptides alone and bound to a modulator, analysis of atomic structure by X-ray crystallography, and computer modeling of those structures are methods useful for designing and optimizing non-peptide selective modulators. See, for example, Erickson et al., 1992, *Ann. Rev. Mol. Chem.*, 27: 271-289 for a general review of structure-based drug design.

Targets for the development of selective modulators include, for example: (1) the regions of the subject fat regulated proteins which contact other proteins and/or localize the proteins within a cell, (2) the regions of the proteins which bind substrate, and (3) the phosphorylation site(s) of the subject polypeptides.

Thus, the present invention provides methods for screening and selecting compounds which promote disorders affected by lipids. As well, the present invention provides methods for screening and selecting compounds which treat or inhibit progression of diseases associated with lipid metabolism, such as eczema, cardiovascular disorders (including but not limited to hypertriglyceridemia, dyslipidemia, atherosclerosis, coronary artery disease, cerebrovascular disease and peripheral vascular disease), inflammation (including but not limited to sinusitis, asthma, pancreatitis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acne), body weight disorders (including but not limited to obesity, cachexia and anorexia), psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications, and other diseases not necessarily related to lipid metabolism.

Protein Interaction Assays for DNA control regions, CDS and RNA of Fat Regulated Genes.

Protein interaction is implicated in virtually every biological process in the cell, for example, metabolism, transport, signaling and disease. Development of the yeast 2-hybrid and 1-hybrid systems have made it possible to study and identify protein-protein interaction, protein-DNA interaction or protein-RNA interaction *in vivo* (Fields S. and Song O., 1989, *Nature*, 340: 245-246; Ulmasov et al., 1997, *Science*, 276: 1865-1868; Furuyama K. and Sassa S., 2000, *J. Clin. Invest.*, 105: 757-764 and Gyuris et al., 1993, *Cell*, 75: 791-803). Because these interactions are key to cellular functions,

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

identification of interacting partners is the first step towards elucidation of function and involvement in pathogenesis. New chemical entities that modulate (inhibit or activate) such interactions may have strong pharmaceutical and therapeutic benefit in human, animal as well as plant diseases. It is now known that in sideroblastic anemic patients, the interaction between succinyl-CoA synthetase and the heme biosynthetic enzyme δ -aminolevulinic synthase-E (ALAS-E) is disrupted (Furuyama K. and Sassa S., 2000, *J. Clin. Invest.*, 105: 757-764). Inhibition of gene expression in human cells through small molecule-RNA interaction have been recently described (Hwang et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 12997-13002). The use of protein-RNA inhibition technology is a potential approach for development of anti-HIV therapeutics (Hany et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 3548-3553 and Mei et al., 1998, *Biochemistry*, 37: 14204-14212).

Drug Design

Antagonists and agonists and other compounds of the present invention may be employed alone or in conjunction with other compounds, such as therapeutic compounds. The pharmaceutical compositions may be administered in any effective, convenient manner including, for instance, administration by direct microinjection into the affected area, or by intravenous or other routes. These compositions of the present invention may be employed in combination with a non-sterile or sterile carrier or carriers for use with cells, tissues or organisms, such as a pharmaceutical carrier suitable for administration to a subject. Such compositions comprise, for instance, a medium additive or a therapeutically effective amount of antagonists or agonists of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Such carriers may include, but are not limited to, saline, buffered saline, dextrose, water, glycerol, ethanol and combinations thereof. The formulation is prepared to suit the mode of administration.

Modulation of fat regulated gene function can be accomplished by the use of therapeutic agents or drugs which can be designed to interact with different aspects of fat regulated metabolic gene protein structure or function. For example, a drug or antibody can bind to a structural fold of the protein to correct a defective structure. Alternatively, a drug might bind to a specific functional residue and increase its affinity for a substrate or cofactor. Efficacy of a drug or agent can be identified by a screening program in which modulation is monitored *in vitro* in cell systems in which a defective fat regulated gene protein is expressed.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Alternatively, drugs can be designed to modulate the activity of proteins of fat regulated genes from knowledge of the structure and function correlations for such proteins and from knowledge of the specific defect in various mutant proteins (Copsey et al., 1988, *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs*, Stockton Press, NY).

5

Gene Therapy

A variety of gene therapy approaches may be used in accordance with the invention to modulate expression of the subject polynucleotides *in vivo*. For example, antisense DNA molecules may be engineered and used to block translation of mRNA of the subject polynucleotides *in vivo*. Alternatively, ribozyme molecules may be designed to cleave and destroy the mRNA of the subject polynucleotides *in vivo*. In another alternative, oligonucleotides designed to hybridize to the 5' region of the subject polynucleotide (including the region upstream of the coding sequence) and form triple helix structures may be used to block or reduce transcription of the subject polynucleotide. In yet another alternative, nucleic acid encoding the full length wild-type subject polynucleotide may be introduced *in vivo* into cells which otherwise would be unable to produce the wild-type subject polynucleotide product in sufficient quantities or at all.

For example, in conventional replacement therapy, gene product or its functional equivalent is provided to the patient in therapeutically effective amounts. Fat regulated gene protein can be purified using conventional techniques such as those described in Deutcher M. (ed.), 1990, *Guide to Protein Purification. Meth. Enzymol.*, Vol. 182. Sufficient amounts of gene product or protein for treatment can be obtained, for example, through cultured cell systems or synthetic manufacture. Drug therapies which stimulate or replace the gene product can also be employed. Delivery vehicles and schemes can be specifically tailored to the particular target gene.

Gene therapy using recombinant technology to deliver the gene into the patient's cells, or vectors which will supply the patient with gene product *in vivo*, is also within the scope of the invention. Retroviruses have been considered preferred vectors for experiments in somatic gene therapy, with a high efficiency of infection and stable integration and expression (Orkin et al., 1988, *Prog. Med. Genet.*, 7: 130-142). For example, fat regulated gene cDNAs can be cloned into a retroviral vector and driven from either its endogenous promoter or from the retroviral LTR (long terminal repeat). Other delivery systems which can be utilized include adeno-associated virus (McLaughlin et al., 1988, *J.*

30

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Viral., 62: 1963-1973), vaccinia virus (Moss et al., 1987, *Annu. Rev. Immunol.*, 5: 305-324), bovine papilloma virus (Rasmussen et al., 1987, *Meth. Enzymol.*, 139: 642-654), or a member of the herpes virus group such as Epstein-Barr virus (Margolske et al., 1988, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2837-2847).

5 Antisense, ribozyme and triple helix nucleotides are designed to inhibit the translation or transcription of the subject polynucleotides. To accomplish this, the oligonucleotides used should be designed on the basis of relevant sequences unique to the subject polynucleotides. For example, and not by way of limitation, the oligonucleotides should not fall within those regions where the nucleotide sequence of a subject polynucleotide is most homologous to that of other polynucleotides, herein referred to as
10 "unique regions".

In the case of antisense molecules, it is preferred that the sequence be chosen from the unique regions. It is also preferred that the sequence be at least 18 nucleotides in length in order to achieve sufficiently strong annealing to the target mRNA sequence to prevent translation of the sequence (Izant J.G. and
15 Weintraub H., 1984, *Cell*, 36: 1007-1015 and Rosenberg et al., 1985, *Nature*, 313: 703-706).

In the case of the "hammerhead" type of ribozymes, it is also preferred that the target sequences of the ribozymes be chosen from the unique regions. Ribozymes are RNA molecules which possess highly specific endoribonuclease activity. Hammerhead ribozymes comprise a hybridizing region which is
20 complementary in nucleotide sequence to at least part of the target RNA, and a catalytic region which is adapted to cleave the target RNA. The hybridizing region contains 9 or more nucleotides. Therefore, the hammerhead ribozymes have a hybridizing region which is complementary to the sequences listed above and is at least nine nucleotides in length. The construction and production of such ribozymes are well known in the art and are described more fully in Haseloff J. and Gerlach
25 W.J., 1988, *Nature*, 334: 585-591.

The ribozymes also include RNA endoribonucleases (hereinafter "Cech-type ribozymes") such as the one which occurs naturally in *Tetrahymena thermophila* (known as the IVS, or L-19 IVS RNA) and which has been extensively described by Thomas Cech and collaborators (Zaug et al., 1984, *Science*,
30 224: 574-578; Zaug A.J. and Cech T.R., 1986, *Science*, 231: 470-475; Zaug et al., 1986, *Nature*, 324: 429-433; Patent Publication Treaty International Patent Application No. WO 88/04300 and Been M.D. and Cech T.R., 1986, *Cell*, 47: 207-216). The Cech endoribonucleases have an eight base pair active site which hybridizes to a target RNA sequence whereafter cleavage of the target RNA takes

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

place. Cech-type ribozymes target eight base-pair active site sequences are present in a subject polynucleotide but not other polynucleotides for fat regulated proteins.

The compounds can be administered by a variety of methods which are known in the art, including, but not limited to the use of liposomes as a delivery vehicle. Naked DNA or RNA molecules may also be used where they are in a form which is resistant to degradation, such as by modification of the ends, by the formation of circular molecules, or by the use of alternate bonds including phosphothionate and thiophosphoryl modified bonds. In addition, the delivery of nucleic acid may be by facilitated transport where the nucleic acid molecules are conjugated to polylysine or transferrin. Nucleic acid may also be transported into cells by any of the various viral carriers, including but not limited to, retrovirus, vaccinia, adeno-associated virus, and adenovirus.

Alternatively, a recombinant nucleic acid molecule which encodes, or is, such antisense, ribozyme, triple helix, or subject polynucleotide molecule can be constructed. This nucleic acid molecule may be either RNA or DNA. If the nucleic acid encodes an RNA, it is preferred that the sequence be operatively attached to a regulatory element so that sufficient copies of the desired RNA product are produced. The regulatory element may permit either constitutive or regulated transcription of the sequence. A transfer vector such as a bacterial plasmid or viral RNA or DNA, encoding one or more of the RNAs, may be transfected into cells or cells of an organism (Llewellyn et al., 1987, *J. Mol. Biol.*, 195: 115-123 and Hanahan et al., 1983, *J. Mol. Biol.*, 166: 557-580). Once inside the cell, the transfer vector may replicate, and be transcribed by cellular polymerases to produce the RNA or it may be integrated into the genome of the host cell. Alternatively, a transfer vector containing sequences encoding one or more of the RNAs may be transfected into cells or introduced into cells by way of micromanipulation techniques such as microinjection, such that the transfer vector or a part thereof becomes integrated into the genome of the host cell.

Composition, Formulation, and Administration of Pharmaceutical Compositions

The pharmaceutical compositions of the present invention may be manufactured in a manner that is itself known, e.g., by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping or lyophilizing processes.

Pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention thus may be formulated

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

in conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Proper formulation is dependent upon the route of administration chosen.

- 5 For injection, the agents of the invention may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks' solution, Ringer's solution, or physiological saline buffer. For transmucoosal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.
- 10 For oral administration, the compounds can be formulated readily by combining the active compounds with pharmaceutically acceptable carriers well known in the art. Such carriers enable the compounds of the invention to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions and the like, for oral ingestion by a patient to be treated. Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained by solid excipient, optionally grinding a resulting mixture,
- 15 and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are, in particular, fillers such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol, or cellulose preparations such as, maize starch, wheat starch, rice starch, potato starch, gelatin, gum tragacanth, methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, sodium carboxymethylcellulose, and/or polyvinylpyrrolidone. If desired, disintegrating agents may be added,
- 20 such as the cross-linked polyvinylpyrrolidone, agar, or alginic acid or a salt thereof such as sodium alginate.

- Dragee cores are provided with suitable coatings. For this purpose, concentrated sugar solutions may be used, which may optionally contain gum arabic, talc, polyvinyl pyrrolidone, carbopol gel,
- 25 polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments may be added to the tablets or dragee coatings for identification or to characterize different combinations of active compound doses.

- Pharmaceutical preparations which can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as
- 30 well as soft, sealed capsules made of gelatin and a plasticizer, such as glycerol or sorbitol. The push-fit capsules can contain the active ingredients in admixture with filler such as lactose, binders such as starches, and/or lubricants such as talc or magnesium stearate and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds may be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils,

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

liquid paraffin, or liquid polyethylene glycols. In addition, stabilizers may be added. All formulations for oral administration should be in dosages suitable for such administration.

5 For buccal administration, the compositions may take the form of tablets or lozenges formulated in conventional manner.

10 For administration by inhalation, the compounds for use according to the present invention are conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges (e.g., gelatin) for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

15 The compounds may be formulated for parenteral administration by injection, e.g., by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multidose containers, with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents.

20 Pharmaceutical formulations for parenteral administration include aqueous solutions of the active compounds in water-soluble form. Additionally, suspensions of the active compounds may be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Aqueous injection suspensions may contain substances which increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Optionally, the suspension may also contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions.

30 Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use.

The compounds may also be formulated in rectal compositions such as suppositories or retention

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

enemas, e.g., containing conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides.

In addition to the formulations described previously, the compounds may also be formulated as a depot preparation. Such long acting formulations may be administered by implantation (for example subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. Thus, for example, the compounds may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt.

10 A pharmaceutical carrier for the hydrophobic compounds of the invention is a co-solvent system comprising benzyl alcohol, a nonpolar surfactant, a water-miscible organic polymer, and an aqueous phase. Naturally, the proportions of a co-solvent system may be varied considerably without destroying its solubility and toxicity characteristics. Furthermore, the identity of the co-solvent components may be varied.

15 Alternatively, other delivery systems for hydrophobic pharmaceutical compounds may be employed. Liposomes and emulsions are well known examples of delivery vehicles or carriers for hydrophobic drugs. Certain organic solvents such as dimethylsulfoxide also may be employed, although usually at the cost of greater toxicity. Additionally, the compounds may be delivered using a sustained-release system, such as semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing therapeutic agent. Various sustained-release materials have been established and are well known by those skilled in the art. Sustained-release capsules may, depending on their chemical nature, release the compounds for a few weeks up to over 100 days. Depending on the chemical nature and the biological stability of therapeutic reagent, additional strategies for protein stabilization may be employed.

25 The pharmaceutical compositions also may comprise suitable solid or gel phase carriers or excipients. Examples of such carriers or excipients include, but are not limited to, calcium carbonate, calcium phosphate, various sugars, starches, cellulose derivatives, gelatin, and polymers such as polyethylene glycols.

30 Many of the compounds of the invention may be provided as salts with pharmaceutically compatible counterions. Pharmaceutically compatible salts may be formed with many acids, including but, not limited to, hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

soluble in aqueous or other protonic solvents than are the corresponding free base forms.

Suitable routes of administration may, for example, include oral, rectal, transmucosal, transdermal, or intestinal administration; or parenteral delivery, including intramuscular, subcutaneous,

5 intramedullary injections, as well as intrathecal, direct intraventricular, intravenous, intraperitoneal, intranasal, or intracocular injections.

Alternately, one may administer the compound in a local rather than systemic manner, for example, via injection of the compound directly into an affected area, often in a depot or sustained release
10 formulation.

Furthermore, one may administer the drug in a targeted drug delivery system, for example, in a liposome coated with an antibody specific for affected cells. The liposomes will be targeted to and taken up selectively by the cells.

15

The pharmaceutical compositions generally are administered in an amount effective for treatment or prophylaxis of a specific indication or indications. It is appreciated that optimum dosage will be determined by standard methods for each treatment modality and indication, taking into account the indication, its severity, route of administration, complicating conditions and the like. In therapy or as a prophylactic, the active agent may be administered to an individual as an injectable composition, for
20 example, as a sterile aqueous dispersion, preferably isotonic. A therapeutically effective dose further refers to that amount of the compound sufficient to result in amelioration of symptoms associated with such disorders. Techniques for formulation and administration of the compounds of the instant application may be found in "*Remington's Pharmaceutical Sciences*," Mack Publishing Co., Easton, Pa., latest edition. For administration to mammals, and particularly humans, it is expected that the
25 daily dosage level of the active agent will be from 0.001 mg/kg to 10 mg/kg, typically around 0.01 mg/kg. The physician in any event will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual and will vary with the age, weight and response of the particular individual. The above dosages are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher
30 or lower dosage ranges are merited, and such are within the scope of this invention.

The compounds of the invention may be particularly useful in animal disorders (veterinarian indications), and particularly mammals.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

The invention further provides diagnostic and pharmaceutical packs and kits comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the aforementioned compositions of the invention. Associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, reflecting approval by the agency of the manufacture, use or sale of the product for human administration.

EXAMPLES

10 The present invention is further described by the following examples. These examples, while illustrating certain specific aspects of the invention, do not portray the limitations or circumscribe the scope of the disclosed invention.

Example 1 - Differential Gene Expression in Liver of Rats Fed Diets Supplemented with PUFAs

15 A. Animal Experimentation

Four week old female Wistar rats (52-72 g) were purchased from Charles River Canada Ltd. and housed 3 or 4 per cage for a period of 4 weeks. The rats were randomly divided into 6 groups and fed fat free diet (Teklad # 94013). After 2 weeks, groups 2-6 were fed diets supplemented with highly purified polyunsaturated fatty acids for an additional 2 weeks. The concentration of the specific fatty acid used for each group was 5% (w/w) of the total diet preparation. The experimental design is provided below.

- 25 Group 1 -- Fat Free Controls
Group 2 -- Linoleic Acid (LA) -- provided as safflower oil
Group 3 -- Alpha-Linolenic Acid (ALA) -- provided as flax oil
Group 4 -- Gamma-Linolenic Acid (GLA) -- provided as 1,3-GLA propane diol
Group 5 -- Eicosapentaenoic Acid (EPA) -- provided as 1,3-EPA propane diol
30 Group 6 -- Docosahexaenoic Acid (DHA) -- provided as 1,3-DHA propane diol

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Diets were prepared by mixing the oils into the fat free diet. The mixed diet was stored at -20°C under a nitrogen atmosphere to prevent fatty acid oxidation. Dietary feedings were provided at the same time each day. Diet preparations are shown below.

- 5 Group 2 (LA) – 62.5 g safflower oil + 937.5 g fat free diet
 Group 3 (ALA) – 87.7 g flax oil + 912.3 g fat free diet
 Group 4 (GLA) – 55.8 g GLA diol + 944.3 g fat free diet
 Group 5 (EPA) – 57.9 g EPA diol + 942.1 g fat free diet
 Group 6 (DHA) – 59.7 g DHA diol + 940.3 g fat free diet

10

Rats (166-229 g) were sacrificed via cardiac puncture under anesthesia. The livers were perfused with saline, excised and frozen in liquid nitrogen in preparation for RNA extraction.

B. RNA Isolation from Rat Liver and DNase Treatment

15

Total RNA from 0.4 g of each liver was isolated as per manufacturer's protocol using Trizol Reagent (Gibco BRL). In order to remove contaminating genomic DNA, the RNA sample was incubated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) for 30 minutes at 37°C. The RNA was subsequently precipitated and resuspended to a final concentration of 0.5 mg/ml.

20

C. Reverse-Transcription of RNA to Single-Stranded cDNA

Reverse transcription of RNA to single-stranded cDNA was carried out in order to obtain template cDNA for differential display reactions. Two µg of total RNA was reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL) using oligo(dT) primer in a total volume of 10 µl, following manufacturer's protocol.

25

D. Differential Display PCR

30

Rat liver cDNA was amplified using 90 combinations of 10 arbitrary P primers and 9 anchored T primers as well as 55 combinations of P primers only (Clontech, Delta Differential Display Kit). Control, GLA and DHA samples from three individual rats per treatment group were prepared for a

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

total of nine samples for each primer pair. The differential display procedure was carried out following the manufacturer's protocol (Clontech) using Advantage 2 DNA polymerase (Clontech) and cDNA obtained from 55 ng of total RNA. Typically, reactions for five primer pairs were carried out at the same time using master-mixes whenever possible. These samples were then run on a 4.5 per cent

5 polyacrylamide gel containing 7 M urea. The experiment was repeated to verify the results. Only bands which were differentially expressed in both experiments were further characterized.

The following primers (given in 5' to 3' direction) were used:

P primers

- 10 P1, ATTAACCCCTCACTAAATGCTGGGGA;
 P2, ATTAACCCCTCACTAAATCGGTCATAG;
 P3, ATTAACCCCTCACTAAATGCTGGTGG;
 P4, ATTAACCCCTCACTAAATGCTGGTAG;
 P5, ATTAACCCCTCACTAAAGATCTGACTG;
 15 P6, ATTAACCCCTCACTAAATGCTGGGTG;
 P7, ATTAACCCCTCACTAAATGCTGTATG;
 P8, ATTAACCCCTCACTAAATGGAGCTGG;
 P9, ATTAACCCCTCACTAAATGTGGCAGG;
 P10, ATTAACCCCTCACTAAAGCACCGTCC.

20 T primers

- T1, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAA;
 T2, CATTATGCTGACTGATATCTTTTTTTTAC;
 T3, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAG;
 T4, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCA;
 25 T5, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCC;
 T6, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCG;

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

T7, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTITTTTGA;

T8, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTITTTITGC;

T9, CATTATGCTGAGTGATATCTTTTITTTTGG.

5 E. Cloning of Differentially Displayed Bands

Each differentially expressed cDNA fragment was excised from the gel and subsequently amplified using the same P- and T- or P- and P-primer combination which was initially used for the differential display procedure. The purified PCR fragments (Qiagen) were ligated (Boehringer Mannheim, Rapid DNA Ligation) into linearized pCRII vector (Invitrogen). Plasmid DNA from ten individual colonies was isolated (Qiagen) and their inserts sequenced on both strands using vector-specific fluorescence-labeled primer (Li-Cor), following manufacturer's specifications. Sequence analysis was performed using Vector NTI Suite (InforMax Inc.).

15 F. Northern Blot Analysis

To confirm the expression pattern of the genes as discovered in the differential display experiment and to determine the transcript size of these genes, Northern blot analysis was performed. Eight µg of total RNA from three different rats of each of the treatment groups 1, 2, 4, 5 and 6 (see above) was loaded onto a formaldehyde agarose gel, electrophoretically separated and transferred via capillary action to a nylon membrane (BioRad) according to Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, 2nd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. The transfer of the RNA onto the membrane was verified by methylene blue staining. The DNA probes for the Northern blots were obtained by amplifying the insert DNA from the plasmid harboring partial DNA sequences from differentially expressed genes using the two primers

5'-ACTAGCTAACGGCCGCCAGTGTGCTGG-3' and

5'-TGAGCTGGATATCTGCAGAATTCGGC-3' which bind on both sides next to the insertion site of pCRII. Insert DNA was labeled using [alpha-³²P]dCTP and Ready-To-Go DNA Labeling Beads (Amersham Pharmacia Biotech) following manufacturer's specifications. The Northern blot was performed following the protocol in Ansel et al., 1994-, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY. The membrane was hybridized overnight at 42°C and washed to a final

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

stringency of 0.25X SSC, 0.1% SDS at 55°C. All membranes were probed with a nucleotide probe against the 18S rRNA subunit for normalization of loading.

G. Genes Identified by Differential Display

This experiment led to the identification of 14 genes with altered expression after PUFA treatment. The following 17 plasmids containing cDNA fragments which were obtained from this experiment represent the 14 unique genes.

Table 1

Plasmid	Gene	Accession Number ¹	DNA fragment ²			Location*
			start	end	Total	
pCr2001.1	METP				889	CDS + 3'
pCr2002.1	AIBG				440	CDS + 3'
pCr2003.1	ApoA-1	J02597	1040	1551	558	CDS (444/1485) + 3'
pCr2004.1	COMT	Z12651	131	431	336	CDS (301/795)
pCr2005.1	INSIG1	L13619	820	2363	1587	3'
pCr2006.1	Delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase	X61184	-2	608	637	5' + CDS (608/867)
pCr2007.1	FAS	X62888	3215	3513	339	CDS (361/7518)
pCr2008.1	G6PD	X07467	156	1151	1030	CDS (996/1548)
pCr2009.1	G6PD	X07467	1124	2255	1165	CDS (425/1548) + 3'
pCr2010.1	GPAT	M77003	4972	5747	797	3'
pCr2011.1	Spot-14	K01934	250	1241	1038	CDS (203/453)
pCr2012.1	GLOL	D83198	35	827	838	CDS (648/694) + 3'
pCr2013.1	FTF1	AB017614	755	1706	981	CDS (770/1524) + 3'
pCr2014.1	SCD1	J02585	2175	2677	538	3'
pCr2015.1	SCD1	J02585	3960	4362	439	3'
pCr2016.1	SCD2	AB032243	-235	995	1276	5' + CDS (995/1077)
pCr2017.1	SCD2	AB032243	3915	4719	836	3'

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

¶ M77003 and AB017614 refer to mouse and D83198 refers to human nucleotide sequences. All other accession numbers refer to rat genes.

‡ *start* and *end* mean the beginning and the end of the gene-specific insert counting from the translation start-codon (A of AUG designated as 1), *total* is the number of all nucleotides of the insert including the two non-gene specific primers.

* e.g. ApoA-1 *CDS* (444/1485) + 3' plasmid contains 444 nucleotides of the total CDS (1485 nucleotides) and 114 nucleotides of the 3' UTR.

Table 2

The table lists the values of the quantification of the Northern blots in percent $\pm$ standard deviation of three individual rats per treatment group. All membranes were probed with a nucleotide probe against the 18S rRNA subunit and all values are normalized for 18S except for G6PD, AIBG and FTF1. However, the loading differences between the different lanes on the gels are usually less than 15%.

(N.D. indicates "not detected").

	fat free	LA	GLA	EPA	DHA
SCD1	100 $\pm$ 17	63 $\pm$ 20	6 $\pm$ 8	N.D.	[$\pm$]
SCD2	100 $\pm$ 23	63 $\pm$ 15	11 $\pm$ 6	2 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1
G6PD	100 $\pm$ 11	42 $\pm$ 27	8 $\pm$ 9	15 $\pm$ 14	19 $\pm$ 7
GPAT	100 $\pm$ 35	52 $\pm$ 5	15 $\pm$ 13	14 $\pm$ 10	26 $\pm$ 15
FAS	100 $\pm$ 33	47 $\pm$ 40	17 $\pm$ 12	17 $\pm$ 14	27 $\pm$ 21
delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase	14 $\pm$ 18	29 $\pm$ 27	33 $\pm$ 15	100 $\pm$ 35	87 $\pm$ 2
COMT	100 $\pm$ 32	59 $\pm$ 6	45 $\pm$ 23	50 $\pm$ 4	49 $\pm$ 3
ApoA-1	100 $\pm$ 24	90 $\pm$ 23	32 $\pm$ 8	25 $\pm$ 4	12 $\pm$ 1
Spot-14	100 $\pm$ 16	50 $\pm$ 6	12 $\pm$ 7	19 $\pm$ 25	24 $\pm$ 18
INSIG1	100 $\pm$ 44	49 $\pm$ 12	11 $\pm$ 2	25 $\pm$ 3	13 $\pm$ 11
FTF1	100 $\pm$ 16	56 $\pm$ 15	4 $\pm$ 8	10 $\pm$ 7	13 $\pm$ 12
GLOL	100 $\pm$ 17	64 $\pm$ 6	37 $\pm$ 11	29 $\pm$ 15	36 $\pm$ 17
METP	10 $\pm$ 5	37 $\pm$ 7	78 $\pm$ 12	100 $\pm$ 16	80 $\pm$ 28
AIBG	7 $\pm$ 9	52 $\pm$ 47	14 $\pm$ 10	32 $\pm$ 30	100 $\pm$ 64

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Example 2 - Cloning of rMETP and hMETP into Mammalian Expression Vector**A. Obtaining 5' End of rMETP**

- 5 Clones containing the complete coding sequence for rMETP were obtained from the Superscript rat liver cDNA library (Gibco BRL) using the Gencrappier cDNA Positive Selection System (Gibco BRL) as per the manufacturer's instructions. The sequence of the oligonucleotide used to probe the library and repair the captured cDNA target was 5'-GTGGTCTTCGTGCCTTATGAG-3'. The repaired DNA was used to transform UltraMax DH5 α -ET cells (Gibco BRL). Colonies containing
- 10 rMETP were identified by colony-PCR using 5'-GCTACGCCCATGGACGTTATCAAGTCC-3' and 5'-CAGGCAGTATGGCACTTTGA-3' as gene specific primers. PCR reactions contained 0.5 μ M of each primer, 200 μ M of each dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 2 mM MgCl₂, 1X PCR Buffer (Gibco BRL) and 0.025 U/ μ l of Platinum Taq polymerase (Gibco BRL). The PCR conditions were: 95°C for 2 min; 35 cycles of 95°C for 30 sec, 58°C for 45 sec and 72°C for 45 sec; 72°C for 7 min. Plasmid
- 15 DNA was isolated from selected colonies and sequenced. The sequence obtained was used to identify the open reading frame for rMETP and design primers for subcloning the gene. A plasmid containing the complete coding sequence was designated pSr1066.1.

B. Cloning of METP

- 20 Rat and human METP were cloned by PCR into the pcDNA3.1/Myc-His(+) mammalian expression vector (Invitrogen). For each gene two plasmid constructions were made for the production of the METP protein with a C-terminal tag containing the c-myc epitope and polyhistidine peptide (i.e., rMETP/Myc-His and hMETP/Myc-His), or the METP protein without the tag (i.e., rMETP and
- 25 hMETP). The forward primers for cloning the rat and human genes were 5'-CACGCGGGATCCGCCACCATGGATTTTGTGCTGGGGCCATTGG-3' and 5'-CACGCGGGTACCCACGCGTGCCACCATGGATTTTGTGCTGGAGCCAATCG-3', respectively. These primers contain the Kozak consensus sequence adjacent to the translation start codon. The primer for the rat gene contains a *Bam*HI site (underlined) whereas the primer for the human gene
- 30 contains a *Kpn*I site (underlined). The sequences of the reverse primers for cloning rMETP and hMETP were 5'-ATATCAAGATGCGGCGCCTATGTGAGCAGGCCCTGAGTGAGCC-3' and

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

5'-ATATCAGGATGCGGCCGCCTATGTGAGCAGACCCCGGGCGAGC-3', respectively. These primers contain a *NotI* site (underlined) and provide the translation stop codon. The reverse primers for cloning rMETP/Myc-His and hMETP/Myc-His were

5'-ATATCAGGATGCGGCCGCCTATGTGAGCAGGCCCTGAGTGAGCC-3' and

- 5 5'-ATATCAGGATGCGGCCGCCTATGTGAGCAGACCCCGGGCGAGC-3', respectively. These primers contain a *NotI* site (underlined) with only 2 of the 3 bases of the stop codon, therefore, placing the gene in frame with the tag provided by the vector.

- 10 PCR was carried out using Advantage-IIIF polymerase (Clontech) as per the manufacturer's instructions. pSr1066.1 was used as the DNA template for generating rMETP/Myc-His. pMr1076.1 (described below) was used as the DNA template for rMETP. Plasmid DNA from the Proquest human liver cDNA library (Gibco BRL) was used as the template for the human gene.

- 15 The PCR products were gel purified, digested with *NotI* and either *BamHI* (rat gene) or *KpnI* (human gene), and ligated into pcDNA3.1/Myc-His(+)A cut with the corresponding enzymes. The ligation products were used to transform *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen). Plasmids were isolated and sequenced. Plasmids for rMETP/Myc-His and rMETP were designated pMr1076.1 and pMr1076.2, respectively. For both hMETP/Myc-His and hMETP two different sequences were obtained. About half of the isolates had a G at position 404 of the coding sequence (Arg¹³⁴) and half had a T at this position (Leu¹³⁵) indicating a possible site for genetic polymorphism (which may be useful in
- 20 screening for genetic characteristics). Plasmids for hMETP/Myc-His and hMETP containing a G at position 404 were designated pMh1081.1 and pMh1084.1, respectively. Plasmids for hMETP/Myc-His and hMETP containing a T at position 404 were designated pMh1083.1 and pMh1085.1, respectively.

25

Example 3 - Cloning of rGLOL and hGLOL into Mammalian Expression Vector

A. Obtaining 5' End of rGLOL

- 30 The 5' end of rGLOL cDNA was cloned by PCR. The sequence of the forward primer (5'-COGGTCCTCCTGCGGCAGATG-3') was based on a mouse EST (GenBank Accession No. AW106717) which codes for the 5' end of the mouse ortholog of rGLOL. The primer corresponds to 5' UTR and the translation start codon (underlined). The reverse primer (5'-

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

TGGAAGTCTGTTCGTCCACA-3') was based on the rGLOL clone obtained by differential display. PCR was carried out with Platinum Taq polymerase (Gibco BRL) as previously described (Example 2). Plasmid DNA isolated from the Superscript rat liver cDNA library (Gibco BRL) was used as the template. The PCR product was gel purified and inserted by TA cloning into the pCRII vector (Invitrogen). The ligation products were used to transform *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen). Plasmid DNA was isolated and sequenced. The sequence obtained was used to design a forward primer for cloning the gene. A plasmid containing the 5' end of rGLOL was designated pCr1067.1.

B. Cloning of GLOL

10

Rat and human GLOL were cloned by PCR into the pcDNA3.1/Myc-His(+) mammalian expression vector (Invitrogen). For each gene two plasmid constructions were made for the production of the GLOL protein with a C-terminal tag containing the c-myc epitope and polyhistidine peptide (i.e., rGLOL/Myc-His and hGLOL/Myc-His), or the GLOL protein without the tag (i.e., rGLOL and

15

hGLOL). The forward primers for cloning the rat and human genes were 5'-CACGCGGGATCCGCCACCATGTTTGAGCCCAAGACCTGCACC-3' and 5'-CACGCGGGATCCGCCACCATGTCGAGCCTGTGAGCTGCACC-3', respectively. These primers contain the Kozak consensus sequence adjacent to the translation start codon and a *Bam*HI site (underlined). The sequences of the reverse primers for cloning rGLOL and hGLOL were 5'-

20

ATATCACGATGCGGCCGCTCAGGAGGGTGGAGTCTGGACCC-3' and 5'-ATATCACGATGCGGCCGCTCAGGCAGTGGGTGTCTGCACC-3', respectively. These primers contain a *Not*I site (underlined) and provide the translation stop codon. The reverse primers for cloning rGLOL/Myc-His and hGLOL/Myc-His were

25

5'-ATATCACGATGCGGCCGCTCAGGAGGGTGGAGTCTGGACCC-3' and 5'-ATATCACGATGCGGCCGCTCAGGCAGTGGGTGTCTGCACC-3', respectively. These primers contain a *Not*I site (underlined) with only 2 of the 3 bases required for the stop codon, therefore, placing the gene in frame with the tag provided by the vector.

30

PCR was carried out using Advantage-HF polymerase (Clontech) as per the manufacturer's instructions. Plasmid DNA from the Superscript rat liver cDNA library (Gibco BRL) was used as the DNA template for generating rGLOL/Myc-His. pMr1075.1 (described below) was used as the DNA template for rGLOL. Plasmid DNA from the Proquest human liver cDNA library (Gibco BRL) was

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

used as the template for generating hGLOL/Myc-His. pMr1072.1 (described below) was used as the DNA template for hGLOL.

The PCR products were gel purified, digested with *Bam*HI and *Not*I, and ligated into pcDNA3.1/Myc-His(+)*A* cut with the same enzymes. The ligation products were used to transform *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen). Plasmids were isolated and sequenced. Plasmids for rGLOL/Myc-His and rGLOL were designated pMr1075.1 and pMr1075.2, respectively. Plasmids for hGLOL/Myc-His and hGLOL were designated pMh1072.1 and pMh1072.2, respectively. The sequence obtained for the human gene, which was confirmed by cloning and sequencing products from independent PCR reactions, contained 1 base different than the sequence reported in GenBank Accession No. D83198 with an A instead of a G at position 46 of the coding sequence. This results in Arg¹⁶ instead of Gly¹⁶.

Example 4 - Cloning of rFTF1 and hFTF1 into Mammalian Expression Vector

A. Obtaining 5' End of rFTF1

The 5' end of rFTF1 cDNA was obtained using the SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) as per the manufacturer's instructions. The 5'-RACE-ready cDNA was prepared using Superscript II reverse transcriptase (Gibco BRL) and 1 µg of total adipose RNA isolated from a female Wistar rat using Trizol Reagent (Gibco BRL). The 5'-RACE PCR reaction was set-up as recommended except it contained 1X Advantage-GC cDNA polymerase (Clontech), the corresponding buffer and 0.5 M GC-melt (Clontech). The sequence of the gene specific primer was 5'-CTGGAGCAGGGTCCTGTTGGCAGTCTCT-3'. The PCR conditions were: 94°C for 3 min; 5 cycles of 94°C for 30 sec, 69°C for 10 sec and 72°C for 3 min; 5 cycles of 94°C for 30 sec, 67°C for 10 sec and 72°C for 3 min; 35 cycles of 94°C for 30 sec, 65°C for 10 sec and 72°C for 3 min. The product was gel purified and inserted by TA cloning into the pCRII vector (Invitrogen). The ligation products were used to transform *E. coli* Top10 (Invitrogen). Plasmid DNA was isolated and sequenced. The sequence obtained was used to identify the open reading frame for rFTF1 and design a forward primer for cloning the gene into a mammalian expression vector. A plasmid containing the 5'-RACE product for rFTF1 was designated pCr1092.1.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

B. Cloning of FTF1

Rat and human FTF1 were cloned by PCR into the pcDNA3.1/Myc-His(+) mammalian expression vector (Invitrogen). For each gene two plasmid constructions were made for the production of the FTF1 protein with a C-terminal tag containing the c-myc epitope and polyhistidine peptide (i.e., rFTF1/Myc-His and hFTF1/Myc-His), or the FTF1 protein without the tag (i.e., rFTF1 and hFTF1). The forward primers for cloning the rat and human genes were 5'-
 CACGGGGTACCAACGCGTGCCACCATGGACGCGTCTTGGAACCTTTCC-3' and 5'-
 CACGGGGTACCAACGCGTGCCACCATGGACGCGTCTTGGAACCTTTCC-3', respectively.
 These primers contain the Kozak consensus sequence adjacent to the translation start codon and a *KpnI* site (underlined). The sequence of the reverse primer for cloning rFTF1 and hFTF1 was 5'-
 CACGGCGCTCGAGCTAGGAGAGTTTATGGTGGTGTGGG-3'. This primer contains a *XhoI* site (underlined) and provides the translation stop codon. The reverse primer for cloning rFTF1/Myc-His and hFTF1/Myc-His was
 5'-CACGGCGCTCGAGGAGAGTTTATGGTGGTGTGGG-3'. This primer contains a *XhoI* site (underlined) but not the stop codon, therefore, placing the gene in frame with the tag provided by the vector.

PCR was carried out using Advantage-GC cDNA polymerase and 1 M GC-melt (Clontech) as per the manufacturer's instructions. Plasmid DNA from the Superscript rat liver cDNA library (Gibco BRL) was used as a template for the rat gene. Plasmid DNA from the Proquest human liver cDNA library (Gibco BRL) was used as the template for the human gene.

The PCR products were gel purified, digested with *KpnI* and *XhoI*, and ligated into pcDNA3.1/Myc-His(+)A cut with the same enzymes. The ligation products were used to transform *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen). Plasmids were isolated and sequenced. The use of the non-high fidelity Advantage-GC cDNA polymerase resulted in several nucleotide substitutions. DNA fragments from several isolated clones were ligated resulting in a polynucleotide sequence coding for the correct polypeptide sequence. Plasmids for rFTF1/Myc-His and rFTF1 were designated pMr1088.1 and pMr1089.1, respectively. Plasmids for hFTF1/Myc-His and hFTF1 were designated pMh1090.1 and pMh1091.1, respectively.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Example 5 - Cloning of rA1BG and hA1BG into Mammalian Expression VectorA. Obtaining 5' End of rA1BG

- 5 The 5' end of the rA1BG gene was obtained by using the SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) as per the manufacturer's instructions. The 5'-RACE-ready cDNA was prepared using Superscript II reverse transcriptase (Gibco BRL) and 1 µg of total hepatic RNA isolated from a rat fed the DHA-supplemented diet used in the differential display study. The 5'-RACE PCR reaction was carried out as recommended by the manufacturer except it contained 1X Advantage-HF polymerase
- 10 mix (Clontech) and the corresponding buffer. The sequence of the gene specific primer was 5'-CAACCCCTTTCCAAGGGCACTTTCCTGTG-3'. The product was gel purified and ligated by TA cloning into the pCRII vector (Invitrogen). The ligation products were used to transform *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen). Plasmid DNA was isolated and sequenced. The sequence obtained was used to identify the open reading frame for rA1BG and design primers for cloning the gene into a mammalian
- 15 expression vector. A plasmid containing the 5'-RACE product for rA1BG was designated pCr1078.1.

B. Cloning of A1BG

- Rat and human A1BG were cloned by PCR into the pcDNA3.1/Myo-His(+) mammalian expression
- 20 vector (Invitrogen). For each gene two plasmid constructions were made for the production of the A1BG protein with a C-terminal tag containing the c-myc epitope and polyhistidine peptide (ie. rA1BG/Myo-His and hA1BG/Myo-His), or the A1BG protein without the tag (ie. rA1BG and hA1BG). The forward primers for cloning the rat and human genes were 5'-CACGCGGGATCCGCCAOCATGTCTCTGTGACTACTG-3' and
- 25 5'-CACGCGGGATCCGCCACCATGTCCATGCTCGTGGTCTTTCCTC-3', respectively. These primers contain the Kozak consensus sequence adjacent to the translation start codon and a *Bam*HI site (underlined). The sequences of the reverse primers for cloning rA1BG and hA1BG were 5'-ATATCACGATGCGGCGGCTTAGCTACCTTCTACTACAACTTCCACAGGG-3' and 5'-ATATCACGATGCGGCGGCTCAGCTTCTGCCCACAGGAGC-3', respectively. These reverse
- 30 primers contain a *Not*I site (underlined) and provide the translation stop codon. The reverse primers for cloning rA1BG/Myo-His and hA1BG/Myo-His were 5'-ATATCACGATGCGGCGGCTTGTCTACCTTCTACTACAACTTCCACAGGG-3' and

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

5'-ATATCACGATGCGGCCGCCAGCTTCTGCCACCAGGAGC-3', respectively. These primers contain a *NotI* site (underlined) with only 2 of the 3 bases required for the stop codon, therefore, placing the gene in frame with the tag provided by the vector.

- 5 PCR was carried out using Advantage-HF polymerase (Clontech) as per the manufacturer's instructions. The 5'-RACE-ready cDNA used to obtain the 5' end of rA1BG was used as the DNA template for the rat gene. Plasmid DNA from the Proquest human liver cDNA library (Gibco BRL) was used as the template for the human gene.
- 10 The PCR products were gel purified, digested with *Bam*HI and *Not*I, and ligated into pcDNA3.1/Myc-His(+)-A cut with the same enzymes. The ligation products were used to transform *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen). Plasmids were isolated and sequenced. Plasmids for rA1BG/Myc-His and rA1BG were designated pMr1082.1 and pMr1077.1, respectively. Plasmids for hA1BG/Myc-His and hA1BG were designated pMh1087.1 and pMh1086.1, respectively.

15

Example 6 - Cloning of hGPAT into Mammalian Expression Vector

- Human GPAT is cloned by PCR into the pcDNA3.1/Myc-His(+)- mammalian expression vector
- 20 (Invitrogen). The forward primer, 5'-CACGCGGATCGGCCACCATGGATGAATCTGCACTGACCCTTGG-3', contains the Kozak consensus sequence adjacent to the translation start codon and a *Bam*HI site (underlined). The reverse primer, 5'-ATATCACGATGCGGCCGCCCTACAGCACCAAACTCAGAATATATTCTAG-3', contains a *Not*I site (underlined) and provides the translation stop codon.

25

PCR is carried out using Advantage-HF 2 polymerase (Clontech) as per the manufacturer's instructions and plasmid DNA from the Proquest human liver cDNA library (Gibco BRL).

- 30 The PCR products are gel purified, digested with *Bam*HI and *Not*I, and ligated into pcDNA3.1/Myc-His(+)-A cut with the same enzymes. The ligation products are used to transform *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen). Plasmids are isolated and sequenced.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Example 7 - Cloning of the Human SCD Control Region

The human SCD promoter was cloned from human leukocyte genomic DNA. Blood was obtained from volunteers in the present inventors' laboratory and used to prepare genomic DNA. The control region corresponding to positions -1981 bp to -12 bp upstream of the ATG was amplified using synthetic forward and reverse primers. To facilitate cloning into the plasmid pGL3-basic (Promega), the recognition sequence for *Bgl*II restriction enzyme (which is absent in the sequence to be amplified) was introduced at the ends of the forward and reverse primers.

The forward and reverse primers used for cloning the human SCD control region by PCR amplification are 5'-GGAAGATCTGAGAGCGAGACTTCCTCTCAA-3' and 5'-GGAAGATCTGATGCCGGGATCACTTTCC-3', respectively.

The PCR amplification was conducted in a Perkin-Elmer GeneAMP PCR system 9700 instrument, in a 50 µl reaction volume containing: 0.5 µg of genomic DNA, 0.4 µM of each primer, 1X dNTP mix (Clontech, CA), 1X cDNA PCR reaction buffer (Clontech) and 1X Advantage cDNA polymerase mix (Clontech).

The conditions for the PCR reaction were:

7 cycles at 94°C for 2 seconds, 72°C for 3 minutes
32 cycles at 94°C for 2 seconds, 67°C for 3 minutes
67°C for 4 minutes

The PCR product was gel-purified using QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany). The purified PCR product and the reporter vector pGL3-basic were separately digested with *Bgl*II restriction enzyme to generate compatible ends suitable for in-frame ligation of the PCR product to the luciferase gene of pGL3-basic. The ligation product was used to transform *E. coli* TOP10 strain (Invitrogen). The resulting plasmid, pGh3022.1, was screened by restriction analysis and confirmed by DNA sequencing. The resulting human SCD control region/reporter construct is used to transfect different mammalian cell lines, and reporter activity measured.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Example 8 - Cloning Human METP Control Region

The METP control region (1500 bp) is cloned from human leukocyte genomic DNA by PCR. The control region is amplified by PCR using synthetic forward and reverse primers starting at positions -

- 5 1500 bp and -1 bp upstream the ATG. The forward and reverse primers used for cloning human METP control region by PCR amplification is
 5'-TGGCCTTGATGGGCCACTCCCGC-3' and
 5'-GAACAAGGTGTGGCGGGGAGGCCCTGGGTC-3', respectively.
- 10 The PCR amplification is conducted in a Perkin-Elmer GeneAMP PCR system 9700 instrument. For example, the PCR is performed in a 50 µl reaction volume containing: 0.5 µg of genomic DNA, 0.4 µM of each primer, 1X dNTP mix (Clontech, CA), 1X cDNA PCR reaction buffer (Clontech) and 1X Advantage cDNA polymerase mix (Clontech).
- 15 The conditions for the PCR reaction are:
 7 cycles at 94°C for 2 seconds, 72°C for 3 minutes
 32 cycles at 94°C for 2 seconds, 67°C for 3 minutes
 67°C for 4 minutes
- 20 The PCR product is gel-purified using QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany) and ligated into the TA cloning vector pCRII (Invitrogen) according to manufacturers instruction. The ligation product is used to transform *E. coli* TOP10 strain (Invitrogen). The resulting plasmids are screened by restriction analysis and confirmed by DNA sequencing. The human METP control region is then recloned from the pCRII vector into the luciferase reporter vector pGL3-Basic (Promega). The
- 25 resulting human METP control region/reporter construct is used to transfect different mammalian cell lines, and reporter activity measured.

Example 9 - Cloning Human GLOL Control Region

- 30 The GLOL control region (468 bp, spanning positions -905 to -438) is cloned from human leukocyte genomic DNA by PCR. The first 30 nucleotides of the 5' end of GLOL control region is rich in A nucleotide (see Figure 13), and could make cloning by PCR difficult if incorporated in primers. Therefore, the control region is amplified by PCR using synthetic forward and reverse primers starting

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

at positions -886 bp and -438 bp upstream the ATG. The forward and reverse primers used for cloning human GLOL control region by PCR amplification is 5'-GGAAAAAAACGGCCCCGAGGCTATGAGTG-3' and 5'-CTGCCGCAGGAGGATGGGGCTC-3', respectively.

5

The PCR amplification is conducted in a Perkin-Elmer GeneAMP PCR system 9700 instrument. For example, the PCR is performed in a 50 µl reaction volume containing: 0.5 µg of genomic DNA, 0.4 µM of each primer, 1X dNTP mix (Clontech, CA), 1X cDNA PCR reaction buffer (Clontech) and 1X Advantage cDNA polymerase mix (Clontech).

10

The conditions for the PCR reaction are:

7 cycles at 94°C for 2 seconds, 72°C for 3 minutes
32 cycles at 94°C for 2 seconds, 67°C for 3 minutes
67°C for 4 minutes

15

The PCR product is gel-purified using QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany), and ligated into the TA cloning vector pCRIT (Invitrogen) according to manufacturer's instruction. The ligation product is used to transform *E. coli* TOP10 strain (Invitrogen). The resulting plasmids are screened by restriction analysis and confirmed by DNA sequencing. The human GLOL control region is then recloned from the pCRIT vector into the Luciferase reporter vector pGL3-Basic (Promega). The resulting human GLOL control region/reporter construct is used to transfect different mammalian cell lines, and reporter activity measured.

20

Example 10 - Cloning Human FTF1 Control Region

25

The FTF1 control region (883 bp, spanning position -883 to -1 upstream of the ATG) is cloned from human leukocyte genomic DNA by PCR. The first 30 nucleotides of the 5' end of FTF1 control region is rich in A and T nucleotides (see Figure 19), and could make cloning by PCR difficult if incorporated in primers. Therefore, the control region is amplified by PCR using synthetic forward and reverse primers starting at positions -850 bp and -1 bp upstream of the ATG respectively. The forward and reverse primers used for cloning human FTF1 control region by PCR amplification are 5'-TTAAAAAGCTGAAAATCTCCCCCGTTGAGGGGAGATC-3' and

30

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

5'-CGCAGCCGGCTCCCGGACCCCTTCC-3', respectively.

The PCR amplification is conducted in a Perkin-Elmer GeneAmp PCR system 9700 instrument. For example, the PCR is performed in a 50 µl reaction volume containing: 0.5 µg of genomic DNA, 0.4 µM of each primer, 1X dNTP mix (Clontech, CA), 1X cDNA PCR reaction buffer (Clontech) and 1X Advantage cDNA polymerase mix (Clontech).

The conditions for the PCR reaction are:

7 cycles at 94°C for 2 seconds, 72°C for 3 minutes

32 cycles at 94°C for 2 seconds, 67°C for 3 minutes

67°C for 4 minutes

The PCR product is gel-purified using QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany), and ligated into the TA cloning vector pCRII (Invitrogen) according to manufacturers instruction. The ligation product is used to transform *E. coli* TOP10 strain (Invitrogen). The resulting plasmids are screened by restriction analysis and confirmed by DNA sequencing. The human FTF1 control region is then recloned from the pCRII vector into the luciferase reporter vector pGL3-Basic (Promega). The resulting human FTF1 control region/reporter construct is used to transfect different mammalian cell lines, and reporter activity measured.

Example 11 - Cloning Human AIBG Control Region

The AIBG control region (431 bp) is cloned from human leukocyte genomic DNA by PCR. The control region is amplified by PCR using synthetic forward and reverse primers starting at positions -430 bp and -1 bp upstream the ATG. The forward and reverse primers used for cloning human AIBG control region by PCR amplification are

5'-TGAACCCACCTTTGGTGTCACATGTGCAG-3' and

5'-GATGGTCGCGTCACTCCGGTGCAGTGAG-3', respectively.

The PCR amplification is conducted in a Perkin-Elmer GeneAmp PCR system 9700 instrument. For example, the PCR is performed in a 50 µl reaction volume containing: 0.5 µg of genomic DNA, 0.4

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

μM of each primer, 1X dNTP mix (Clontech, CA), 1X cDNA PCR reaction buffer (Clontech) and 1X Advantage cDNA polymerase mix (Clontech).

The conditions for the PCR reaction are:

- 5 7 cycles at 94°C for 2 seconds, 72°C for 3 minutes
 32 cycles at 94°C for 2 seconds, 67°C for 3 minutes
 67°C for 4 minutes

- 10 The PCR product is gel-purified using QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany), and ligated into the TA cloning vector pCRII (Invitrogen) according to manufacturers instruction. The ligation product is used to transform *E. coli* TOP10 strain (Invitrogen). The resulting plasmids are screened by restriction analysis and confirmed by DNA sequencing. The human AIBG control region is then recloned from the pCRII vector into the luciferase reporter vector pGL3-Basic (Promega). The resulting human AIBG control region/reporter construct is used and to transfect different mammalian
- 15 cell lines, and reporter activity measured.

Example 12 - Cloning Human GPAT Control Region

- 20 The control region (1962 bp) is cloned from human leukocyte genomic DNA by PCR. The control region is amplified by PCR using synthetic forward and reverse primers starting at positions -34534 bp and -32575 bp upstream the A/TG. The forward and reverse primers used for cloning human GPAT control region by PCR amplification is
- 5'-TTGGCTCACCTCAGTGCCCCAGTC-3' and
- 5'-TGGTTTTCATCGTATCTTCCCCTCTGCTGCCATC-3', respectively.

- 25 The PCR amplification is conducted in a Perkin-Elmer GeneAMP PCR system 9700 instrument. For example, the PCR is performed in a 50 μl reaction volume containing: 0.5 μg of genomic DNA, 0.4 μM of each primer, 1X dNTP mix (Clontech, CA), 1X cDNA PCR reaction buffer (Clontech) and 1X Advantage cDNA polymerase mix (Clontech).
- 30 The conditions for the PCR reaction are:

- 7 cycles at 94°C for 2 seconds, 72°C for 3 minutes
 32 cycles at 94°C for 2 seconds, 67°C for 3 minutes

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

67°C for 4 minutes

The PCR product is gel-purified using QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany) and ligated into the TA cloning vector pCRII (Invitrogen) according to manufacturer's instruction. The ligation product is used to transform *E. coli* TOP10 strain (Invitrogen). The resulting plasmids are screened by restriction analysis and confirmed by DNA sequencing. The human GPAT control region is then re-cloned from the pCRII vector into the luciferase reporter vector pGL3-Basic (Promega). The resulting human GPAT control region/reporter construct is used to transfect different mammalian cell lines, and reporter activity measured.

10

Example 13 - Drug Screening Assay Using Yeast Whole Cells or Spheroplasts

A. Spheroplast Preparation

15 Cultures of *OLE1* deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae* (or other) transformed with human SCD gene with/without 6xHis tag are started from a stock cell suspension. Yeast are grown in appropriate medium and 2% galactose to induce the expression of the gene that encodes the fatty acid delta-9-desaturase. After 16 h incubation, cells are centrifuged at 2060 x g for 5 min at 4°C, washed once with distilled water and centrifuged. The volume and weight of the cell pellet is measured. Cells
20 are suspended (1:2 w/v) in 0.1 M Tris- SO_4 (pH 9.4), 10 mM DTT and incubated at 30°C. After 10 min incubation, the cell pellet is obtained by centrifugation, washed once (1:20 w/v) with 1.2 M sorbitol and suspended (1:1 w/v) in 1.2 M sorbitol, 20 mM phosphate buffer (pH 7.4). The 15,800 x g (1 min) supernatant of Lyticase is added to the cell suspension at a concentration of 2000 U/ml and incubated at 30°C in an orbital shaker at 50 rpm. Conversion to spheroplasts is checked after 40 min incubation
25 by diluting the suspension with distilled water followed by observation under the microscope. After 70 min incubation, approximately 90% of the cells are converted to spheroplasts.

B. Incubation of Spheroplasts with Test Compounds

30 Spheroplasts are harvested by centrifugation at 2060 x g for 5 min at 4°C, washed once with 1.2 M sorbitol and resuspended in appropriate medium with 1% Brij 58, 1.2 M sorbitol and 2% galactose to maintain the induction conditions and to give an O.D.₆₀₀ reading of approximately 2.5-3.0. A 10 ml aliquot of the spheroplast suspension is transferred to several 125 ml Erlenmeyer flask and incubated

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

with 200 μ l of different concentrations of test compounds in each flask at 30°C in an orbital incubator at 270 rpm. After 30 min incubation, 2-200 μ M (1 μ Ci) of [$1-^{14}$ C]palmitic acid is added to the cultures and further incubated for 120 min. At this time point, O.D.₄₉₀ is determined, spheroplasts are harvested by centrifugation and washed with Tris-HCl buffer (100 mM, pH 8.0) containing 0.1% BSA.

C. Incubation of Whole Yeast Cells with Test Compounds

OLE1 deletion mutants of *Saccharomyces cerevisiae* transformed with human SCD gene are incubated in several 125 ml Erlenmeyer flask containing 9 ml of an appropriate medium with 1% Brij 58, (O.D.₄₉₀ 0.4, approximately 3.2×10^6 cells/ml) and 200 μ l of different concentrations of test compounds. After 1 h incubation at 30°C in an orbital shaker at 270 rpm, 1 μ Ci of [$1-^{14}$ C]palmitic acid (dissolved in incubation medium with 1% Brij 58), is added to the cell suspension to a final concentration of 2-200 μ M. After 5 h incubation with the inhibitor and radiolabelled fatty acid, the transgene expression is induced with the addition of galactose to a final concentration of 2%. Yeast are further incubated for 19 h until they are harvested by centrifugation at 5000 x g for 10 minutes at 4°C. Cells are washed with Tris-HCl buffer (100 mM, pH 8.0) containing 0.1% BSA and total lipids are extracted as described below.

D. Lipid Analysis

Whole cells or spheroplast pellets are saponified with 10% KOH to obtain free fatty acids which are further methylated using BF₃ in methanol. The fatty acid methyl esters are analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using a Hewlett Packard 1090, Series II chromatograph equipped with a diode array detector set at 205 nm, a radioisotope detector (Model 171, Beckman, CA) with a solid scintillation cartridge (97% efficiency for ^{14} C-detection) and a reverse-phase ODS (C-18) Beckman column (250 mm x 4.6 mm i.d.; 5 μ m particle size) attached to a pre-column with a μ Bondapak C-18 (Beckman) insert. Fatty acid methyl esters are separated isocratically with acetonitrile/water (95:5 v/v) at a flow rate of 1 ml/min and are identified by comparison with authentic standards.

Alternatively, fatty acid methyl esters are analyzed by capillary column gas-chromatography (GC).

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Example 14 - Drug Screening Assay Using Yeast MicrosomesA. Yeast Microsome Preparation

5 A 2-5 l culture of the *OLE1* deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae* transformed with the 6xHis tagged or non-tagged delta-9-desaturase is started with a cell density of approximately 3.2×10^5 cells/ml (O.D.₆₀₀ 0.4) using the appropriate medium without galactose. After 8 h of incubation at 30°C in an orbital shaker at 270 rpm, galactose is added to a final concentration of 2%. Yeast are further
 10 incubated for 12 h until they are harvested by centrifugation at 2060 x g for 10 minutes at 4°C and washed with water. The cell pellet is resuspended in 1/3 of its volume in a pH 7.2 isolation buffer (80 mM Hepes-KOH, 10 mM KCl, 320 mM sucrose, 2 mM PMSF and a protease inhibitor cocktail). The cell suspension is poured into a mortar containing liquid N₂ and ground with sand using a ceramic pestle. The yeast powder is transferred to a conical test tube, to which 2/3 of the pellet volume of
 15 isolation buffer is added. The sand is removed by centrifugation at 57 x g for 1 min and the suspension centrifuged at 10,000 x g for 20 min to separate cell debris, nuclei and mitochondria. The supernatant is centrifuged at 106,000 x g for 1 h to obtain the microsomal pellet, which is resuspended in 700 µl of isolation buffer. A protein assay is performed on the microsome suspension.

B. Incubation of Yeast Microsomes with Test Compounds

The activity of delta-9-desaturase is determined by measuring the conversion of [1-¹⁴C]16:0 (palmitic acid) to [1-¹⁴C]16:1n-7 (palmitoleic acid). Reactions are started by adding 500 µg of yeast microsomal protein to pre-incubated tubes containing 0.20 µCi of the substrate fatty acid at a final concentration of 33
 25 µM in 0.25 ml of 80 mM Hepes-KOH (pH 7.2) with 43.2 mM MgCl₂, 1.0 mM ATP, 500 µM NADH and 10 µM coenzyme A, and a range of concentrations of test compounds. The tubes are vortexed vigorously and after 15 min incubation in a shaking water bath (37°C), the reactions are stopped by the addition of 2 ml of 10% (w/v) KOH in ethanol. Lipids in the incubation mixture are saponified at 80°C for 45 min under N₂. The samples are then left in ice for 5 min before acidification. The fatty acids are extracted with
 30 hexane and esterified with BF₃ in methanol at 90°C for 30 min. The fatty acid methyl esters are analyzed by HPLC as described in Example 13.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Results are expressed in pmol of palmitoleic acid produced/mg microsomal protein/min.

Example 15 - Drug Screening Assay Using Purified Enzyme

5 **A. Isolation of Delta-9-Desaturase from Yeast Microsomes**

- Yeast microsomes containing the delta-9-desaturase tagged with 6xHis are stirred with Zwittergent 3-
 14 or mixtures of deoxycholate/Triton X100 (2% w/w) for 2 h at 4°C to solubilize the delta-9-
 desaturase. Alternatively, yeast microsomes can be treated with 2.5% (v/v) water in acetone to
 10 improve the solubilizing power of the detergents. The mixture is centrifuged at 106,000 x g for 1 h.
 The supernatant containing the enzyme is loaded onto a pre-equilibrated HiTrap chelating (Ni²⁺
 charged iminodiacetate) column (Pharmacia) attached to a fast protein liquid chromatography system
 (Pharmacia). The column is washed with a 50 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0. The tagged
 protein is eluted with the same buffer containing imidazole ranging from 0-500 mM and further
 15 concentrated by ultrafiltration using Centriprep (Amicon) concentrators.

B. Incubation of Delta-9-Desaturase with Test Compounds

- The concentrated enzyme is incubated at 30-37°C in Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 1 mM
 20 NADH, 80 µM cytochrome b₅, 4 µM NADH-cytochrome b₅ reductase, 6 mM egg
 phosphatidylcholine, 2% Triton X-100, 0.4% sodium deoxycholate, radiolabelled palmitoyl-CoA, and
 a range of concentrations of test compounds. After 15-90 min of incubation, the reaction is stopped and
 fatty acid methyl esters are analyzed as described in Example 13.
- 25 Alternatively, enzyme activity can be measured by the rate of NADH oxidation in the presence or
 absence of palmitoyl-CoA.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Example 16 - Validation of Drug Screening Assays Described in Examples 13 to 15 Using Rat Liver Microsomes

5 A. Preparation of Rat Liver Microsomes

Wistar rats under light halothane (15% in mineral oil) anesthesia were sacrificed by exsanguination during periods of high enzyme activity. Livers are immediately rinsed with cold 0.9% NaCl solution, weighed and minced with scissors. All procedures are performed at 4°C unless specified otherwise.

- 10 Livers are homogenized in a solution (1:3 w/v) containing 0.25 M sucrose, 62 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.15 M KCl, 1.5 mM *N*-acetylcysteine, 5 mM MgCl₂, and 0.1 mM EDTA using 4 strokes of a Potter-Elvehjem tissue homogenizer. The homogenate is centrifuged at 10,400 x g for 20 min to eliminate mitochondria and cellular debris. The supernatant is filtered through a 3-layer cheesecloth and centrifuged at 105,000 x g for 60 min. The microsomal pellet is gently resuspended in
- 15 the same homogenization solution with a small glass/teflon homogenizer and stored at -70°C. The absence of mitochondrial contamination is enzymatically assessed. The protein concentration is measured using bovine serum albumin as the standard.

B. Incubation of Rat Liver Microsomes with Test Compounds

- 20 Reactions are started by adding 2 mg of microsomal protein to pre-incubated tubes containing 0.20 µCi of the substrate fatty acid (palmitic acid) at a final concentration of 33.3 µM in 1.5 ml of homogenization solution, containing 42 mM NaF, 0.33 mM niacinamide, 1.6 mM ATP, 1.0 mM NADH, 0.1 mM coenzyme A and a range of concentrations of test compounds. The tubes are vortexed vigorously and
- 25 after 15 min incubation in a shaking water bath (37°C), the reactions are stopped and fatty acids are analyzed as described in Example 13. Alternatively, fatty acid methyl esters are analyzed by capillary column gas chromatography (GC).

Example 17 - Drug Screening Assay for Apolipoprotein A-1

- 30 A test compound that interacts with ApoA-1 is likely to interfere with the function of ApoA-1 as a cofactor leading to a loss in LCAT activity. A drug screening assay is based on well known enzymatic

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

assays for LCAT activity (Li M. and Pritchard P. H., 2000, *J. Biol. Chem.* 275: 18079-18084 and Sorci-Thomas et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275: 12156-12163).

- Briefly, purified recombinant ApoA-1 or purified plasma ApoA-1 is mixed with [³H]cholesterol and phosphatidylcholine at a molar ratio of 0.8:12.5:250 (~1.2 µg) in 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 0.25 mM EDTA, 0.15 mM sodium azide, 0.6% fatty acid-free bovine serum albumin and 2 mM beta-mercaptoethanol. A test compound is provided in the reaction at an appropriate concentration. Appropriate volume of fresh plasma is added to the reaction mix to provide LCAT. After a 30 min incubation at 37°C the reaction is stopped by adding ethanol. The conversion of [³H]cholesterol to [³H]cholesterol ester is determined by extracting total lipids and separating them using silica gel G plates and hexane/diethyl ether/acetic acid (70:12:1 v/v/v) in thin layer chromatography techniques. The radioactivity of the cholesterol ester spot is measured by liquid scintillation counting, by scanning the plate with a Berthold radioisotope scanner or by autoradiographic procedures known in the art.
- Variation(s) in the test reaction versus control reaction (without test compound) is a measure of the modulating effect of the test compound on ApoA-1.

- Alternatively, small peptides or antibodies, obtained from combinatorial libraries adapted for phage display, that bind to ApoA-1 are identified by using a similar methodology described in Nord et al. 1997, *Nat. Biotechnol.*, 15: 772-777.

Example 18 - Drug Screening Assay for Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase

- Whole cells, spheroplasts, microsomes, mitochondria or the purified enzyme are obtained from acyltransferase mutants of *Saccharomyces cerevisiae* transformed with human or mammalian genes that encode 6xHis tagged or non-tagged GPAT as described in Examples 13, 14 and 15.

- Cells or organelles (i.e., microsomes or mitochondria) or the purified enzyme are incubated for 2-12 h (cells) or 5-20 min (organelles or purified enzyme) with radiolabelled glycerol and palmitoyl-CoA or other acyl-CoAs in the presence of different concentrations of the test compounds. The reaction is stopped with butanol and the lysophosphatidic acid formed separated by two dimensional thin layer chromatography using silica gel G plates and a mixture of solvents. The first dimension is run in chloroform:methanol:7 N ammonia (65:25:4 v/v/v) and the second dimension in

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

chloroform:methanol:acetic acid:water (170:15:15:2 v/v/v/v). The silica with the radiolabelled lysophosphatidic acid spot is scraped and the radioactivity counted in a scintillation counter. Alternatively, HPLC methods with mass detector/on line ¹⁴C-detectors may be used.

5 **Example 19 - Drug Screening Assays for Spot-14**

Spot-14 is a nuclear protein with all the characteristics of a transcription factor. It was shown by a yeast two-hybrid system that Spot-14 has a strong propensity for homodimerization, as is the case for many transcription factors (Cunningham et al., 1997, *Endocrinology*, 138: 5184-5188).

10

Therefore, a yeast two-hybrid system is used to screen compounds that disrupt the homodimerization of Spot-14. The two-hybrid assay is performed as described in Example 21. Spot-14 cDNA is cloned in a prey vector as well as in a bait vector containing DNA activation domain (AD) and DNA binding domain (DBD), respectively. The vectors are introduced into a suitably engineered yeast strain.

15

Homodimerization (interaction of domains) of Spot-14 will bring the AD into close proximity to the DBD, thereby triggering the expression of a reporter gene. Expression of the reporter gene is assayed using techniques well known in the art. Treatment of the transformed yeast with any test compound that disrupts Spot-14 dimerization results in growth inhibition of the yeast on selective medium.

20

Example 20 - Drug Screening Assay for METP

Several genes involved in mitochondrial function are known in yeast (Belenkiy et al., 2000, *Biochem. Biophys. Acta*, 1467: 207-218 and Contamine V. and Pichard M., 2000, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 281-315). Yeast mutants that are defective in certain mitochondrial functions show several

25

phenotypes including temperature sensitivity and growth inhibition on glycerol or ethanol. Such yeast mutants are transformed with the METP gene and phenotypic revertants analyzed. Complementation of yeast mutant phenotypes by related human genes is well known in the art (Nakashima et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 9567-9572 and Amaravadi et al., 1997, *Hum. Genet.*, 99: 329-333). The revertant strains containing METP are used to screen for new chemical entities that inhibit the ability of METP

30

to complement the mutant phenotype.

Two yeast genes, YMC1 and YMC2, encoding putative mitochondrial carrier proteins (Graf et al., 1993, *Yeast*, 9: 301-305) share about 30% identity with METP, indicating relatedness of function. The

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

phenotypes of single YMC1 and YCM2 mutants or the double mutant are determined. The phenotype is complemented with METP, and then used for drug screening as described above.

Example 21 - Drug Screening Assays Using Yeast 1- or 2-Hybrid Systems

5

The methods for the yeast one-hybrid and two-hybrid assays are known by persons skilled in the art (Fields S. and Song O., 1989, *Nature*, 340: 245-246; Ulmasov et al., 1997, *Science*, 276: 1865-1868 and Furuyama K. and Sassa S., 2000, *J. Clin. Invest.*, 105, 757-764). Reagents or kits are commercially available for the assays, for example, the Hybrid Hunter Yeast Two-Hybrid and RNA-Protein Hybrid Hunter Systems (Invitrogen), the Matchmaker One-Hybrid and Two-Hybrid Systems (Clontech) and the HybriZAP Two Hybrid System (Stratagene).

10

The following assays are suitable for all of the genes regulated by fatty acids disclosed herein.

15 A. Yeast 1-Hybrid Assay

The known target elements, or control region 'bait' is inserted upstream of a reporter gene (e.g. *HIS3*) and integrated into the yeast genome to make a new reporter strain. The yeast strain is transformed with an activation domain (AD) fusion library to screen for DNA binding proteins that interact with the bait DNA sequence. Binding of an AD/DNA-binding domain (DBD) hybrid protein to the target sequence results in activation of the reporter gene transcription and subsequent selection. For example, expression of *HIS3* will allow colony growth on minimal medium lacking histidine. The cDNA encoding DNA binding protein (DBP) is isolated and characterized. The interaction is reconstructed *in vitro* or *in vivo* for screening test compounds by exposing the target elements or control region to the DBP in the presence of test compounds. The effect of the test compound is evaluated through assays, well known to those skilled in the art, that measure DNA/protein binding interactions.

20

25

B. Yeast 2-Hybrid Assay

30

Two physically distinct functional domains are necessary: a DNA binding domain (DBD) and an activation domain (AD). The polypeptide of interest is cloned into a "bait" vector, and expressed as a hybrid protein with a DBD. A library of cDNAs encoding potential interacting proteins is cloned in

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

frame with AD in the "prey" vector. The bait and prey vector fusion constructs are transformed into one of several engineered yeast strains. If an interaction between bait and prey hybrid proteins occurs, the AD of the prey is brought into close contact with the DBD and transcription of the reporter gene is activated. Positive interacting proteins are easily identified by plating on nutrient deficient medium, and screening for reporter activity. The interaction between these two proteins is reconstructed *in vitro* or *in vivo* for screening test compounds by exposing the two interacting proteins in the presence of test compounds. The effect of the test compound is evaluated through assays, well known to those skilled in the art, that measure protein/protein binding interactions.

10 Example 22 - Drug Screening Assays for INSIG1

A stable overexpressing INSIG1 cell line is established and a non-expressing cell line serves as a control. Cell membranes from the overexpressing and control cell lines are isolated and incubated with labeled test compounds. After an appropriate incubation time, the membranes are recovered and washed to remove unbound test compound. By techniques well known to those skilled in the art, the specific binding of the test compound is measured by comparing the amount bound to the membranes containing INSIG1 to that bound to control membranes.

Alternatively, the hepatocyte cell line, H35 is used with and without induction of INSIG1 by insulin. Alternatively, isolated membranes from regenerating liver cells after hepatectomy are used and compared to membranes from non-hepatectomized animals. In certain instances, whole cells rather than isolated membranes may be used. Alternatively, purified INSIG1 is used to generate an artificial recombinant INSIG1/membrane complex and compared to membrane complexes without INSIG1.

25 Example 23 - Drug Screening Assay for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Using Yeast Complementation

G6PD null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* do not grow in a medium lacking an organic sulfur source, i.e. 0.1 mM L-methionine, 0.5 mM L-cysteine, 0.2 mM glutathione, 0.2 mM homocysteine or 0.2 mM S-adenosylmethionine, or a mineral sulfur source, i.e. 0.5 mM sulfate, 0.5 mM sulfite or 0.5 mM sulfide (Thomas et al., 1991, *EMBO J.*, 10: 547-553). Such yeast mutants are transformed with the G6PD gene and phenotypic revertants analyzed. Complementation of yeast mutant phenotypes by related human genes is well known in the art (Nakashima et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 9567-9572).

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

and Amaravadi et al., 1997, *Hum. Genet.*, 99: 329-333). The revertant strains containing G6PD are used to screen for new chemical entities that inhibit the ability of G6PD to complement the mutant phenotype.

This model, using whole or permeabilized yeast cells or spheroplasts is novel and useful to screen test compounds that affect the G6PD activity.

Example 24 - Drug Screening Assay for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Using Purified or Crude Enzyme Extract

Large volumes of the G6PD null mutant yeast transformed with the G6PD gene are grown in appropriate minimal medium with the adequate selection system. The overproduced G6PD protein is isolated using affinity or anion exchange chromatography. A yeast homogenate is obtained using the liquid N₂ method as previously described (see Example 14) and applied to a 2',5'-ADP-Sepharose column. The G6PD protein is eluted using a 2 buffer system. The first elution buffer is Tris-HCl, pH 7.6 containing 5 mM EDTA and 0.02% beta-mercaptoethanol, and the second elution buffer is 0.1 M potassium phosphate, pH 7.0. The protein concentration is measured by methods well known in the art. Alternatively, the crude yeast extract is used as a source of G6PD protein.

Modulation of G6PD activity by different test compounds is determined spectrophotometrically by following the increase in fluorescence at 341 nm due to the conversion of NADP⁺ to NADPH. The enzymatic reaction is performed in a cuvette containing 100 µl of the purified enzyme or the crude yeast extract, 900 µl of Tris-HCl 50 mM (pH 8.1), 1 mM MgCl₂, 200 µM glucose-6-phosphate, 100 µM NADP⁺ and a range of concentrations for each test compound. The specific activity of the enzyme is calculated using a molar extinction coefficient of 6270 for NADPH.

Example 25 - Drug Screening Assay for GLOL Using Yeast

Glyoxalase genes in *Saccharomyces cerevisiae* such as GLO2 and GLO4 have significant homology with mammalian GLOL. Yeast *glo2/glo4* double deletion mutants (without glyoxalase II activity) are suitable hosts for transformation with the GLOL gene. *Saccharomyces cerevisiae glo2/glo4* double deletion mutant transformed with GLOL gene is grown in YPD (2% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract) or synthetic minimal medium (0.17% yeast nitrogen base, 0.5% ammonium sulfate) containing the appropriate amino acids and carbon source (2% glucose or 3% glycerol). Spheroplasts

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

from the transformed yeast are obtained as described in Example 13. The whole yeast cells are permeabilized with alcohol, i.e. methanol, ethanol or isopropyl alcohol. Both cell models are incubated with permeable glutathione conjugates and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). The hydrolysis of the thiol esters is followed at 412 nm using techniques known in the art to monitor GLOL activity. Test compounds are added at different concentrations and GLOL activity measured.

Example 26 - Drug Screening Assay for GLOL Using Yeast Complementation

Yeast *glo2/glo4* double deletion mutants do not grow in the presence of methylglyoxal. Such yeast mutants are transformed with the GLOL gene and phenotypic revertants analyzed. Complementation of yeast mutant phenotypes by related human genes is well known in the art (Nakashima et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 9567-9572 and Amaravadi et al., 1997, *Hum. Genet.*, 99: 329-333). The revertant strains containing GLOL are used to screen for new chemical entities that inhibit the ability of GLOL to complement the mutant phenotype.

This model, using whole or permeabilized yeast cells or spheroplasts is novel and useful to screen test compounds that affect the GLOL activity, thereby increasing or decreasing sensitivity to methylglyoxal.

Example 27 - Drug Screening Assay for GLOL Using Purified Enzyme

Large volumes of the *glo2/glo4* double mutant yeast transformed with the GLOL gene are grown and the overproduced GLOL protein is isolated by obtaining a yeast homogenate using the liquid N₂ method as described in Example 14. The homogenate is applied to a column with immobilized glutathione and the GLOL protein is eluted with 3 M NaCl in MOPS buffer (pH 7.2). The protein concentration is measured by methods well known in the art.

Modulation of GLOL activity is determined at 37°C in 1 ml of 100 mM MOPS, pH 7.2 containing glutathione conjugates and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). The reaction also contains GLOL at concentrations ranging from 7-200 ng/ml and appropriate concentrations of the test compound. The enzyme activity is measured by following the decrease of absorbance at 240 nm or by following the formation of glutathione by the increase of absorbance at 412 nm.

Example 28 - Drug Screening Assay for Fatty Acid Synthase

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Large volumes of the FAS null mutant yeast transformed with the FAS gene are grown in appropriate minimal medium with the adequate selection system. A yeast homogenate is obtained using the liquid N₂ method as previously described in Example 14. The overproduced FAS protein from the yeast homogenate is isolated using stepwise polyethylene glycol and ammonium sulfate precipitation, gel filtration, and anion exchange chromatography. The protein concentration is measured by methods well known in the art.

Alternatively, the crude yeast extract is used as a source of FAS protein.

Modulation of FAS activity by different test compounds is determined spectrophotometrically by following the oxidation of NADPH to NADP⁺ at 340 nm or using HPLC techniques in which the incorporation of radiolabelled acetyl-CoA or malonyl-CoA into palmitic acid is analyzed.

Example 29 - Drug Screening Assay for Delta-3, delta-2-enoyl-CoA Isomerase Using Yeast Complementation

Complementation of yeast mutant phenotypes by related human or mammalian genes is well known to those skilled in the art (Nakashima et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 9567-9572 and Amaravadi et al., 1997, *Hum. Genet.*, 99: 329-333). The *Saccharomyces cerevisiae* delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase mutant does not grow in a test medium containing oleic acid (0.1% yeast extract, 0.67% yeast nitrogen base, 0.02% Tween-40, 0.1% oleic acid and 0.1% dextrose; or 1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 0.2% oleic acid, and 0.02% Tween-40). Such a yeast mutant is transformed with a plasmid containing the mammalian delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase gene using techniques well known in the art, and phenotypic revertants analyzed in test medium. The revertant strains containing delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase are used to screen for new chemical entities that inhibit the ability of delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase to complement the mutant phenotype. This model, using whole or permeabilized yeast cells or yeast spheroplasts is appropriate to screen test compounds that affect the delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase function, thereby increasing or decreasing requirement for oleic acid.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Example 30 - Drug Screening Assay for Delta-3, delta-2-enoyl-CoA Isomerase Using Purified Enzyme

Large volumes of the delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase mutant yeast transformed with mammalian delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase gene are grown, and the overproduced protein is obtained from yeast homogenate using the liquid N₂ method as described in Example 14. The mitochondrial pellet is isolated from the homogenate using differential centrifugation techniques. The pellet is resuspended in 100 ml of 25 mM phosphate buffer pH 7.4, and sonicated for 2 minutes in an ice bath. The suspension is heated at 70°C for 30 seconds, cooled on ice and centrifuged at 15,000 x g for 15 minutes at 4°C. The mitochondrial lysate is dialyzed against 25 mM phosphate buffer (pH 6.0), and loaded onto a CM52 cellulose column with bed volume of 70 ml. Unbound protein is eluted with 25 mM phosphate buffer pH 6.0, and the delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase eluted with 30 ml of 25 mM phosphate buffer pH 7.4. The eluate is dialyzed against 20 mM Tris-HCl, pH 8.7 and separated on a fast protein liquid chromatography mono-Q anion exchange column by gradient elution with 20 mM Tris-HCl pH 8.7 and 20 mM Tris-HCl pH 8.7 containing 1 M NaCl. The delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase elutes at 50 mM NaCl. Protein concentration is measured by methods well known in the art.

Modulation of delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase activity by test compounds is determined spectrophotometrically at 340 nm according to Binstock and Schulz (1981, *Meth. Enzymol.*, 71: 403-411). The reaction contains appropriate concentration of substrate (3-*cis*-octenoyl-CoA or 3-*trans*-hexenoyl CoA), test components and purified enzyme.

Alternatively, whole yeast, permeabilized yeast or spheroplasts, containing the recombinant delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, are used for the assay. The yeast used in these assays can also be genetically engineered to produce endogenous specific substrates for the delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase.

Example 31 - Drug Screening Assay for COMT Using Crude Lysate or Purified Enzyme

To produce sufficient amounts of active recombinant mammalian COMT in *E. coli* or a suitable host system, the gene is introduced into a bacterial expression vector, for example pKEX14. COMT is produced at high levels (up to 10% of total bacterial protein) after induction of the T7 RNA

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

polymerase gene with IPTG. The enzyme is purified from *E. coli* cells using procedures known in the art (Lundstrom et al., 1992, *Biochim. Biophys. Acta*, 1129: 149-154). The purified enzyme is used for screening drugs that modulate COMT activity. Alternatively, the crude bacterial lysate is used for the assay.

5

Modulation of COMT activity by test compound is determined using methods known in the art (Tilgmann C. and Kalkkinen N., 1990, *FEBS Lett.*, 264: 95-99 and Lautala et al., 1999, *J. Chromatogr. B*, 736: 143-151). Briefly, 250 μ l of the incubation mixture containing 5 mM $MgCl_2$, 20 mM L-cysteine, 0.15 mM [^{14}C]S-adenosyl-L-methionine (0.1 μ Ci), and 1-100 μ g of mammalian COMT (provided as purified enzyme or crude lysate) in appropriate buffer is pre-incubated at 37°C for 5 min. Subsequently, 0.5 mM catechol (as substrate) and appropriate concentration of test compounds are added to the incubation mixture. After a 10 to 30 min incubation period, the reaction is terminated by the addition of 25 μ l cold 4 M perchloric acid. The sample is kept on ice for 10 min and subsequently centrifuged for 5 min at 22,000 x g.

15

The methylated catechol products are separated from S-adenosyl-L-methionine using a Hewlett-Packard HPLC chromatograph (1090 Series II) equipped with an inline radioisotope flow detector with a Beckman 110B cocktail pump using a 1000 μ l liquid scintillation flowcell with an exit volume of 20 μ l. Alternatively, a 300 μ l flowcell packed with silanised cerium activated platinum glass as scintillant is used.

20

Alternatively, whole yeast or permeabilized yeast or spheroplasts, containing the recombinant COMT, is used for the drug screening assay.

25 Example 32 - Drug Screening Assay Using Human SCD Control Region.

Plasmid pGh3022.1, containing the human SCD control region, is used to screen drugs that modulates the human SCD promoter activity. Transient transfections are performed to evaluate the functionality of the SCD control region using techniques known by persons skilled in the art.

30

HepG2 cells are transfected with 10 μ g of pGh3022.1 (Example 7) and 1 μ g of vector pRSV-NEO (ATCC), using 10 μ l of Lipofectamine 2000 Reagent (Gibco BRL) in a 60 mm tissue culture dish as

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

described by the manufacturer. After a 24 h incubation, the cells are passaged into two 150 mm tissue culture dishes at a 1:2 dilution and grown for another 24 h. Geneticin (Gibco BRL) is added to the medium at a concentration of 800 µg/ml. After 3-4 weeks of growth under the selection pressure of the antibiotic, the resistant clones are isolated and characterized for their luciferase activity.

- 5
- Drug screening is performed using the Luciferase Enzyme Assay System (Promega), following the manufacturer's recommendations. Briefly, transfected cells grown in a 96 well plate are exposed to test compound. After an appropriate incubation time, the cells are washed with Mg^{2+} and Ca^{2+} free PBS. Cells are lysed with 20 µl of 1X Luciferase Cell Culture Lysis Reagent (CCLR, Promega). The
- 10
- plate is placed onto a luminometer with automatic injector. The injector adds 100 µl of Luciferase Assay Reagent (Promega) per well, and the light emission generated by the reaction is read for 10 seconds after a 2 second delay before moving to the next well to repeat the process. Cell cultures without a test compound are used as controls. Any significant difference in the luciferase activity indicates that the test compound is modulating the human SCD promoter activity.

- 15
- This assay or other reporter assay is useful for drug screening using the control region of any fat regulated gene.

20

Example 33 - Drug Screening Assay Using Antibodies Against Polypeptides Encoded by Fat Regulated Genes in Animal Models

Monoclonal antibodies against the polypeptides encoded by fat regulated genes are prepared using methods well known in the art.

- 25
- Rats are randomly divided into test and control groups. A test compound and placebo are enterally or parenterally administered to the test and control groups, respectively. The test compound and placebo are provided by bolus or continuous administration. After an appropriate period of treatment, animals are sacrificed by exsanguination, and tissue samples taken for immunoassays.
- 30
- In blood, the amount of excreted target polypeptide that is encoded by the fat regulated gene, is determined by centrifuging the blood and exposing the plasma to the corresponding monoclonal antibody. The amount of antigen-antibody complex is detected using a secondary antibody which is

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

linked to a marker. These immunological products are quantified using methods well known in the art (e.g., immunofluorescence or chemiluminescence).

- Similarly, whole organs or leukocytes from blood of test and control animals are homogenized as described in Example 16. Cell debris is removed by centrifugation and the supernatant is used for the immunoassays as described herein.

The assay is also suitable for the identification of drugs that alter the expression of fat regulated genes in normal or disease (e.g., diabetes or cancer) animal models.

10

Example 34 - Drug Screening Assay Using Antibodies Against Polypeptides Encoded by Fat Regulated Genes in Cell Culture

HepG2 cells are grown in a medium with (test group) or without (control group) a test compound.

- After an appropriate period of treatment, the medium is collected, cells are washed with PBS and lysed using techniques known in the art. The medium containing the excreted target polypeptide that is encoded by the fat regulated gene, and the cell lysate are used for the immunoassay described in Example 33.

Example 35 - Drug Screening Assay Using Affinity Chromatography and Antibodies Against Polypeptides Encoded by Fat Regulated Genes

- A monoclonal antibody described herein (Example 33) is immobilized to a protein G POROS column (PerSeptive Biosystems, MA) using a crosslinking agent known by persons skilled in the art (Evans et al., 1996, *Nat. Biotech.* 14: 504-507). A column without the monoclonal antibody and treated with crosslinking reagents is used as control.

- A natural or synthetic peptide combinatorial library is injected onto the column. After washing the unbound material with several column volumes of PBS pH 7.4, the bound peptide is eluted with 12 mM HCl and characterized using methods known to persons skilled in the art (e.g., reverse phase HPLC developed with a gradient of acetonitrile and mass spectroscopy).

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

This assay is used for the identification of antigenic test compounds with high affinity to monoclonal antibodies raised against polypeptides encoded by fat regulated genes. The identified test compound, due to its similar antigenic properties to the target polypeptide, is used to mimic the function of the said target polypeptide in disease.

5

Example 36 - Diagnostic Assay Using Antibodies

Fractionated blood (e.g. plasma and leukocytes) obtained from subjects with suspected alterations in the production of the target polypeptide is used for the diagnosis of the associated disease. Leukocytes are lysed using techniques known to those skilled in the art.

10

The amount of target polypeptide that is encoded by the fat regulated gene, is determined by exposing the plasma and the leukocyte lysate to the corresponding monoclonal antibody. The amount of antigen-antibody complex is detected using a secondary antibody which is linked to a marker. These immunological products are quantified using methods well known in the art (e.g., immunofluorescence or chemiluminescence).

15

Example 37 - Determination of Tissue Distribution of RNA by Northern Blot Analysis

A. Rat

20

Wistar rats (~ 300 g) were obtained from Charles River Canada Ltd. and maintained on regular chow for 5-6 days. Each rat was sacrificed via cardiac puncture under anesthesia and its tissues immediately perfused with saline. Appropriate tissues were quickly removed and frozen in liquid nitrogen.

25

RNA was isolated from liver, brain, kidney, lung, ovary, spleen, heart, skeletal muscle, abdominal adipose tissue and nerve of female rats using Trizol reagent (Gibco BRL) as per the manufacturer's protocol. The RNA isolated from spleen, heart, muscle, adipose tissue and nerve was subsequently purified using RNeasy (Qiagen) as per the manufacturer's protocol. Additionally, RNA was isolated from testes of male rats as described in Auffray C. and Rougeon F. (1980, *Eur. J. Biochem.*, 107: 303-314). The testes were ground to a fine powder under liquid nitrogen and homogenized in 3 M LiCl and 6 M urea. The RNA was precipitated at 4°C and pelleted by centrifugation. The pellet was resuspended and extracted with chloroform/isoamyl alcohol prior to ethanol precipitation.

30

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

For each tissue, 10 µg of total RNA pooled from 6 rats (for nerve) or 4 rats (for all tissues except nerve), was subjected to formaldehyde agarose gel electrophoresis and transferred to a nylon membrane (BioRad) by capillary action using standard procedures (Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, 2nd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY).

Northern blot analysis was carried out using standard procedures (Ausubel et al., 1994-, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY). Probes were prepared by labelling cDNA using [alpha-³²P]dCTP and Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Pharmacia Biotech). The cDNA probes for rat METP, FTF1, AIBG and GLOI obtained during the differential display study (Example 1) were used. The membrane was washed at high stringency using 0.25X SSC, 0.1% SDS at 55°C. The membrane was probed with a nucleotide probe against the 18S rRNA subunit for normalization of loading.

15 B. Human

A membrane containing poly(A)⁺ RNA from 12 different human tissues (brain, heart, skeletal muscle, colon, thymus, spleen, kidney, liver, small intestine, placenta, lung and peripheral blood leukocytes) was purchased from Clontech (Human 12-lane MTN blot). Northern blot analysis was carried out using standard procedures (Ausubel et al., 1994-, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY). Probes were prepared by labelling cDNA using [alpha-³²P]dCTP and Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Pharmacia Biotech). The cDNA probe for METP corresponded to the complete coding sequence for the human gene. The cDNA probes for GLOI, FTF1 and AIBG corresponded to bases 1-652, 564-1363 and 214-915, respectively, of the coding sequences of the human genes. The membrane was washed at high stringency using 0.25X SSC, 0.1% SDS at 55°C.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

REFERENCES

- U.S. Pat. No. 3,817,837, June, 1974, Rubinstein et al.
 U.S. Pat. No. 3,850,752, Nov., 1974, Schuur et al.
 U.S. Pat. No. 3,939,250, Feb., 1976, Kronick et al.
 U.S. Pat. No. 3,996,345, Dec., 1976, Ullman et al.
 5 U.S. Pat. No. 4,275,149, June, 1981, Litman et al.
 U.S. Pat. No. 4,277,437, July, 1981, Maggio
 U.S. Pat. No. 4,366,241, Dec., 1982, Torn et al.
 U.S. Pat. No. 4,399,216, Aug., 1983, Axel et al.
 U.S. Pat. No. 4,704,362, Nov., 1987, Itakura et al.
 10 U.S. Pat. No. 4,766,075, Aug., 1988, Goeddel et al.
 U.S. Pat. No. 4,784,950, Nov., 1988, Hagen et al.
 U.S. Pat. No. 4,801,542, Jan., 1989, Murray et al.
 U.S. Pat. No. 4,816,567, Mar., 1989, Cabilly et al.
 U.S. Pat. No. 4,935,349, June, 1990, McKnight et al.
 15 U.S. Pat. No. 5,130,238, July, 1992, Malek
 International Patent Application No. WO 88/04300, June, 1988, Cech et al.
 Patent Cooperation Treaty International Publication No. WO 93/05182, Mar., 1993, Bruice
 European Published Application No. 0320308, June, 1989, Backman et al.
 International Patent Application No. WO 00/51430, Sept., 2000, Bergsma et al.
 20 Adediran, 1996, *Biochimie*, 78: 165-170
 Altschul et al., 1990, *J. Molec. Biol.*, 215: 403-410
 Amaravadi et al., 1997, *Hum. Genet.*, 99: 329-333
 Armstrong et al., 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177: 1056-1061
 25 Askar et al., 1996, *Indian J. Biochem. Biophys.*, 33: 512-518
 Auffray C. and Rougeon F., 1980, *Eur. J. Biochem.*, 107: 303-314
 Ausubel et al., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY
 Bautista et al., 1992, *Biochim. Biophys. Acta*, 1119: 74-80
 Been M.D. and Cech T.R., 1986, *Cell*, 47: 207-216
 30 Delenkiy et al., 2000, *BBA*, 1467: 207-218
 Bell R.M., Coleman R.A., 1980, *Annu. Rev. Biochem.*, 49: 459-487
 Bennett et al., 1995, *J. Mol. Recognit.*, 8: 52-58

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- Berthou et al., 1995, *Eur. J. Biochem.*, 232: 179-187
- Binstock J.F. and Schulz H., 1981, *Meth. Enzymol.*, 71: 403-411
- Borges et al., 1998, *J. Enzyme Inhib.*, 13: 473-483
- Bortoff et al., 1997, *Endocrine*, 7: 199-207
- 5 Breslow et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 6861-6865
- Cameron et al., 1993, *Br. J. Pharmacol.*, 109: 972-979
- Cameron et al., 1999, *Structure Fold. Des.* 7: 1067-1078
- Carillo H. and Lipman D., 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073
- Caskey C.T., 1987, *Science*, 236:1223-1229
- 10 Catanese J.J. and Kress L.F., 1992, *Biochemistry*, 31: 410-418
- Chin et al., 1995, *Am. J. Physiol.*, 269: E691-E700
- Chong B.S. & Mersfelder T.J., 2000, *Ann Pharmacother.*, 34: 1056-1065
- Church et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 1991-1995
- Clarke et al., 1990, *J. Nutr.*, 120: 218-224
- 15 Clarke et al., 1990, *J. Nutr.*, 120: 225-231
- Connolly B. A., 1987, *Nucl. Acid Res.*, 15: 3131-3139
- Contamine V. and Pichard M., 2000, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 281-315
- Copsey et al., 1988, *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs*, Stockton Press, New York
- Cotter et al., 1995, *Diabetic Neuropathy: New Concepts and Insights*, Elsevier Science B.V.,
- 20 Amsterdam, pp. 115-120
- Cotton et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 4397-4401
- Cserzo et al., 1997, *Prot. Eng.*, 10: 673-676
- Cunningham et al., 1997, *Endocrinology*, 138: 5184-5188
- Cunningham et al., 1998, *Thyroid*, 8: 815-825
- 25 Dao et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 2860-2864
- Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, NY, NY
- Deutcher, M., ed., 1990, *Guide to Protein Purification. Meth. in Enzymol.*, 182
- Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid Res.*, 12(1): 387-395
- Diamond et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 15185-15192
- 30 Dines et al., 1993, *Diabetologia*, 36:1132-1138
- Dines et al., 1996, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 55: 159-165
- Erickson et al., 1992, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 27: 271-289
- Ericsson et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 7298-7305

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- Evans et al., 1996, *Nat. Biotech.* 14: 504-507
- Fields S. and Song O., 1989, *Nature*, 340: 245-246
- Flavell et al., 1978, *Cell*, 15: 25-41
- Foreiz et al., 1999, *Biochem. J.*, 34: 371-376
- 5 Furuyama K. and Sassa S., 2000, *J. Clin. Invest.*, 105: 757-764
- Ganesh et al., 1999, *Bioche. Biophys. Acta*, 1439: 415-423
- Geever et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 5081-5085
- Goding J.W., 1996, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology*, 3rd edition, Academic Press, NY
- 10 Graf et al., 1993, *Yeast*, 9: 301-305
- Gribkov M. and Devereux J., eds., 1991, *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, NY
- Griffin A.M. and Griffin H.G., eds., 1994, *Computer Analysis of Sequence Data, Part 1*, Humana Press, NJ
- 15 Grillasca et al., 1997, *FEBS Lett.*, 401: 38-42
- Guldberg and Marsden, 1975, *Pharmacol. Rev.*, 27: 135-306
- Gurvitz et al., 1999, *Biochem. J.*, 344: 903-914
- Gyuris et al., 1993, *Cell*, 75: 791-803
- Haber et al., 1993, *Hepatology*, 22: 906-914
- 20 Haddad et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261:13268-13277
- Hamy et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 3548-3553
- Hanahan et al., 1983, *J. Mol. Biol.*, 166: 557-580
- Harlow E. and Lane D.(eds.), 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Haseloff J. and Gerlach W.L., 1988, *Nature*, 334: 585-591
- 25 Hassan et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 8883-8888
- Henrik et al., 1997, *Prot. Eng.*, 10: 1-6
- Hinnen et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 1929-1933
- Honma et al., 1999, *Molecular Brain Research*, 69: 93-103
- Hotrobin D.I., 1990, *Pathophysiology and Roles in Clinical Medicine*, Wiley-Liss, NY
- 30 Houbenweyl et al., 1987, *Methods of Organic Chemistry*, Wansch E. (ed), Vol. 15 I and II, Thieme, Germany
- Hsu et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, 271: 13584-13592
- Huse et al., 1989, *Science*, 246: 1275-1281

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- Hwang et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 12997-13002
- Innis M.A. and Gelfand D.H., 1989, *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Innis M.A., Gelfand D.H., Shinsky J.J. and White T.J. (eds), Academic Press, NY, pp. 3-12
- Ishiooka et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 2363-2367
- 5 Izant J.G. and Weintraub H., 1984, *Cell*, 36:1007-1015
- Janssen et al., 1994, *Genomics*, 23: 223-228
- Jayakumar et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 8695-8699
- Jayakumar et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 14509-14514
- Jenkins et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 1416-1421
- 10 Johanson et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 9459-9471
- Jorga et al., 2000, *Clin Pharmacol Ther.*, 67: 610-620
- Joyeux et al., 1990, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70: 1438-1444
- Jump et al., 1990, *Mol. Endocrinol.*, 4: 1655-1660
- Jump et al., 1994, *J. Lipid Res.*, 35: 1076-1084
- 15 Karlin et al., 1976, *J. Lipid Res.*, 17: 30-37
- Kastner et al., 1994, *Neuroscience*, 62: 449-457
- Kim et al., 2000, *J. Lipid Res.*, 41: 1310-1316
- Kinlaw et al., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264: 19779-19783
- Kinlaw et al., 1993, *Endocrinology*, 133: 645-650
- 20 Kletzien et al., 1994, *FASEB J.*, 8: 174-181
- Kohler G. and Milstein C., 1975, *Nature*, 256: 495-497
- Kraemer et al., 1993, *J. Lipid Res.*, 34: 663-671
- Kuhajda et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 6379-6389
- Landegren et al., 1988, *Science*, 241: 1077-1080
- 25 Landegren et al., 1989, *Science*, 242: 229-237
- Lautala et al., 1999, *J. Chromatogr. B*, 736: 143-151
- Lesk A.M., ed., 1988, *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, NY
- Li et al., 1994, *Int. J. Cancer*, 57: 348-352
- Li M. and Pritchard P.H., 2000, *J. Biol. Chem.*, 275: 18079-18084
- 30 Liang P. and Pardee A.B., 1992, *Science*, 257: 967-971
- Liaw C.W. and Towle H.C., 1984, *J. Biol. Chem.*, 259: 7253-7260
- Liu H.C. and Towle H.C., 1994, *Mol. Endocrinol.*, 8: 1021-1037
- Llewellyn et al., 1987, *J. Mol. Biol.*, 195: 115-123

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- Lundstrom et al., 1991, *DNA Cell Biol.*, 10: 181-189
- Lundstrom et al., 1992, *Biochim. Biophys. Acta*, 1129: 149-154
- Lupas et al., 1991, *Science*, 252: 1162-1164
- Mack B.W., 1990, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pa.,
 5 13th edition
- Madsen et al., 1998, *J. Lipid Research*, 39: 583-593
- Margolskee et al., 1988, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2837-2847
- Marzetta G. and Domah B.D.(eds.), 2000, *Herbs, Botanicals and Teas*, Technomic Publishers,
 Lancaster, PA
- 10 McLaughlin et al., 1988, *J. Virol.*, 62: 1963-1973
- Mei et al., 1998, *Biochemistry*, 37: 14204-14212
- Merrifield, 1964, *J. Am. Chem. Assoc.*, 85: 2149-2154
- Miyazaki et al., 2000, *J. Biol. Chem.*, 275: 30132-30138
- Monour et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 6989-6994
- 15 Moore et al., 1986, *Carcinogenesis*, 7: 1419-1424
- Moss et al., 1987, *Annu. Rev. Immunol.*, 5: 305-324
- Müller-Newton G. and Stoffel W., 1991, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 372: 613-624
- Myers et al., 1985, *Science*, 230: 1242-1246
- Myers et al., 1986, *Cold Spring Harbour Sym. Quant. Biol.*, 51: 275-284
- 20 Nagase et al., 2000, *DNA Res.*, 7: 273-281
- Nakashima et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 9567-9572
- Nord et al., 1997, *Nat. Biotechnol.*, 15: 772-777
- Ntambi et al., 1999, *J. Lipid Res.*, 40: 1549-1558
- Okano et al., 1988, *EMBO J.*, 7: 3407-3412
- 25 Orkin et al., 1988, *Prog. Med. Genet.*, 7: 130-142
- Palosaari P.M. and Hiltunen J.K., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265: 2446-2449
- Peng et al., 1997, *Genomics*, 43: 278-284
- Phillippe et al., 1994, *Eur. J. Biochem.*, 226: 377-384
- Qi et al., 1994, *Toxicol.*, 32: 1459-1469
- 30 Qi et al., 1995, *Toxicol.*, 33: 241-245
- Rasmussen et al., 1987, *Meth. Enzymol.*, 139: 642-654
- Roe et al., 1990, *J. Clin. Invest.*, 85: 1703-1707
- Rosenberg et al., 1985, *Nature*, 313: 703-706

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- Saggerson E.D. and Carpenter C.A., 1987, *Biochem. J.*, 243: 289-292
- Saiki et al., 1985, *Science*, 230:1350-1353
- Saiki, et al., 1986, *Nature*, 324:163-166
- Salminen et al., 1990, *Gene*, 93: 241-247
- 5 Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, 2nd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
- Semenkovich C.F., 1997, *Prog. Lipid Res.*, 36: 43-53
- Shin et al., 1991, *J. Biol. Chem.*, 266: 23834-23839
- Smith D.W., ed., 1993, *Biocomputing: Informatics and Genome Project*, Academic Press, NY
- 10 Sorci-Thomas et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275: 12156-12163
- Soutar et al., 1975, *Biochemistry*, 14: 3057-3064
- Strivastava et al., 2000, *Eur. J. Biochem.*, 267: 4272-4280
- Tavieux et al., 1997, *Cytogenet. Cell Genet.*, 76: 219-220
- Tenhunen et al., 1994, *Eur. J. Biochem.*, 223: 1049-1059
- 15 Tenhunen J., 1996, *DNA Cell Biol.*, 15: 461-473
- Thiede et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261: 1323-1325
- Thomas et al., 1991, *EMBO J.*, 10: 547-553
- Tilgmann C. and Kalkkinen N., 1990, *FEBS Lett.*, 264: 95-99
- Tilgmann C. and Ullmann I., 1996, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 684: 147-461
- 20 Tomlinson et al., 1998, *J. Nutr.*, 118: 408-415
- Ulmakov et al., 1997, *Science*, 276: 1865-1868
- Ursini et al., 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 170: 1203-1209
- Vieira-Coelho M. and Soares-da-Silva P., 1999, *Brain Res.*, 821: 69-78
- von Heijne G., 1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, NY
- 25 Wakil, 1989, *Biochemistry*, 28: 4523-4530
- Waldmann T. A., 1991, *Science*, 252: 1657-1661
- Wallace et al., 1986, *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, 51: 257-261
- Wanders et al., 1992, *J. Inherit. Metab. Dis.*, 15: 643-644
- Waters K.M. and Nambi J.M., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 27773-27777
- 30 Wei et al., 2000, *Ann. Neurol.*, 47: 286-296
- Wilentz et al., 2000, *Pediatr. Dev. Pathol.*, 3: 525-531
- Xie et al., 1999, *Mol. Pharmacol.*, 56: 31-38
- Yct et al., 1993, *Biochemistry*, 32: 9486-9491

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Yoshida et al., 1999, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 45: 411-421

Zaug A.J. and Cech T.R., 1986, *Science*, 231: 470-475

Zaug et al., 1984, *Science*, 224: 574-578

Zaug et al., 1986, *Nature*, 324: 429-433

5 Zhang et al., 1999, *Biochem. J.*, 340: 252-264

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

CLAIMS

We claim:

- 5 1. An isolated polynucleotide segment, comprising a polynucleotide sequence which is selected from the group consisting of:
 - (a) a sequence comprising SEQ ID NO:1;
 - (b) a sequence comprising SEQ ID NO:3;
 - (c) a sequence comprising SEQ ID NO:6;
 - 10 (d) a sequence comprising SEQ ID NO:11;
 - (e) a sequence comprising SEQ ID NO:13;
 - (f) a sequence comprising SEQ ID NO:16;
 - (g) a sequence comprising SEQ ID NO:18;
 - (h) a sequence comprising SEQ ID NO: 24;
 - 15 (i) a sequence which is at least 80% homologous with a sequence of any of (a) to (h);
 - (j) a sequence which is at least 90% homologous with a sequence of any of (a) to (h);
 - (k) a sequence which is at least 95% homologous with a sequence of any of (a) to (h);
 - (l) a sequence which is at least 98% homologous with a sequence of any of (a) to (h);
 - (m) a sequence which is at least 99% homologous with a sequence of any of (a) to (h);
 - 20 (n) a sequence which hybridizes to any of (a) to (m) under stringent conditions; and,
 - (o) a sequence which is a functional derivative of any of (a) to (m).
2. An isolated polynucleotide segment of claim 1, wherein the isolated polynucleotide segment is cDNA.
- 25 3. A vector comprising a polynucleotide segment of claim 1 in a suitable vector.
4. A host cell comprising a polynucleotide segment of claim 1 in a host cell which is heterologous to said segment.
- 30 5. An isolated polynucleotide fragment selected from the group consisting of:
 - (a) a sequence having at least 15 sequential bases of nucleotides of a segment of claim 1;

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- (b) a sequence having at least 30 sequential bases of nucleotides of a segment of claim 1; and,
 (c) a sequence having at least 50 sequential bases of nucleotides of a segment of claim 1.
6. A vector comprising a polynucleotide segment of claim 5 contained in a vector which is
 5 heterologous to said segment.
7. A vector of claims 3 or 6, wherein said vector contains or encodes a tag.
8. An isolated polynucleotide segment, comprising a polynucleotide sequence which retains
 10 substantially the same biological function or activity as the polynucleotide encoded by a segment
 of claim 1.
9. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a
 polynucleotide segment of claim 1, comprising the steps of:
 15 (a) selecting a control animal having said segment and a test animal having said segment;
 (b) treating said test animal using a compound; and,
 (c) determining the relative quantity of an expression product of said segment, as between said
 control animal and said test animal.
- 20 10. A method of claim 9, wherein said animals are mammals.
11. A method of claim 10, wherein said mammals are rats.
12. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a
 25 polynucleotide segment of claim 1, comprising the steps of:
 (a) selecting a host cell of claim 4;
 (b) cloning said host cell and separating said clones into a test group and a control group;
 (c) treating said test group using a compound; and
 (d) determining the relative quantity of an expression product of said segment, as between said
 30 test group and said control group.
13. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a
 polynucleotide segment of claim 1, comprising the steps of:

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- (a) selecting a test group having a host cell of claim 4, a part thereof or an isolated polynucleotide thereof, and a control group;
- (b) treating said test group using a compound; and
- (c) determining the relative quantity or relative activity of a product of said segment or of the said segment, as between said test group and said control group.
14. An isolated polypeptide segment comprising an isolated polypeptide selected from the group consisting of:
- (a) a sequence comprising SEQ ID NO:2;
- (b) a sequence comprising SEQ ID NO:4;
- (c) a sequence comprising SEQ ID NO:7;
- (d) a sequence comprising SEQ ID NO:12;
- (e) a sequence comprising SEQ ID NO:14;
- (f) a sequence comprising SEQ ID NO:17;
- (g) a sequence comprising SEQ ID NO: 25;
- (h) a sequence which is at least 80% homologous with a sequence of any of (a) to (g);
- (i) a sequence which is at least 90% homologous with a sequence of any of (a) to (g);
- (j) a sequence which is at least 95% homologous with a sequence of any of (a) to (g);
- (k) a sequence which is at least 98% homologous with a sequence of any of (a) to (g); and,
- (l) a sequence which is at least 99% homologous with a sequence of any of (a) to (g).
15. A host cell comprising a polypeptide segment of claim 14 in a host cell which is heterologous to said segment.
16. A process for producing a polypeptide of a segment of claim 14 comprising the step of culturing the host cell of claim 15 under conditions sufficient for the production of said polypeptide.
17. An isolated polypeptide segment, comprising a polypeptide sequence which retains substantially the same biological function or activity as the polypeptide in a segment of claim 14.
18. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polypeptide segment of claim 14, comprising the steps of:
- (a) selecting a control animal having said segment and a test animal having said segment;

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- (b) treating said test animal using a compound;
 (c) determining the relative quantity or relative activity of an expression product of said segment or of the said segment, as between said control animal and said test animal.
- 5 19. A method of claim 18, wherein said animals are mammals.
20. A method of claim 19, wherein said mammals are rats.
21. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a
 10 polypeptide segment of claim 14, comprising the steps of:
 (a) selecting a host cell of claim 15;
 (b) cloning said host cell and separating said clones into a test group and a control group;
 (c) treating said test group using a compound; and
 (d) determining the relative quantity or relative activity of an expression product of said segment
 15 or of the said segment, as between said test group and said control group.
22. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a
 polypeptide segment of claim 14, comprising the steps of:
 (a) selecting a test group having a host cell of claim 15, a part thereof or an isolated polypeptide
 20 thereof and a control group;
 (b) treating said test group using a compound; and
 (c) determining the relative quantity or relative activity of a product of said segment or of the said
 segment, as between said test group and said control group.
- 25 23. An isolated polynucleotide segment, comprising a polynucleotide sequence which is
 selected from the group consisting of:
 (a) a sequence comprising SEQ ID NO:5;
 (b) a sequence comprising SEQ ID NO:10;
 (c) a sequence comprising SEQ ID NO:15;
 30 (d) a sequence comprising SEQ ID NO:20;
 (e) a sequence comprising SEQ ID NO:21;
 (f) a sequence comprising SEQ ID NO:26;
 (g) a sequence which is at least 80% homologous with a sequence of any of (a) to (f);

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- (h) a sequence which is at least 90% homologous with a sequence of any of (a) to (f);
(i) a sequence which is at least 95% homologous with a sequence of any of (a) to (f);
(j) a sequence which is at least 98% homologous with a sequence of any of (a) to (f);
(k) a sequence which is at least 99% homologous with a sequence of any of (a) to (f);
5 and;
(l) a sequence which hybridizes to any of (a) to (k) under stringent conditions.
24. An isolated polynucleotide segment of claim 23, wherein the isolated polynucleotide segment is genomic DNA.
- 10 25. A vector comprising a polynucleotide segment of claim 23 in a suitable vector.
26. A host cell comprising a polynucleotide segment of claim 23 in a host cell which is heterologous to said segment.
- 15 27. A process for producing a polypeptide encoded by a gene operably linked to a polynucleotide segment of claim 23 comprising the step of culturing the host cell of claim 26 under conditions sufficient for the production of said polypeptide.
- 20 28. An isolated polynucleotide fragment selected from the group consisting of:
(a) a sequence having at least 15 sequential bases of nucleotides of a segment of claim 23;
(b) a sequence having at least 30 sequential bases of nucleotides of a segment of claim 23; and
(c) a sequence having at least 50 sequential bases of nucleotides of a segment of claim 23.
- 25 29. A vector comprising a polynucleotide segment of claim 28 contained in a vector which is heterologous to said segment.
30. An isolated polynucleotide segment, comprising a polynucleotide sequence which retains substantially the same biological function or activity as the polynucleotide encoded by a segment
30 of claim 23.
31. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polynucleotide segment of claim 23, comprising the steps of:

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- (a) selecting a control animal having said segment and a test animal having said segment;
- (b) treating said test animal using a compound; and,
- (c) determining the relative quantity of an expression product of an operably linked polynucleotide to said segment, as between said control animal and said test animal.

5

32. A method of claim 31, wherein said animals are mammals.

33. A method of claim 32, wherein said mammals are rats.

10 34. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polynucleotide segment of claim 23, comprising the steps of:

- (a) selecting a host cell of claim 26;
- (b) cloning said host cell and separating said clones into a test group and a control group;
- (c) treating said test group using a compound; and

15 (d) determining the relative quantity of an expression product of an operably linked polynucleotide to said segment, as between said test group and said control group.

35. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polynucleotide segment of claim 23, comprising the steps of:

20 (a) selecting a test group having a host cell of claim 26, a part thereof or an isolated polynucleotide thereof and a control group;

(b) treating said test group using a compound; and

(c) determining the relative quantity of an expression product of an operably linked polynucleotide to said segment, as between said test group and said control group.

25

36. A composition for treating a disorder involving fatty acid regulated genes, said composition comprising a compound which modulates a segment according to any one of claims 1, 14 or 23 and a pharmaceutically acceptable carrier.

30 37. A composition as claimed in claim 36 wherein said disorder is a PUFA disorder.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

38. A composition as claimed in claim 37, wherein said disorder is selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.
- 5 39. A composition as claimed in claim 36, wherein said composition is selected from the group consisting of small organic molecules, peptides, polypeptides, antisense molecules, oligonucleotides, polynucleotides, fatty acids, and functional and chemical derivatives thereof.
- 10 40. The use of a composition as claimed in claim 36 for treating a disorder involving fatty acid regulated genes.
41. The use of a composition as claimed in claim 40 for treating a PUFA disorder.
- 15 42. The use of claim 41 wherein said disorder is selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.
- 20 43. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder involving fatty acid regulated genes in a subject, said method comprising detecting a germline alteration in a segment of claims 1 or 23 in said subject, comprising comparing the germline sequence of a segment of claims 1 or 23 from a tissue sample from said subject with the germline sequence of a wild-type of said segment, wherein an alteration in the germline sequence of said subject indicates the presence of or a predisposition to said disorder.
- 25 44. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder as claimed in claim 43 wherein said disorder is a PUFA disorder.
- 30 45. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder as claimed in claim 44 wherein said disorder is selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

46. The method of any one of claims 43 to 45, wherein said comparing is performed by a method selected from the group consisting of immunoblotting, immunocytochemistry, enzyme-linked immunosorbent assay, DNA fingerprinting, in situ hybridization, polymerase chain reaction, reverse transcription polymerase chain reaction, radioimmunoassay, immunoradiometric assay and immunoenzymatic assay.

47. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder involving fatty regulated genes in a subject, said method comprising comparing the sequence of a polypeptide of claim 14 from a tissue sample from said subject with the sequence of a wild-type of said polypeptide wherein an alteration in the sequence of said subject as compared to said wild-type indicates the presence of or a predisposition to said disorder involving genes altered by fatty acids.

48. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder as claimed in claim 47 wherein said disorder is a PUFA disorder.

49. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder as claim in claim 48 wherein said disorder is selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.

50. The method of any one of claims 47 to 49, wherein said comparing is performed by a method selected from the group consisting of blotting, immunocytochemistry, enzyme-linked immunosorbent assay, DNA fingerprinting, radioimmunoassay, immunoradiometric assay, immunoenzymatic assay and polypeptide microarrays.

51. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polynucleotide, wherein the polynucleotide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyle-CoA isomerase, comprising the steps of:

- (a) selecting a control animal having said polynucleotide and a test animal having said polynucleotide;
- (b) treating said test animal using a compound; and,

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

(c) determining the relative quantity of an expression product of said polynucleotide, as between said control animal and said test animal.

52. A method of claim 51, wherein said animals are mammals.

5

53. A method of claim 52, wherein said mammals are rats.

54. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polynucleotide, wherein the polynucleotide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of:

10

(a) selecting a host cell comprising said polynucleotide wherein such host cell is heterologous to said polynucleotide;

(b) cloning said host cell and separating said clones into a test group and a control group;

15

(c) treating said test group using a compound; and

(d) determining the relative quantity of an expression product of said polynucleotide, as between said test group and said control group.

55. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polynucleotide, wherein the polynucleotide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of:

20

(a) selecting a test group having a host cell comprising said polynucleotide wherein such host cell is heterologous to said polynucleotide, a part thereof or an isolated polynucleotide thereof, and a

25

control group;

(b) treating said test group using a compound; and

(c) determining the relative quantity or relative activity of a product of said polynucleotide or of the said polynucleotide, as between said test group and said control group.

30

56. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polypeptide, wherein the polypeptide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, A1BG, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of:

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- (a) selecting a control animal having said polypeptide and a test animal having said polypeptide;
 (b) treating said test animal using a compound;
 (c) determining the relative quantity or relative activity of an expression product of said polypeptide or of the said polypeptide, as between said control animal and said test animal.
57. A method of claim 56, wherein said animals are mammals.
58. A method of claim 57, wherein said mammals are rats.
59. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polypeptide, wherein the polypeptide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, A1BG, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of:
 (a) selecting a host cell comprising said polypeptide wherein such host cell is heterologous to said polypeptide;
 (b) cloning said host cell and separating said clones into a test group and a control group;
 (c) treating said test group using a compound; and
 (d) determining the relative quantity or relative activity of an expression product of said polypeptide or of the said polypeptide, as between said test group and said control group.
60. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a polypeptide, selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, A1BG, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of:
 (a) selecting a test group having a host cell comprising said polypeptide wherein such host cell is heterologous to said polypeptide, a part thereof or an isolated polypeptide thereof and a control group;
 (b) treating said test group using a compound; and
 (c) determining the relative quantity or relative activity of a product of said polypeptide or of the said polypeptide, as between said test group and said control group.
61. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a human polynucleotide, wherein the human polynucleotide is a control region of a gene selected from the

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- group consisting of G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of:
- (a) selecting a control animal having said human polynucleotide and a test animal having said human polynucleotide;
- 5 (b) treating said test animal using a compound; and,
- (c) determining the relative quantity of an expression product of an operably linked polynucleotide to said human polynucleotide, as between said control animal and said test animal.
62. A method of claim 61, wherein said animals are mammals.
- 10 63. A method of claim 62, wherein said mammals are rats.
64. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a human polynucleotide, wherein the human polynucleotide is a control region of a gene selected from the
- 15 group consisting of G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of:
- (a) selecting a host cell comprising said human polynucleotide wherein such host cell is heterologous to said polynucleotide;
- (b) cloning said host cell and separating said clones into a test group and a control group;
- 20 (c) treating said test group using a compound; and
- (d) determining the relative quantity of an expression product of an operably linked polynucleotide to said human polynucleotide, as between said test group and said control group.
65. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of a human
- 25 polynucleotide, wherein the human polynucleotide is a control region of a gene selected from the group consisting of G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of:
- (a) selecting a test group having a host cell comprising said human polynucleotide wherein such host cell is heterologous to said polynucleotide, a part thereof or an isolated polynucleotide
- 30 thereof and a control group;
- (b) treating said test group using a compound; and
- (c) determining the relative quantity of an expression product of an operably linked polynucleotide to said human polynucleotide, as between said test group and said control group.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

66. A composition for treating a disorder involving fatty acid regulated genes, said composition comprising a compound which modulates a polynucleotide from the coding sequence selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, 5 INSIG1, GLOL, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase and a pharmaceutically acceptable carrier.
67. A composition for treating a fatty acid disorder comprising a compound which modulates a polypeptide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, 10 COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, AIBG, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase and a pharmaceutically acceptable carrier.
68. A composition for treating a fatty acid disorder comprising a compound which modulates a control region selected from the group consisting of G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, 15 Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase and a pharmaceutically acceptable carrier.
69. A composition as claimed in any one of claims 66 to 68 wherein said disorder is a PUFA disorder.
- 20 70. A composition as claimed in claim 69, wherein said disorder is selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.
71. A composition as claimed in any one of claims 66 to 68, wherein said compound is 25 selected from the group consisting of small organic molecules, peptides, polypeptides, antisense molecules, oligonucleotides, polynucleotides, fatty acids, and functional and chemical derivatives thereof.
72. The use of a composition as claimed any one of claims 66 to 68 for treating a fatty acid 30 disorder.
73. The use of a composition as claimed in claim 72 for treating a PUFA disorder.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

74. The use of claim 73 wherein said disorder is selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.

5 75. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder involving fatty acid regulated genes in a subject, said method comprising detecting a germline alteration in a polynucleotide representing the coding sequence selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase in said subject, comprising comparing the germline sequence of said polynucleotide from a
10 tissue sample from said subject with the germline sequence of a wild-type of said polynucleotide, wherein an alteration in the germline sequence of said subject indicates the presence of or a predisposition to said disorder.

76. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder involving fatty acid regulated genes in a subject, said method comprising detecting a germline alteration in a human polynucleotide representing the control region selected from the group consisting of G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase in said subject, comprising comparing the germline sequence of said human polynucleotide from a tissue sample from
15 said subject with the germline sequence of a wild-type of said human polynucleotide, wherein an alteration in the germline sequence of said subject indicates the presence of or a predisposition to said disorder.

77. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder as claimed in claims 75 or 76 wherein said disorder is a PUFA disorder.

25 78. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder as claimed in claim 77 wherein said disorder is selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.

30 79. The method of any one of claims 75 to 78, wherein said comparing is performed by a method selected from the group consisting of immunoblotting, immunocytochemistry, enzyme-linked immunosorbent assay, DNA fingerprinting, in situ hybridization, polymerase chain

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

reaction, reverse transcription polymerase chain reaction, radioimmunoassay, immunoradiometric assay and immunoenzymatic assay.

80. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder involving fatty acid regulated genes in a subject, said method comprising comparing the sequence of a polypeptide selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, GLOL, A1BG, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoil-CoA isomerase from a tissue sample from said subject with the sequence of a wild-type of said polypeptide, wherein an alteration in the sequence of said subject as compared to said wild-type indicates the presence of or a predisposition to said disorder involving genes altered by fatty acids.
81. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder as claimed in claim 80 wherein said disorder is a PUFA disorder.
82. A method for diagnosing the presence of or a predisposition for a disorder as claimed in claim 81 wherein said disorder is selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.
83. The method of any one of claims 80 to 82, wherein said comparing is performed by a method selected from the group consisting of immunoblotting, immunocytochemistry, enzyme-linked immunosorbent assay, DNA fingerprinting, radioimmunoassay, immunoradiometric assay, immunoenzymatic assay and polypeptide microarrays.
84. A method for identifying a compound which inhibits or promotes a disorder involving fatty acid regulated genes, said method comprising the steps of:
- (a) selecting a control animal and a test animal both having a gene selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, FTF1, GLOL, A1BG, Spot-14, delta-3, delta-2-enoil-CoA isomerase, and METP or a control region sequence thereof;
 - (b) treating said test animal using a compound; and,
 - (c) determining the relative quantity of an expression product of said gene, as between said control animal and said test animal.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

85. A method of claim 84, wherein said animals are mammals.
86. A method of claim 85, wherein said mammals are rats.
- 5 87. A method of any one of claims 84 to 86, wherein said disorder is a PUFA disorder.
88. A method of claim 87, wherein said disorder is selected from a group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders,
- 10 cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.
89. A method for identifying a compound which inhibits or promotes a disorder involving fatty acid regulated genes, said method comprising the steps of:
- (a) selecting a host cell containing a gene selected from the group consisting of SCD1, SCD2,
- 15 SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, FTF1, GLOL, A1GB, Spot-14, delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, and METP or a control region sequence thereof;
- (b) cloning said host cell and separating said clones into a test group and a control group;
- (c) treating said test group using a compound; and,
- (d) determining the relative quantity of an expression product of said gene, as between said test
- 20 group and said control group.
90. A method of claim 89, wherein said disorder is a PUFA disorder.
91. A method of claim 90, wherein said disorder is selected from a group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders,
- 25 cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.
92. A method for detecting the presence of or the predisposition for a disorder involving fatty acid regulated genes, said method comprising determining the level of expression of an
- 30 expression product of a gene selected from a polynucleotide segment of claim 1 in a subject relative to a predetermined control level of expression, wherein a modified expression of said expression product as compared to said control is indicative of the presence of or the predisposition for a disorder involving genes altered by fatty acids.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

93. A method for detecting the presence of or the predisposition for a disorder involving genes altered by fatty acids, said method comprising determining the level of expression of an expression product of a gene selected from the group consisting of SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14, delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, FTF1, GLOL, ALBG and METP, in a subject relative to a predetermined control level of expression, wherein a modified expression of said expression product as compared to said control is indicative of the presence of or the predisposition for a disorder involving genes altered by fatty acids.
94. A method of claims 92 or 93, wherein said disorder is a PUFA disorder.
95. A method of claim 94, wherein said disorder is selected from a group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.
96. A method of any one of claims 92 to 95 wherein said method is selected from the group consisting of immunoblotting, immunocytochemistry, enzyme-linked immunosorbent assay, in situ hybridization, reverse transcription polymerase chain reaction, radioimmunoassay, immunoradiometric assay, immunoenzymatic assay and polynucleotide and polypeptide microarrays.
97. An antibody immunoreactive with a polypeptide of claim 14 or an immunogenic portion thereof.
98. An antibody immunoreactive with a polypeptide selected from the group consisting of FTF1, GLOL and METP or an immunogenic portion thereof.
99. A method for screening a medium for a polypeptide of claim 14 or selected from the group consisting of FTF1, GLOL and METP, comprising:
 (a) labelling an antibody of claims 97 or 98 with a marker molecule to form a conjugate;
 (b) exposing said conjugate to said medium; and

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

(c) determining whether there is binding between said conjugate and a biomolecule in said medium, wherein said binding indicates the presence of said polypeptide.

100. A method for screening a medium for a polypeptide of claim 14 or selected from the group consisting of FTF1, GLOL and METP, comprising:

- (a) exposing an antibody of claims 97 or 98 to said medium;
- (b) exposing said antibody to a marker molecule; and
- (c) determining whether there is binding between said marker molecule and a biomolecule in said medium, wherein said binding indicates the presence of said polypeptide.

10

101. A composition as claimed in claim 36, wherein said compound comprises an antibody of claims 97 or 98.

102. A composition as claimed in any one of claims 66 to 68, wherein said composition is selected from the group consisting of antibodies against SCD1, SCD2, SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-I, INSIG1, A1GB, Spot-14, and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase.

15

103. The use of a composition as claimed in claims 101 or 102 for treating a disorder involving genes altered by fatty acids.

20

104. The use as claimed in claim 103, wherein said disorder is a PUFA disorder.

105. The use of claim 104 wherein said disorder is selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.

25

106. A method for identifying genes or proteins regulated by fat, comprising:

- (a) selecting a species of animals and separating them into a test group and a control group;
- (b) feeding said test group and said control group a fat free diet for a period of time;
- (c) subsequently providing said test group enterally or parenterally with highly purified polyunsaturated fatty acids for a second period of time;
- (d) subsequently removing tissues from said control group and said test group;

30

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

(e) comparing RNA from said tissues of said control group with tissues from said test group and selecting RNA which is expressed at a different level as between said test group and said control group; and
 (f) determining the genes or proteins associated with said selected RNA.

- 5 107. A method as claimed in claim 106, wherein said animals are rats.
108. A method as claimed in claim 106 wherein said period of time is at least 2 weeks.
- 10 109. A method as claimed in claim 106 wherein said second period of time is at least 2 weeks.
110. A method as claimed in claim 106 wherein said comparing is by differential display and Northern blotting.
- 15 111. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of two or more human polynucleotides, wherein the human polynucleotides are control regions of genes selected from the group consisting of METP, GLOL, FTF1, A1BG, SCD, GPAT, G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, said method comprising the steps of:
- 20 (a) selecting two or more host cells comprising said human polynucleotides wherein such host cells are heterologous to said polynucleotides;
- (b) cloning said host cells and separating said clones into a test group and a control group;
- (c) treating said test group using a compound; and
- (d) determining the relative quantities of expression products of operably linked polynucleotides
- 25 to said human polynucleotides, as between said test group and said control group.
112. A method for identifying a compound which inhibits or promotes the activity of two or more human polynucleotides, wherein the human polynucleotides are control regions of genes selected from the group consisting of METP, GLOL, FTF1, A1BG, SCD, GPAT, G6PD, FAS,
- 30 COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, comprising the steps of:

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

- (a) selecting a test group having two or more host cells containing said human polynucleotides wherein such host cells are heterologous to said polynucleotides, parts thereof or isolated polynucleotides thereof and a control group;
- (b) treating said test group using a compound; and
- 5 (c) determining the relative quantities of expression products of operably linked polynucleotides to said human polynucleotides, as between said test group and said control group.
113. A composition for treating a disorder involving fatty acid regulated genes comprising a compound which modulates two or more human polynucleotide control regions of genes selected
- 10 from the group consisting of METP, GLOL, FTF1, A1BG, SCD, GPAT, G6PD, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14 and delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase and a pharmaceutically acceptable carrier.
114. A composition as claimed in claim 113 wherein said disorder is a PUFA disorder.
- 15 115. A composition as claimed in claim 114, wherein said disorder is selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.
- 20 116. A composition as claimed in any one of claims 113 to 115, wherein said compound is selected from the group consisting of small organic molecules, peptides, polypeptides, antisense molecules, oligonucleotides, polynucleotides, fatty acids, and functional and chemical derivatives thereof.
- 25 117. The use of a composition as claimed in claims 113 for treating a disorder involving genes altered by fatty acids.
118. The use of a composition as claimed in claim 117 for treating a PUFA disorder.
- 30 119. The use of claim 118 wherein said disorder is selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

120. A method for detecting the presence of or the predisposition for a disorder involving genes altered by fatty acids, said method comprising determining the level of expression of two or more expression products of genes selected from the group consisting of human SCD, G6PD, GPAT, FAS, COMT, ApoA-1, INSIG1, Spot-14, delta-3, delta-2-enoyl-CoA isomerase, FTF1, GLOL, AIBG and METP, in a subject relative to a predetermined control level of expression, wherein any modified expression of said expression products as compared to said control indicates the presence of or the predisposition for a disorder involving genes altered by fatty acids.
- 10 121. A method of claim 120, wherein said disorder is a PUFA disorder.
122. A method of claim 121, wherein said disorder is selected from a group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.
- 15 123. A method of any one of claims 120 to 122 wherein said method is selected from the group consisting of immunoblotting, immunocytochemistry, enzyme-linked immunosorbent assay, in situ hybridization, reverse transcription polymerase chain reaction, radioimmunoassay, immunoradiometric assay, immunoenzymatic assay and polynucleotide and polypeptide
- 20 microarrays.
124. A compound identified by the methods of any one of claims 9 to 13, 18 to 22, 31 to 35, 51 to 65, 84 to 91 or 111 to 112.
- 25 125. The use of a compound as claimed in claim 124 for treating a disorder involving fatty acid regulated genes.
126. The use of a compound as claimed in claim 125 wherein said disorder is a PUFA disorder.
- 30 127. The use of claim 126 wherein said disorder is selected from the group consisting of eczema, cardiovascular disorders, inflammation, body weight disorders, psychiatric disorders, cancer, cystic fibrosis, pre-menstrual syndrome, diabetes and diabetic complications.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

128. The composition as claimed in any one of claims 38, 70 and 115, wherein the cardiovascular disorder is selected from the group consisting of hypertriglyceridemia, dyslipidemia, atherosclerosis, coronary artery disease, cerebrovascular disease and peripheral vascular disease.

5

129. The use as claimed in any one of claims 42, 74, 119, and 127, wherein the cardiovascular disorder is selected from the group consisting of hypertriglyceridemia, dyslipidemia, atherosclerosis, coronary artery disease, cerebrovascular disease and peripheral vascular disease.

10 130. The method as claimed in any one of claims 45, 49, 78, 81, 91, 95, 105 and 122, wherein the cardiovascular disorder is selected from the group consisting of hypertriglyceridemia, dyslipidemia, atherosclerosis, coronary artery disease, cerebrovascular disease and peripheral vascular disease.

15 131. The composition as claimed in any one of claims 38, 70 and 115, wherein the inflammation is selected from the group consisting of sinusitis, asthma, pancreatitis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acne.

20 132. The use as claimed in any one of claims 42, 74, 119, and 127, wherein the inflammation is selected from the group consisting of sinusitis, asthma, pancreatitis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acne.

25 133. The method as claimed in any one of claims 45, 49, 78, 81, 91, 95, 105 and 122, wherein the inflammation is selected from the group consisting of sinusitis, asthma, pancreatitis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acne.

134. The composition as claimed in any one of claims 38, 70 and 115, wherein the body weight disorder is selected from the group consisting of obesity, cachexia and anorexia.

30 135. The use as claimed in any one of claims 42, 74, 119, and 127, wherein the body weight disorder is selected from the group consisting of obesity, cachexia and anorexia.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

136. The method as claimed in any one of claims 45, 49, 78, 81, 91, 95, 105 and 122, wherein the body weight disorder is selected from the group consisting of obesity, cachexia and anorexia.

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

1/50

5' ATG GAT TTT GTT GCT GGG GCG ATT GGA GGA GTC TGC GGT GTT GCT GTG GGC TAC
 M D F V A G A I G G V C G V A V G Y

60 CCT CTG GAT ACA GTG AAG GTC AAA ATC CAG ACT GAG GCC AAG TAC ACA AGC ATC
 P L D T V K V K I Q T E A K Y T S I

120 TGG CAC TGT GTC CGG GAC ACA TAT CGT CAA GAG CGG CTG TGG GGA TTC TAC AGA
 W H C V R D T Y R Q E R L W G F Y R

180 GGC CTC TCA CTG CCT GTG TGC ACC GTG TCC CTG GTG TCA TCT GTA TCC TTC GGT
 G L S L P V C T V S L V S S V S F G

240 ACC TAC CAC CAG TGC CTG GCG CAC APT TGC CGC TTC CAG TAC GGC AGC AGC GAC
 T Y H H C L A E I C R F R Y G S T D

300 GTC AAG CCC ACC AAG GCT GAC ATC ACA CTC TCA GGA TGC GGC TCT GGC CTT GTC
 V K P T K A D I T L S G C A S G L V

360 CGG GTG TTC CTG ACG TCA CCC ACT GAG GTG GCG AAA GTG CGC CTG CAG ACA CAG
 R V F L T S P T E V A K V R L Q T Q

420 GGC CAA TGT CAG ACA CAG CAG CGG CGA CCC TCG GCC TCC TGG ACA TCT GTG GGT
 A Q S Q T Q Q R R P S A S W T S V A

480 CCC GCT TTG TGT CTA GCA CCC ACT GCT TGC CTG GAG CCC AGG CCT AAG TAC AGT
 P A L C P A F T A C L E F R F K Y S

540 GGG CCA CTA CAT TGT TTA GTC ACA GTG GCC CGA GAG GAG GGT CTG CGC GGA CTC
 G P L H C L V T V A R E E G L R G L

570 TAC AAG GCG AGC TCG GCT CTA CTC CTT GGT GAA GCG CAC TCC TTT GGC AGC TAC
 Y K G S S A L L L R E G H S F A T Y

FIGURE 1

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

2/50

500 630
TGT CTC TCC TAT GGT GTG CTC TCG GAG TGG CTC ACC CCT GGT GGC CAG AGT CAG
F L S Y A V L S E W L T F A G Q S Q

560 690
CCA GAT GTC CTA GGT GTG CTC GTG GGT GGA GGC TGT GGC GGG GTC CTC GGC TGG
P D V L G V L V A G G C A S V L A W

720 750
GCT GTG GGT ACG CCC ATG GAC GTT ATC AAG TCC CGC CTG CAG GCG GAT GGG CAG
A V A T P M D V I K S R L Q A D G Q

780 810
GGC CAG CAG CGC TAC CGG GGC CTC CTG CAC TGT GTG GTG ACC ACC GTG CGG GAG
G Q Q R Y R E L L H C V V T S V E E

840
GAG GGT CCC AGA GTG CTC TTC AAG GGA CTG GCA CTC AAC TGC TGC CGC GGC TTT
E G P R V L F K G L A L N C C R A F

870 900
CCT GTC AAC ATG GTG CTC TTC GTG GGT TAT GAG GGT GTG CTG AGG CTC ACT CAG
P V N M V V F V A Y E A V L R L T Q

930
GGC CTC CTC ACA TAG 3'
G L L T *

FIGURE 1 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

3/50

5' ATG GAT TTT GTC GGT GGA GGC ATC GGA GGC CTC TCC GGT GGT GGT GGC TAC
 M D F V A G A I G S V C G V A V S Y

30
 60 CCC CTG GAC ACG GTG AAG GTC AGG ATC CAG ACG GAG CCA AAG TAC ACA GGC ATC
 P L D T V K V R I Q T E P K Y T G I

90
 120 TGG CAC TGC CTC CGG GAT ACG TAT CAC CCA GAG CGC GTG TGG GGC TTC TAC CGG
 W H C V R D T Y H R E R V W G F Y R

150
 180 GGC CTC TCG CTG CCC GTG TGC ACG GTG TCC CTG GTA TCT TCC CTG TCT TTT GGC
 G L S L P V C T V S L V S S V S F G

210
 240 ACC TAC CGC CAC TGC CTG GCG CAC ATC TGC CGG CTC CGG TAC GGC AAC COT GAC
 T Y R H C L A R I C R L R Y G N P D

270
 300 GGC AAG CCC ACC AAG GGC CAC ATC ACG CTC TCG GGA TGC GGC TCC GGC CTC GTC
 A K E T K A D I T L S G C A S G L V

330
 360 CGC GTG TTC CTG ACG TCG CCC ACT GAG GTG GGC AAA CTC CGC TTG CAG ACG CAG
 R V F L T S P T E V A K V R L Q T Q

390
 420 ACA CAG GCG CAG AAG CAG CAG CGG CGG CTT TCG GGC TCG GCG CGG TTG GCT GTG
 T Q A Q K Q Q R R L S A S G F L A V

450
 480 CCC CCC AAG TGT GGT GTC CCC CCA GGC TCC CCA GAG CCC AAG TAC CGC GGG CCA
 F F M C P V P P A C P E P K Y R G P

510
 540 CTG CAC TGC CTG GGC ACG GTA GGC CGT GAG GAG GGG CTG TGC GGC CTC TAC AAG
 L H C L A T V A R E E G L C G L Y K

570
 GGC ACG TCG GGC CTG GTC TTA CGG GAC GGC CAC TCC TTT GGC ACC TAC TTC CTT
 G S S A L V L R D G H S F A T Y F L

FIGURE 2

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

4/50

600 630
TCC TAC GCG CTC CTC TGC GAG TGG CTC AGC CCC GGT GGC CAC AGC GGG CCA GAT
S Y A V L C E W L S P A G H S R P D

660 690
GTC CCG GGC GTG CTG GTG GGC GGG GGC TGT GCA GGA GTC CTG GGC TGG GGT GTG
V P G V L V A G G C A G V L A W A V

720 750
GCC ACC CCC ATG GAC GTG ATC AAG TCG AGA CTG CAG GCA GAC GGG CAG GGC CAG
A T P M D V I K S R L Q A D G Q G Q

780 810
AGG CGC TAC CGG GGT CTC CTG CAC TGT ATG GTG ACC AGC GTT CGA GAG GAG GGA
R R Y R G L L E C M V T S V R E E G

840
CCC CGG GTC CTT TTC AAG GGG CTG GTA CTC AAT TGC TGC CGC GGC TTC CCT GTC
P R V L F K G L V L N C C R A F F V

870 900
AAC ATG CTG GTC TTC GTC GCC TAT GAG GCA GTC CTG AGG CTC GCG CGG GGT CTG
N M V V F V A Y E A V L R L A R G L

CTC ACA TAG 3'
L T *

FIGURE 2 (continued)

PCT/CA01/01632

5/50

```

rMETP      1  MDFVAGAIIGGVCGVAVGYPLDTVKVKIQITRAKYTSTIHCVRDITYRQERLW  50
             |||||
hmETP      1  MDFVAGAIIGGVCGVAVGYPLDTVKVRITQTEPKYTGHCVRDITYRHKRVW  50

rMETP     51  GFYRGLSLPVCVTSLVSSVSFGTYHCHLAHICRFYAGSTDVVKPEADITL  100
             |||||
hmETP     51  GFYRGLSLPVCVTSLVSSVSFGTYRHCLAHICRLRYGNPDAPKPTKADITL  100

rMETP    101  SGCASGLVRVFLTSPTEVAKVRLQTQAGSQTQQRPSASWTSVAPALCPA  150
             |||||
hmETP    101  SGCASGLVRVFLTSPTEVAKVRLQTQAGQKQQRRLSASGPLAVPPMCPV  150

rMETP    151  PTACLEPRPKYSGPLHCLVTVAREEGLRGLYKSSALLRREGHSFATYFL  200
             |||||
hmETP    151  PPAC..PEPKYRGFHLCLATVAREEGLCGLYKSSALVLRLDGHISFATYFL  198

rMETP    201  SYAVLSEWLTFPAGSQDPDLVGLVAGGCAGVLAWAVATPMDVIKSRLOAD  250
             |||||
hmETP    199  SYAVLCEWLSPAGHSRPDPVGLVAGGCAGVLAWAVATPMDVIKSRLOAD  248

rMETP    251  GCGQQRYRGLLHCMTVTSVREEGPRVLFGALNLCCRAFPDMVVFVAYEA  300
             |||||
hmETP    249  GCGQQRYRGLLHCMTVTSVREEGPRVLFGGLVNLCCRAFPDMVVFVAYEA  298

rMETP    301  VLRLTQGLLT 310
             |||||
hmETP    299  VLRLARGLLT 308

```

FIGURE 3

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

6/50

METP	MDPVAGAGGGVCGAMGMDLSTVSVKOT	29
MCAT	MADQPKTISELHLLAGGFGGCLFVGHPLTPKVRLOT	40
TXTP	MPAPRAPRALAAAPASGKALTHEEATLGGGAGGIEECTETETVMTQIAL	55
UCP2	MVGFKATDVPPATVKFLGAGTACIADLTETETAKVRLQI	43
METP	EE-----KYTGTHRCVRDTHKRPWGFYAGLSLEVCTVLSSSVSEK	72
MCAT	QPPSL-----PGQDEMYSCTEDDFKTLFREGITGLYRQMAELIGVTEMFAVCHP	91
TXTP	DERE-----HPEERYRGICQVRCQTVRSEHWLGLYRQSSLYGSLRQAVREK	103
UCP2	QGESQGPVRATASACVRCVMGTLIMVETEGPRSTLNGHVAQHQRMSFASVRLS	98
METP	TERHCLAHICRERYGNEPAKPEKADITLSCASGLRUPNTSETDAKVRLEPOT	127
MCAT	GGG---LG-KEMQKHEEDMLSYPOUFANMLSSVFTTGEMSCERTICLLITSA	142
TXTP	MRFFLSNE---MRDAQGRIDSTRGILCGLGAGVREEVVHOCMETLAVRSIHCO	154
UCP2	REDSMKQFYTK---G---SEHAGISREILAGSTIGALAVMAQEDVAVKVPFQAGS	148
METP	QKQKQORRLSASGPLAVFPMCPVPFACPEKXGGPLHCLATVAREEGICGLIKSS	182
MCAT	SS-----SESKYTGHDCAKGLYCFATKCAVETP	172
TXTP	SS-----PNEHYGCFHCKRELVREGGLGTQGL	184
UCP2	RGG-----GGRKYSTINAYNTAREDFEGLAKGT	179
METP	SALVLRDGHFSFATYELSSAVLCENESPAQ---BSRPDVEGVTVACGCRGLAWAVA	235
MCAT	VILIMEDVPASCAVMTTEWIKYITPEHKRYSELSAPRLTHVAGGTAGTFNNAVA	227
TXTP	ITAVVHQSNGALREVMTSRRHYRGDNP-NKPMPLITGVFQALAGAAEFVGN	238
UCP2	SPNNAARNVNCALVATEDEKKAALKEN---LMTDDECHFTSAFGAGFCITVLA	232
METP	REMDVTKSRILADGQCKRKYRGLLHGMVTSVREDEKVLFTKGLVINCPRAFVVM	290
MCAT	IEFDVLRSEETAPPE-KYPNGFRVIRELLKDEGVTSLEKGNNAVMTREAFANA	281
TXTP	TPEDVLRTEMGLEAH---KYRNTWDCGLQHKRGLKAFKATVPRERVCCLDVA	291
UCP2	SPVDVVKTRFMNSALE---QSSAGRCALIMLOKEGRATYKGFMESEFELGSWTV	285
METP	VYEVATEAVLNARGLLF	308
MCAT	ACELGGEVAMFLNATPNL	301
TXTP	EYVLTDEYVLLKRWKED	311
UCP2	VMSVTEELKRAIDACREAPF	309

FIGURE 4

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

7/50

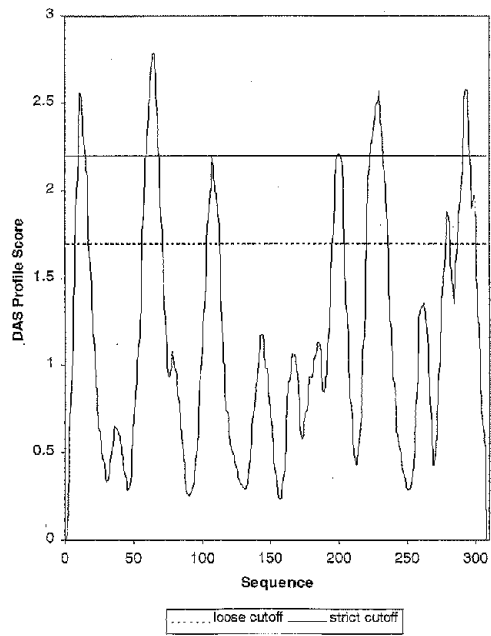


FIGURE 5

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

8/50

-1500 TGGCCTTGGATGGGCACTTCCCGCCCTTTGCCCCCTGCCCCGACGCTGGCACTGGCTCA
-1440 TCCTGTCTCTCCCACTTCCCTATAAATAGCCGGGCTGGCAGGGGGCTGTCCCTCCATCA
-1380 GCTTCAGCCTGCTCAAGGCCAGCCTGCAGGTCACAGCCATTAGAGGACAGGAAAACAGGT
-1320 AGACAAGAGCCTCCTGSCCTTGCCACCTGTCCCGAGGGCTGCCAGATGGGCTGCTGG
-1260 GCCTCATGCATCAACACCTGCCCCCTCCCTATCCCTGCTGGCATTCCAGTCTCTGGGGCAC
-1200 TCACTTAGATTCTCTTCTCAGCAGCTGCTGGCCGAGGTAACCTGCACAGCCTCCCTGAG
-1140 CTTTGGTGTCTCAGCTGGAGATCTCACAAGGATGCACTGCAGGTCACATGGGGCATGCAC
-1080 TGAGTCCCTTGAGAGCCCTCTGGGGCTCCCGAGGCGGCTGGATATCCAGAGGGTG
-1020 GCTTGTATCGAGGCACTGGGGATCACTCCAGCCCTGCCGCCCTCCTGGCCTTGACAA
-960 GCCCCCTTTCTGGGCTCAATGGCCCCATCTGTGAATGGGGAGCACTAAGCTGCGCTG
-900 TCTCCCTCCTGGGGGGGTGAGGAGGATCCTAGAGCCTGAGAGTGAGGGGAGCTTGGTGAA
-840 CTGTAAAGTGGGGTGCAAGGGCAAGGAGGTCCTCTGTTTTTACAGTCCCAGCAGACAGAA
-780 GTAGCCTCTTACTGGAGAGGTTTCCCTTCAGGAGGGCCCCAGCCGCTGCTTCAGAGGCT
-720 GAATCGGCAAGCCTCTCTCCCTGCTTCACTGGGGCAGGGGACTTGGTGGAGGAGCCTTG
-660 GCCTTCGCCCTCTGGGTCCAGGGAGACATTCCCATGGAGCAGAGAGCAGGAAACCGGGG
-600 CAGCGGGAAGGGTGAGAGCAGATGGTGGGTGCTGTTCTCTGGGTTCAAGGCTGTCTTGCC

FIGURE 6

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

9/50

-540 ACCCCCTCCCTCCCTGCCAACTGGAGTCCTTGAGGACAGGGACTGGCTCTCATTTGCCCT
-480 GGGTGTAGCATCAGCAAGTAAGTGTTTTTTGAGTGAATAAGAGAGGGAGCTTGCAGGT
-420 TTCCGAGGCAGGGGTCCCTGAGCAATCCAGGGGAGTCGGGAAAGCCAGGGGACACAGTG
-360 AAGGCTGGGCTTGGACCTGGAGGGCGAGAGCTGTACAGCCCATCTCTGGACCTTCCC
-300 AGGAGGTGTTTGGATGTGATGGGGCACTGCCCTGCTCTCTGGTGCTGTACCTCCGGT
-240 GCTCTCTCCTGTGTTTTCTGACACCTGGGTCCCGAGGGCACTGGGACAGGGTCCCGGC
-180 GGCAGGGAGGGAGTCCAGCTGTGTGCGGGTGGGCTCAGCAGGCTCTGCTTCGGGTCCCC
-120 TCCCTGCGGCAGCTATTTAAGGTCTGAGAGGGGCGAGCTGGGAGCTGTTGAGGCGACCC
-60 TGGTGCACCAAGCCCTCTCAGGCAGGCAGACCCAGGGCTCCCCCGACACCTTCTTC

FIGURE 6 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

10/50

5' ATG TTT GAG CCC AAG AGC TGC ACC TAC ACC TAC CTG CTG GGT GAC CGG GAC TCC
 M F E P K S C T F T Y L L G D R D S

60 CGA GAG GCG ATC CTG ATC GAC COT GTT CTG GAG ACA GCG CAC CGG GAT GCT CAG
 R E A I L I D P V L E T A H R D A Q

120 CTG ATT AAG GAG CTG GGG CTG AAG CTG CTC TAT GCG CTG AAG ACC CAG TGC CAT
 L I K E L G L K L L Y A V N T H C H

180 GCT GAT CAC ATC ACG GGC TCA GGG GTT CTC CGA TCC CTC CTC CCG GGC TGT CAG
 A D H I T G S G V L R S L L P G C Q

240 TCC GTC ATC TCT CGC CTC AGC GGA GCT CAG GCT GAT TTG CAT ATC GGG GAA GGT
 S V I S R L S G A Q A D L H I G E G

300 GAT TCC ATC CCC TTT GGA CGC TTT GCT TTG GAG ACT CGG GCG AGC CCT GGC CAC
 D S I P F G R F A L E T R A S P G H

360 ACC CGA GGC TGT GTC ACC TTT CTC CTG AAT GAC CAG AGC ATG GCT TTC ACT GGA
 T P G C V T F V L N D Q S M A F T G

420 GAT GCT CTA CTG ATC CGA GGG TGT GGA CGA ACA GAC TTC CAA CAA GGT TGC GCG
 D A L L I R G C G R T D F Q Q G C A

480 AAG ACT TTG TAC CAC TCA CTG CAC GAG AAG ATC TTC ACA CTT CCA GGC AAC TGT
 K T L Y H S V H E K I F T L P G N C

540 CTA ATC TAC CCT GCT CAT GAT TAC CAC GGG CTC ACA GIT TCT ACT GTG GAG GAG
 L I Y P A H D Y H G L T V S T V E R

570 GAA CGG ACT CTG AAC CCA CGG CTC ACT CTC AGC TGT GAG GAG TTT ATC AAG GTC
 E R T L N P R L T L S C E E F I K V

FIGURE 7

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

11/50

```

      600                      630
ATG GAC AAC GTG AAC TTG CCC ANG CCA CAT CAG ATA GAC ATT GCC GTT CCT GCA
K  D  N  L  N  L  P  K  P  K  Q  I  D  I  A  V  P  A

      660
AAT ATG CGC TGT GGG GTC CAG ACT CCA CCC TCC TGA 3'
N  K  K  C  G  V  Q  T  P  P  S  *

```

FIGURE 7 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

12/50

5' APTG TTC GAG CCG GTG AGC TGC ACC TTC ACG TAC CTG CTG GGT GAC AGA GAG TCC
 M F E F V S C T F T Y L L G D R E S

60
 CGG GAG GCC GTT CTG ATC GAC CCA GTC CTG GAA ACA GCG CCG GAT GCC CAG
 R E A V L I D F V L E T A P R D A Q

120
 CTG ATC AAG GAG CTG GCG CTG CCG CTG CTC TAT GCT GCG AAT ACC CAC TGC CAC
 L I K E L G L R L L I A V N T H C E

180
 GCG GAC CAC ATT ACA GGC TCG GCG CTG CTC CCG TCC CTC CTC CCG GGC TGC CAG
 A D H I T G S G L L R S L L P G C Q

240
 TGT GTC ATC TCC CCG CTT AGT GCG GCC CAG GCT GAC TTA CAC ATT GAG GAT GCA
 S V I S R L S G A Q A D L H I E D G

300
 GAC TCC ATC CCG TTC GCG CCG TTC GCG TCG GAG ACC ACG GCC AGC CCG GCG CAC
 D S I R F C R F A L E T R A S P G H

360
 ACC CCA GCG TGT GTC ACC TTC GTC CTG AAT GAC CAC ACC ATG GCC TTC ACT GGA
 T P G C V T F V L N D H S M A F T G

420
 GAT GCC CTG TTC ATC CCG GCG TGT GCG CCG ACA GAC TTC CAG CAA GCG TGT GCG
 D A L L I R G C G R T D F Q Q G C A

480
 AAG ACC TTG TAC CAC TCG GTC CAT GAA AAG ATC TTC ACA CTT CCA GGA GAC TGT
 K T L Y H S V H E K I P T L P G D C

540
 CTG ATC TAC CCG GCT CAC GAT TAC CAT GCG TTC ACA GTG TCC ACC GTG GAG GAG
 L I Y P A H D Y H G F T V S T V E E

600
 GAG AGG ACT CTG AAC CCG CCG CTC ACC CTC ACC TGT GAG GAG TTT CTC AAA ATC
 E R T L N P R L T L S C E R F V K I

FIGURE 8

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

13/50

```

      600                               630
ATG GGC AAC CTG AAC TTG CCT AAA CCT CAG CAG ATA GAC TTT GCT GTC CCA GCC
M  G  N  L  N  L  F  K  P  Q  Q  I  D  F  A  V  P  A

      660
AAC ATG CGC TTT GGG GTG CAG ACA CCC ACT GCC TGA 3'
N  M  K  C  G  V  Q  T  P  T  A  *

```

FIGURE 8 (continued)

[illegible]

FIGURE 9

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

15/50

GLOL	MPEPISCTTETTCGRERENYVLETPVLETPAQALIKELNRIILYANETCHADITISGLI	64
GLO	MEVETLEPADDNMAEINIDENELALVLETPVLETPAQALIKELNRIILYANETCHADITISGLI	66
	* * *	
GLOL	RSILPCCQSVIRLSGAQDLIEDGDSIRFERFALETRSSECHITTCCTATVIM----DHSMATGE	127
GLO	VKESILKVIYGDRIKALTEKTHLSHCOVSSINAKCLATVCHHCHCETSKPGGSEPPAVETGH	134
	* * *	
GLOL	ALLERGGSDTCCCKATHTHSCHKFTTNGCLNPPADVHGFTSTVEER--TLNPHLTISCE	193
GLO	TTPVACGGK--HYETADENCKALLVGRNPTTRVACGSEITINNKEARHVEPGNAALIEKAWA	200
	* * *	
GLOL	EFVINGNINNEKPOQIDKAVTANSCGVQVETA	227
GLO	REKYSICEPTASTLAERETINPEVRREKVOOHAGETDVTMTAVREKDOFMERD	260

FIGURE 10

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

16/50



FIGURE 11

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

17/50



FIGURE 12

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

18/50

-905 AAAATAAAACAAAAGAAAAAGGAAAAAAGCGGCCCCGAGGCTATGACTGTACTGGGGCC
-845 TCTCCCTGGGTTTCTACTCTCTCTCCCTATCTCTGTTCTACATGAGTATGTCTGGTGGC
-785 TCTGAGGCTCTCTCCCTCCGACCTTGAGTGTCTCCCTCTCTCTGTTTTTCTGGGCTC
-725 AAAGGCTCGAGGCATTGCACTCTGGCTTTCTCGGCTCTCGGCTCGCCGCTCGCCGCTCGCCGCTC
-665 GCGGGTCCCCCGCCCTCTGCCCCAGGCGTCCGTGGCCCTTTAAGGCGTCTCGCCGCC
-605 GCGCCGCTCTCCCGGGTCACTGCGGTAGCGCCCGGCTCTCTGCGGCGCTCGGCTCGG
-545 CTCATTCCTGACCCCGCACTCCGCGGATGGCGCAGGCTCTACTGAGGCTCGCCCGGCGG
-485 CAGCTGAGCCAGCGCGGCGGCTCTGGAGCCCCCATCTCTCTCGGCGAG

FIGURE 13

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

19/50

5' ATG GAC GCC CTC TTG GAA CCT TTC CTG GGC GAC AGG CTG TTC CCG GGA TCC AGC
 M D A V L E F F F A D R L F F G S S

60 TTG CTG GAC TTG GGA GAC CTG AAT GAG TCG GAT TTC CTC AAC AAT GCG CAC TTC
 F L D L G D L N E S D F L N N A H F

120 CCG GAG CAC CTG GAC CAC TTT GTG GAG AAC ATG GAG GAC TTC TCC AAT GAC CTG
 P E H L D H F V E N M E D F S N D L

180 TTC AGC AGC TTC TTT GAT GAC CCT GTG CTG GAT GAG AAG AGC CCT CTG CTG GAC
 F S S F F D D F V L D E K S F L L D

240 ATG GAA CTG GAT TCC CCT GGT CCA GGC ATC CAG GCT GAG CAC AGC TAC TCC CTG
 M E L D S P A F G I Q A E H S Y S L

300 AGT GGG GAT TCT GCA CCC CAG AGC CCC CTT CTC CTT CTC AAA ATG GAG GAT ACC
 S C D S A P Q S P L V P V K M E D T

360 ACC CAA GAT ATG GAA CAC GGA GCA TGG GCA CTG GGA AAC AAA CTG TGC TCC ATT
 T Q D M S H G A W A L G N K L C S I

420 ATG CTG AAG CAG GAG CAG AGC CCG GAG CTT CCG GTF GAC CCC CTG GGT GGC TCC
 M V K Q E Q S F E L P V D P L A A S

480 TTC GGC ATG GCT GCT GCT ACC ATG GGC ACC CCA CCA CTG CTG GGC CTC AGC CCC
 S A M A A A T M A T F F L L G L S P

540 ATC TCC AGG CTG CCC ATC CCT CAC CAG GGC CCA GGA GAA ATG ACT CAG CTG CCA
 I S R L P I F H Q A P G E M T Q L P

570 CTG ATC AAA GCA GAG CCC CCG GAA AAG AGC CAG TTT CTC AAA CTG ACA CAA GAG
 V I K A E P P E M S Q F L K V T Q E

FIGURE 14

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

20/50

600 630
CAC CTC GTA CAG ATG CCT CCA ACA CCC CCC AGC AGC CAT GGC AGT GAC ACT GAC
D L V Q M F F T P P S S H G S D S D

660 690
GGC TGC CAG AGT CCC GGC TCT CTT CCC CCC TCC AGC CTT GTC CGG CCC ATG GGC
G S Q S P R S L P P S S P V R P M A

720 750
CGC TCC TCC AGG GGC ATT TCC ACC TCT CCG CTC CTC ACT GGC CCT CAC AAA CTG
R S S T A I S T S P L L T A P H K L

780 810
CAG GGG ACA TCA GGG CCA CTG CTC TTG ACA GAA GAG GAG AAG CGA ACT TTG ATC
Q G T S G P L L L T E E E K R T L I

840
GCC GAG GGT TAT CCC ATC CCC ACC AAA CTC CCC CTC ACC AAG GCT GAG GAG AAG
A E G Y P I P T K L P L T N A E E E

870 900
GCC CTG AAG AGA GTG CCG AGG AAA ATT AAG AAC AAG ATC TCT GGC CAG GAG AGC
A L E R V R R K I E N K I S A Q E S

930 960
CGC CGC AAA AAG AAG CAG TAT GTG GAG TGT CTA GAG AAG AAG GTG GAG ACA TAT
R R K K K E Y V E C L B K K V E T Y

990 1020
ACA TCA CAG AAC AAT GAA CTG TGG AAG AAG CTG GAA ACC CTA GAG ACT GCC AAC
T S E N N E L W K K V B T L E T A N

1050 1080
AGG ACC CTG CCG CAG CAG CTG CAG AAA CTC CAG ACT CTG GTC ACC ACC AAG ATC
R T L L Q Q L Q K L Q T L V T S K I

1110
TCC AGA CTT TAC AAG ATG GCG GGC ACA CAG ACT GGC ACT TGC CTC ATG CTG GCA
S R P Y K M A A T Q T G T C L M V A

1140 1170
GCC TTG TGC TTT GTT CTG GTG CTG GGC TCA CTT GCG CCC TGC CTT CTT GCA TTC
A L C E V L V L G S L A P C L P A F

FIGURE 14 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

21/50

1200 1230
TCT TCT GGC TCA AAG ACT GTG AAA GAA GAC CCC CTC GCA GCT GAC ACT CTC TAC
S S G S K T V K E D P V A A D S V Y

1260 1290
GCA GCC AGT CAG ATG CCT TCC CGA AGC CTG CTG TTT TAT GAT GAT GGG GCA GGC
A A S Q M P S R S L L F Y D D G A G

1320 1350
TCC TGG GAA GAT GGC CAC CGA GGT GCT CTA CTG CCT GTG GAG CCC CCA GAA GGC
S W E D G H R G A L L P V E P P E G

1380
TGG GAG CTC AAA CCG GGG GGA CCA GAG CCG AGG CCC CAG GAC CAC CTC CGA
W E L K F G G P A E F R P Q D H L R

1410 1440
CAT GAC CAT GCG GAC AGC ATC CAC GAG ACA ACC AAG TAC TTS AGA GAG ACC TGG
H D R A D S I R E T T K Y L R E T W

1470 1500
CCA GAG GAT ACC GAG GAC AAT GGC GCC AGC CCC AAT TTC TCC CAC CCC AAG GAG
P E D T E D N G A S E N F S H P K R

1530 1560
TGG TTC CAC GAC AGG GAT CTG GCC CCG AAC ACC ACC ATC AAA CTC TCC TAG 3'
W F H D R D L G P N T T I R L S *

FIGURE 14 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

22/50

5' ATG GAC GCC CTC TTG GAA CCC TTC CCG GCC GAC AGG CTG TTC CCC GGA TCC AGC
 M D A V L E P F F A D R L F F G S S

60 TTC CTG GAC TTG GGG GAT CTG AAC GAC TCG GAC TTC CTC AAC AAT GCG CAC TTT
 F L D L G D L N E S D F L N N A H F

120 CCG GAC CAC CTG GAC CAC TTT AGG GAG AAC ATG GAG GAC TTC TCG AAT GAC CTG
 P E H L D H F T E N M E D F S N D L

180 TTC AGC AGC TTC TTT GAT GAC CCF CTG CTG GAT GAC AAG AGC CCF CTA TTC GAC
 F S S F F D D P V L D B K S P L L D

240 ATG GAA CTG GAC TCC CCF ACG CCA GGC ATC CAG GCG GAG CAC AGC TAC TCC CTG
 M E L D S P T P G I Q A E H S Y S L

300 AGC GGC GAC TCA GCG CCC CAG AGC CCC CTT GTG CCC ATC AAG ATG GAG GAC ACC
 S G D S A F Q S P L V F I K M E D T

330 ACC CAA GAT GCA GAG CAT GGA GCA TGG GCG CTG GGA CAC AAA CTG TGC TCC ATC
 T Q D A E H S A W A L G H K L C S I

390 ATG GTG AAG CAG GAG CAG AGC CCG GAG CTG CCC GTG GAC CCT CTG GCT GCC CCC
 M V K Q E Q S P E L F V D F L A A P

450 TCG GCC ATG GCT GCC GCG GCC GCC ATG GCC ACC ACC CCG CTG CTG GCG CTC AGC
 S A M A A A A A H A T T P L L G L S

510 CCG TTG TCC AGG CTG CCG ATC CCC CAC CAG GCC CCG GGA GAG ATG ACT CAG CTG
 F L S R L P I P H Q A P G E M T Q L

570 CCA GTG ATC AAA GCA GAG CCF CTG GAG GTG AAC CAG TTC CTC AAA GTG ACA CCG
 P V I K A E P L E V N Q P L K V T P

FIGURE 15

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

23/50

600 630
GAG GAC CAG GTG CAG ATG CCT CCG ACG CCG CCC ACC ACC CAT GGC ACT GAC AGC
E D L V Q M P P T P P S S H G S D S

660 690
GAC GGC TCC CAG AGT CCG CGC TCT CAG CCG CCG TCC AGC DCT GTC AGG CCC ATG
D G S Q S P R S L P P S S P V R P M

720 750
GGG CCG TCC TCC ACG GGC ATC TCC ACC TCC CCA CTC CTC ACT GGC CCT GAC AAA
A E S S T A I S T S P L L T A P H K

780 810
TTA CAG GGG ACA TCA GGG CCA CAG CTC CTC CAG GAG GAG AAG CAG ACC CTC
L Q G T S G P L L L L T E E E K R T L

840
ATT GCT GAG GGC TAC CCG ATC CCG ACA AAA CTC CCG CTC ACC AAA GCG GAG GAG
I A E G Y F I P T K L P L T K A E E

870 900
AAG GCC TTG AAG AGA GTC CCG AGG AAA ATC AAG AAC AAG ATC TCA GCG CAG GAG
K A L K R V R R K I K N K I S A Q E

930 960
AGC CCT CCG AAG AAG AAG GAG TAT GTG GAG TGT CTA GAA AAG AAG GTG GAG ACA
S R R K K K E Y V E C L R K R V E T

990 1020
TTT ACA TCT GAG AAC AAT GAA CTG TGG AAG AAG CTC GAG ACC CTG GAG AAT GCG
F T S E N N E L W K K V E T L E N A

1050 1080
AAG AAG ACC CTC CTC CAG CAG CTG CAG AAA CTC CAG ACT CTC GTC ACC AAC AAG
N R T L L Q Q L Q K L Q T L V T N K

1110
ATC TCC AGA CCT TAC AAG ATG GCG ACC CAG ACT GGG ACC TGC CTC ATG GTG
I S R P Y K M A A T Q T G T C L M V

1140 1170
GCA GCG TTG TGC TTT GGT CAG GTG CTG GGC TCC CTC CTC CCG TGC CTT CCG GAG
A A L C F V L V L G S L V P C L P E

FIGURE 15 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

24/50

1200
 TTC TCC TCC GGC TCC CAG ACT CTG AAG GAA GAC CCC CTG GCC GCA GAC GGC GTC
 F S S G S Q T V R E D F L A A D G V

1230
 1260
 TAC AGG GCC AGC CAG ATG CCC TCC CGA AGC CTC CTA TTC TAC GAT GAC GGG GCA
 Y T A S Q M P S R S L L F Y D D G A

1290
 1320
 GGC TTA TGG GAA GAT GGC CGC AGC ACC CTG CTG CCC ATG GAG CCC CCA GAT GGC
 G L W E D G R S T L L F M E P F D G

1350
 1380
 TGG GAA ATC AAC CCC GGG GGG CCG GCA GAG CAG CCG CCC CGG GAC CAC CTG CAG
 W E I N P G G P A E Q R P R D H L Q

1410
 1440
 CAT GAT CAC CTG GAC AGC ACC CAC GAG ACC ACC AAG TAC CTG ACT GAG GCC TGG
 R D H L D S T H E T T K Y L S E A W

1470
 1500
 CCT AAA GAC GGT GGA AAC GGC ACC AGC CCC GAC TTC TCC CAC TCC AAG GAG TGG
 P K D G G N G T S P D F S H S K E W

1530
 1560
 TTC CAC GAC AGG GAT CTG GGC CCC AAC ACC ACC ATC AAA CTC TCC TAG 3'
 F H P R D L G P N T T I K L S *

FIGURE 15 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

25/50

HUM	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	87
RAT	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	87
MUS	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	87
HUM	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	174
RAT	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	173
MUS	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	174
HUM	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	261
RAT	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	260
MUS	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	261
HUM	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	348
RAT	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	347
MUS	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	348
HUM	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	435
RAT	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	434
MUS	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	435
HUM	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	519
RAT	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	520
MUS	MDVAFPPFADCFPPSSFLDQVLSKEDFVLSKSPFHHTLTKNCPDPSKSLFEDVDVNRKSLIMHIDSRVHTVAKRS	507

FIGURE 16

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

26/50

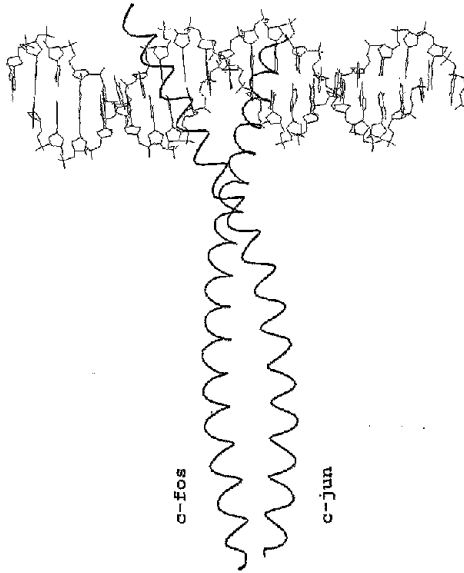


FIGURE 17

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

27/50

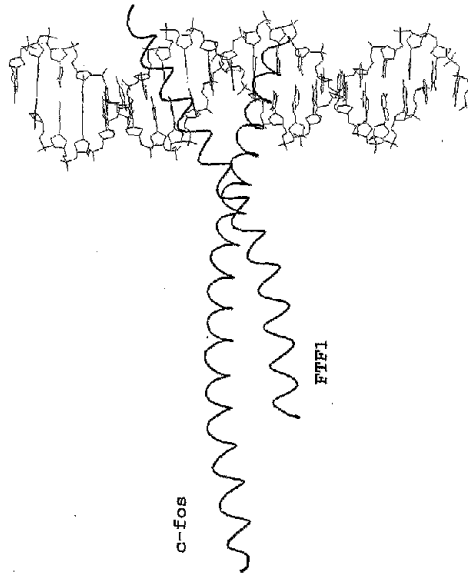


FIGURE 18

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

28/50

-883 CTCAAAAAATAGTAATAATAATAAAATTTTAAAAAGCTGAAAACTCTCCCCGTT
-823 GAGGGGAGATCTGTTCAGGGGACTGTGAAATGGAATTCCTGACTGCGTTTCGTGCAGGC
-763 TTTAGTATAAGGCTGGAGGATGGAAATAGCTCCCTCATCAATTACGGGACACTGGTTG
-703 GTGAAGCCTTAAAAATGCCAATGTTCAGGAACACTGTTATCGGTTCCAGGACTATTGTTG
-643 CTTAAGCCCCCACTTGAGCATTCAGAGAAGAGAGATTACTAAGACGAAGTTGCAGATG
-583 TCTCTTTAAAAAAGGAGAGAGGATTCTCTGAGCCACCCCTCTTCTCATTAATTTAAAT
-523 TATTGTGAATATTGAGTCTGGGGCTGGCGCCCTTGGCCACTGGGCTAGCCAGCCAGGGG
-463 TTCCCGGTTTCACAGAGAGGAAGTGACAGAGACSTCCGGAGGAGACCCAGAGACAGA
-403 GSAGAGGCCCGCAGCCACCCAGTCTCGGGGAGCACTTAGCTCCCCCGCCCCGCTCCCA
-343 CCCTGTCCGGGGGCTCCTGAGCCCTCAGGCCCACTCGGGCTCCCATCGGAAGCCAG
-283 CTGTGCCCCAGGAGGAGCAGGAGGAGGTGGAGTGGCTGAATCCCAACGCTCCGCCGGG
-223 GCCCCGTAGGCCAATCCCGCTCCTAGCCGCTGCCCTAAGGCCCTGGCGGCCCGGCCCG
-163 CCACCCGGGGGCTGGCGCCCTCCGTCCGCCCCCTCCCCCGGGCTTCGCCCCGGACTGOC
-103 CCCCCCGGTTTGCCAGCGCTCAGGCAGGAGCTCTGGAAGTGGGCGCGCCCGGCCCTGGA
-43 GTGAGGGAAGCCAGTGGAGGGGTCCCGGAGGCCGGGTGG

FIGURE 19

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

29/50

30
 5' AUG TCT CTG TGG ACT ACT GGA CTA CTT CTC TGG GGT TTC ACT CTG GGC CCA GGA
 M S L L T T V L L L W S F T L G F G

60
 AAT GCT CTT TGG CTT GAT TCT GGC AGT GAA COT GAA CTA CGG GCA GAG COT CAA
 N A L W L D S G S E P E L R A E P Q

120
 TCC TTG CTG GAA CCC TGG GCA AAC CTC ACA CTG CTC TGT GCA GTT GAT TTG CCT
 S L L E P W A N L T L V C A V D L P

180
 ACC AAG GTC TTC GAG CTG ATC ATG AAT GGG TGG TTC CTG AGT CAA GTC CGA CTG
 T K V F E L I M N G W F L S Q V R L

240
 GAG ACA CCG GTG TTG TCA TAT CSC TTT TCC CTG GGG GCC ATT ACA AGT AAC AAC
 E T P V L S Y R F S L G A I T S N N

300
 AGT GCG CTC TAC CGC TGC CGA TGT GGC GGA CCC COT GGT GAC ATT CAA CTG
 S G V Y R C R C G V E P P V D I Q L

360
 CCA GCG CTG AGC AAG TGG ACA ATG CTA AGC AAT GCT TTG GAG GTG ACA GGG AAA
 P A L S K W T M L S N A L E V T G K

420
 GAG CCC TTG COT CCA CCC TCA GCT CAC GCT GAT CCA GTC TCC TGG ATC ACA CMT
 E P L P P P S A K A D F V S W I T P

480
 GGT GGC CTG COT CTC TAC ATC ATG TGC CGG GGT GCC ATG CCA GGT GGA ACC TAC
 G G L F V Y I M C R V A M R S V T Y

540
 CTG CTG AGG AAG GAA GGG GTG GAT GGT ACC CAC AAA CCT GAT CTC CAG CAC AAG
 L L R K R G V D G T Q K F D V Q H K

570
 GGA AGG GCT GGC TTT CTA ATC TAC AAG COT GGT AAC TAC AGC TGC AGC TAC CTA
 G T A G F L I Y K P G N Y S C S Y L

FIGURE 20

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

30/50

500 530
ACC CAT GCA GGA GGC AAA CCC TCT GAG CCC AGT CCT ATT GTG ACC ATC AAG ATG
T H A S G K F S E P S A I V T I R M

560 590
TCT GCC ACA CAG CTT CCA CCC AGT CTG TGT TTA ATG GGA ACT AAC CTA ACG ATC
S A T Q L P F S L C L M G S Y L T I

720 750
TAC CCC CAG AAG ACA CAT GAG ACG CTT GCT TGC AAA GCT CCT CGG AAT GCA GCC
Y P Q K T H E T L A C K A P R N A A

780 810
GAA TTC CAA CTC AGA CAA GGA GAG AGG GTG CTG AAT ATT CAA GGC TTC ACC CCC
E F Q L R Q G E R V L N I Q G F S P

840
ACC AGA GAT GCT ACC ATA TAC TAT GTG AAC TTG AAG GAA CTG GAT AAC CAA AGT
T R D A T I Y Y V N L K E L D N Q S

870 900
CCT TTT ACC TGC CGC TGC CTT ATG CAC AAA TAC ATG CAT GTT TGG TCG GAG GAC
P F T C R Y R M H K Y M H V W S E D

930 960
ACC AAG CCC GTA GAG CTG ATG TGG AGT GAC GAG AAA CTA CCA GGC CCG GTA CTC
S K P V E L M W S D E K L P A F V L

990 1020
ACT GCA GAG CCA TCA AGT CAC AAC CTG GAG CCT GGT TCA ACA GTG CAG CTT CGA
T A E P S S H N L E P G S T V Q L R

1050 1080
TGT ACT GCA CAC AAG GCT GGC CTG CGC TTT GGC CTG CAA CCC CAG GGC AAA CCA
C T A H K A G L R F G L Q R Q G K F

1110
GAT TTA GTT GNG GTG CAG AAG CTG AAT TCG TCT GGG ACC GAA GCT CTC TTT GAG
D L V V V Q M L N S S G T E A V F E

1140 1170
CTG CAC AAT ATC TCA ACA ATC GAC TCT GGC AAC TAC AGT TGT ATC TAC ATG GAA
L B N I S T I D S G N Y S C I Y M E

FIGURE 20 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

31/50

1200 1230
CAA GCA CCA CCC TTC TCA GGA TGT GCT TCC AGT GAG CCC TTA GAG CTG CGG ATA
Q A P P F S G S A S S E F L E L R I

1260 1290
AAT GGG CCA GCA CCC AAG CCA AGG CTG GAA GCT CTC TGG AAA GGC AAG GTT CCT
N G P A P K F R L E A L W K G K V P

1320 1350
CTG GGC CAT GAA GGC ATC TTT CAA TGC CAT GGC CAT GTC CCC AGG CTC AGC ATG
L G B E A I F Q C B G H V P R V S M

1380
GAG CTG GTA GGT GAG GGC TTT AAA ACA CCC TTC TGG ATG GCT TCA ACA ACA AGC
E L V R E G F K T P F W M A S T T S

1410 1440
AGC TCA GCT TTT CTG AAG CTG TCC TTC GTC GGT CCC CAA CAT ACA GGC AAC TAC
T S A P F L K L S F V G P Q H T G N Y

1470 1500
AGC TGC CGC TAT ACT GCC CTG TCA CCC TTC ACA TTT GAA TCA GGG ATC AGT GAT
S C R Y T A L S P F T P E S G I S D

1530
CCG CTG GAA GTT GTA GTA GAA GGT AGC TAA 3'
P V E V V V E G S *

FIGURE 20 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

32/50

30
 5' ATG TCC ATG CTC GTG GTC TTT CTC TTG CTG TGG GGT GTC ACC TGG GGC CCA GTC
 M S N L V V F L L L W G V T W G P V

60
 ACA GAA GCA GCC ATA TTT TAT GAG ACG CAG CCC AGC CTG TGG GCA GAG TCC GAA
 T E A A I F Y E T Q P S L W A E S E

90
 TCA CTG CTG AAA CCC TTG GCC AAT GTG ACG CTG ACG TGC CAG GCC CGC CTG GAG
 S L L L K F L A N V T L T C Q A R L E

120
 ACT CCA GAC TTC CAG CTG TTC AAG AAT GGG CTG GCC CAG GAG CCT CTG CAC CTT
 T F D F Q L F K N G V A Q E P V H L

150
 GAC TCA CCT GCC ATC AAG CAC CAG TTC CTG CTG ACC GGT GAC ACC CAG GGC CGC
 D S F A I K H Q F L L T G D T Q G R

180
 TAC CGC TGC CGC TCG GGC TTG TTC ACA CGA TGG ACC CAG CTG AGC AAG CTC CIG
 T R C R S G L S T G W T Q L S K L L

210
 GAG CTG ACA GGG CCA AAG TCC TTG COT GCT CCC TGG CTC TCG ATG GCG CCA GFG
 E L T G P K S L P A P W L S M A P V

240
 TCC TGG ATC ACC CCC GGC CTG AAA ACA ACA GCA GTG TGC CGA GGT GTG CTG CGG
 S W I T P G L K T F A V C R G V L R

270
 GGT CTG ACT TTT CTG CTG AGG CGG GAG GGC GAC GAT GAG TTT CTG GAG GTG COT
 G V T F L L R R R G D R E F L E V F

300
 GAG GCC CAG GAG GAT GTG GAG GCC ACC TTT CCA GTC CAT CAG CCT GCC AAC TAC
 B A Q E D V E A T F P V X Q P G N Y

330
 AGC TGC AGC TAC CGG ACC GAT CGG GAA GGC GGC CTC TCT GAG CCC ACC GGT ACT
 S C S Y R T D G E G A L S E F S A T

FIGURE 21

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

33/50

```

600                               630
CTG ACC ATT GAG GAG CTC GGT GCA CCA CCA CCG CCT CTG CTG ATG CAC CAT GGA
V T I E E L A A P P P P V L M H H G

650                               690
GAG TCC TCC CAG GTC CTG CAC CCT GGC AAC AAG GTG ACC CTC ACC TGC GTG GGT
B S S Q V L H P G N K V T L T C V A

720                               750
CCC CTG AGT GGA GTG GAC TTC CAG CTA CCG CCG GGG GAG AAA GAG CTG CTG GGA
P L S S V D F Q L R R G E K E L L V

780                               810
CCC AAG AGC AGC ACC AGC CCA GAT CCG ATC TTC TTT CAC CTG AAC GCG GTG GGC
P R S S T S F D R I F F H L N A V A

840
CTG GGG GAT GGA GGT CAC TAC ACC TGC CCG TAC CCG CTG CAT GAC AAC CAA AAC
L G D G G H Y T C R Y R L H D N Q N

870                               900
GGC TGG TCC CCG GAC ACC CCG CCG GTC GAG CTG ATT CTG ACC CAT GAG ACC CTG
G W S G D S A F V E L I L S D E T L

930                               960
CCC GCG CCG GAG TTC TCC CCG GAG CCG GAG TCC GGC AGG GCC TTG CCG CTG CCG
P A F E F S P E P E S C R A L R L R

990                               1020
TGC CTG GCG CCC CTG GAG GCG GCG CCG TTC GCG CTG GCG CCG GAG GAC AGG GCG
C L A P L E G A R F A L V R E D R G

1050                               1080
GGC CCG CCG GTG CAC CTT TTC CAG ACC CCC GGT GGG ACC GAG CCG CTC TTC GAG
G R R V H R F Q S P A S T E A L F E

1110
CTG CAC AAC ATT TCC GTG GGT GAC TCC GCG AAC TAC ACC TGC GTC TAC GTG GAC
L H N I S V A D S A N Y S C V Y V D

1140                               1170
CTG AAG CCG CCT TTC GGG GGC TCC GCG CCC AGC GAG CCG TTG GAG CTG CAC GTG
L K P P F G G S A F S E R L E L E V

```

FIGURE 21 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

34/50

```

1200      1230
GAC GGA CCC CCT CCC AGG CCT CAG CTC CGG GCG ACG TGG AGT GGG GCG GTC DTG
D G P P P R P Q L R A T W S G A V L

1260      1290
GGC GGC CGA GAT CCC GTC CTG CCG TGC GAG GGA CCC ATC CCC GAC GTC ACC TTC
A G R D A V L R C E G P I P D V T F

1320      1350
GAG CTC CTC GCG GAG GCG GAG ACG AAG GCC CTG AAG ACG CTC CCG ACC CCC GGG
E L L R E G E T K A V K T V R T F G

1380
GGC GCG GCG AAC CTC GAG CTG ATC TTC GCG GCG CCC CAG CAG CCC GCG AAC TAC
A A A N L E L I F V G P Q H A G N Y

1410      1440
AGG TGC GCG TAC CGG TCC TCG CTC CCC CAC ACC TTC GAA TCC CAG CTC AGC GAC
R C R Y R S W V P H T F E S E L S D

1470
CCT GTG GAG CTC CTG GTG GCA GAA AGC TGA 3'
P V E L L V A X S *

```

FIGURE 21 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

35/50

```

rA1BG      1 MSLLTIVLLWGTLLGFGNALWLDSCSEPELRAEPQSILLEPWANLTIVCA 50
             ||:|  |||||  ||  :  ||  ||:|||  ||  ||  |
hA1BG      1 MSMLVVFLLWGVTVNGP/TEAAIFVETQPSLWAESSSLKPLANVTILCQ 50
             ||  ||:|  ||  ||:|  ||:  ||  ||  |||||  |
rA1BG      51 VDLPTKVPFELIMNGWTLGQVRLSTFVLSTYRPSLCAITENNSGVYRCROGV 100
             ||  ||:|  ||  ||:|  ||:  ||  ||  |||||  |
hA1BG      51 ARLETFDFQLFRNGVAQEPVHLDSPAIKHQFLL...TGDTQGRYRCRSGL 97
             ||  ||:|  ||  ||:|  ||:  ||  ||  |||||  |
rA1BG      101 EFPVDIQLPALSKWTMLSNALVETGKEFLPPPSAHADFVSWITPGGLPVY 150
             ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  |||||  ||
hA1BG      98 S.....TGWTQLSKLLELTGPKSLPAPWLSMAFVSWITP.GLKTT 136
             ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  |||||  ||
rA1BG      151 IMCRVAMRGVYLLRKEG.VDGTQKPDVQHKGTAGFLIYKPGNYSCSYLT 199
             ||  |||||:||||:||  :  ||:  ||  ||:  |||||  ||
hA1BG      137 AVCRGVLRGVTELLRREGDHEFLEVPEAGSDVEATFFVHQPGNYSCSYRT 186
             ||  |||||:||||:||  :  ||:  ||  ||:  |||||  ||
rA1BG      200 HAGCKPSEPRAIVTIRMSATQLPPSLCIMSXYLTYPQKTHRTACKADR 249
             ||  |||||  |||  ||  ||  ||  ||  ||  |||||  |
hA1BG      187 DCGAALSRPSATVTIEELAAPPPFVLMHGGSSQVLFPGNKVTLTCVAPL 236
             ||  |||||  |||  ||  ||  ||  ||  ||  |||||  |
rA1BG      250 NAEFQLRQGERVNIQGFSPTRDATIYVNLKELDNQSPFTCRYRMHXY 299
             |||||  ||:  ||:  ||  ||  ||:  ||  ||  |||||:|
hA1BG      237 SGVDQFLRGRGKELIVRSSTSPORIFFHNAVALGCGGHTCRYRLHDN 286
             |||||  ||:  ||:  ||  ||  ||:  ||  ||  |||||:|
rA1BG      300 MHVWSEDSKPFVLMWSDKLPAPVLTAEPSHNLEPGSTVQLRCTAHKAG 349
             ||  ||  ||||  ||  ||||  ||  ||  ||  ||||  ||
hA1BG      287 QNGWSGDSAPVELILSDETLPAPEFSPEP.....ESCRALRLRLCLAPLEG 331
             ||  ||  ||||  ||  ||||  ||  ||  ||  ||||  ||
rA1BG      350 LRFGLRQCKPDLVVVQMINSSTEAFFELHNISTIDSGNYSCIYMQAP 399
             ||  ||:  :  ||  ||||  |||||  ||  ||||:|  :  |
hA1BG      332 ARTALVREDRGGRVTRFPQSPASTBALFELHNISVADSANYSCVYVDLKP 381
             ||  ||||  ||||  ||||  ||||  ||||  ||||  ||||  ||
rA1BG      400 PFGSSASSEPLEIRINGPAPKFELEALWKGKVPFGHEAIFQCHGHVPRVS 449
             ||  ||||  ||||  ||  ||:|  ||  ||  ||:|  ||  ||  |
hA1BG      362 PFGGSAPSERLELHVDGPPFFRQLRAINSGAVLAGDAVLRCEGPIPDVT 431
             ||  ||  ||||  ||||  ||||  ||||  ||||  ||||  ||
rA1BG      450 MELVREGGKTPFWMASTTSTSAFLKLSFVGPQHTGNYSCRYTALSPFTFE 499
             ||  ||||  ||  ||  ||  |||||  ||  ||||  ||||  |
hA1BG      432 FELLREGETKAVKTVRTPGAAANLELIFVGPQHAGNYRCRYRSWVPHTFE 481
             ||  ||||  ||  ||  ||  |||||  ||  ||||  ||||  |
rA1BG      500 SCTSDPVEVVVEGS 513
             ||  |||||  ||  |
hA1BG      482 SELSDPVELLVAES 495
             ||  |||||  ||  |

```

FIGURE 22

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

36/50

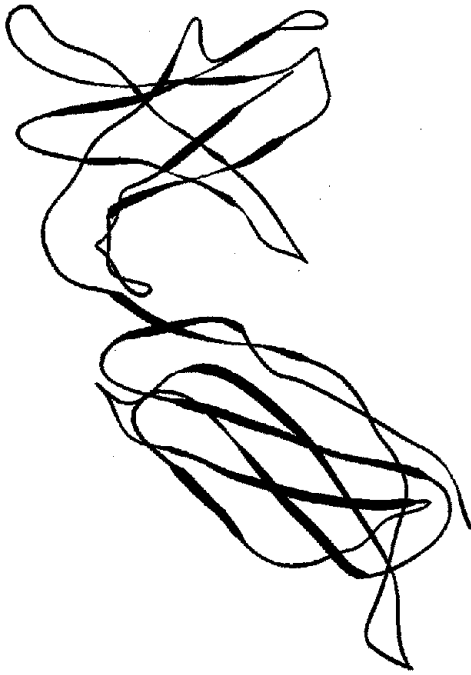


FIGURE 23

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

37/50

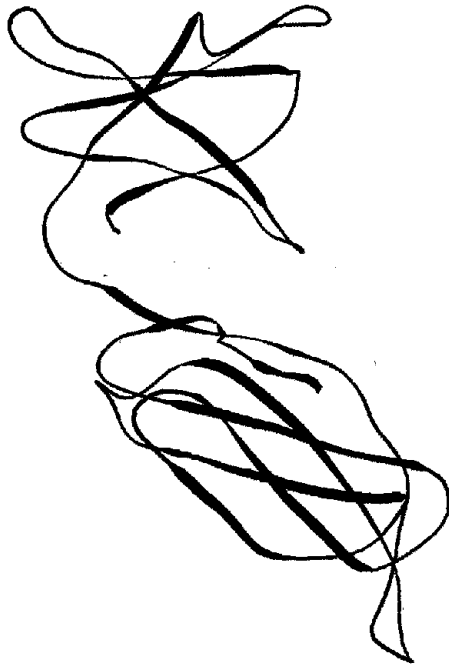


FIGURE 24

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

38/50

-430 TGAACCCACACCTTTGGGTGCACATGTGCAGTGTGGTGTGACAGGAGGGCCTGGCTGGGC
-370 TTCAGCCCCCGGCACTGTCCACTTCACCTCAGCAGCTCCAGGTAGAGTGGGGAGACTCAG
-310 CCTCTCCTTCTAGAACAGCTTCTAGGATCCATCACTGAAATGAGGATGAGGTGGTTTAA
-250 CATCATTTTATCACTCTGTGATTAGTTTATTAAATCATACATGATTATTGATTATAATTGT
-190 TGCTGGGCATCCTGAGGCTCAGAACTTCACCCCTTGGCCCTGACCCCATGGGGCCCTGC
-130 CCCCCTTCGGGAAGGACAAACACGGGAGAGGTGAGTCCCCGACCCACCCACCC
-70 CTCCTTGGGCTCATTCCTGCAGACGCTCACCCTCAGACCTCAGTGCACCCGAGTGAG
-10 CGCGACCATC

FIGURE 25

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

39/50

-1981 GAGAGCGAGACTTCCTCTCAAAAAACAAAAACAAAGAAATTAAGCAAATTAGACATTG
-1921 CAGACAGAACCTGAAGGGGTCAGACACGTACAGATTCTGTGCCAGATGCCAAGTACT
-1861 TCTGAGGCATGACCTGGATGAGCTGTCCACATCTGAAATCATCCAGTCTTGTTCAGAACTT
-1801 TCACACCGGACAGGGAGCCAGGACTGGAATGCAGTCTCCTGTCTACTGGCCAGAGAGTTG
-1741 GCTGACCCCTGAGACCCAGTGGCCAAACAAAGAGCTGCTTAGTCTACCTCCAGGAAATCC
-1681 CAGGTGCTTCTCTCCTGGGAAGTGAATCATTTGGGCGACACTCCGTATTTTCTCCTCTT
-1621 CCCAGGGGAAGGATCCTAGGGCAGTATTGGGAAAGACATGGGCATGGAAGGACACCGGG
-1561 TGAATGCCATAGCCTGCTGCTTCTGAGCTCTCATGGTAAGGCTCTACAGACCGGAAA
-1501 GATGGGGCCACAGGGACGATCAGTAGGGTCAGAGCATCTCAGGGACCGAGGCCAATATG
-1441 GTCTGAGCCAGGGATTAAGAGCTTGGGCTCTCATATGGTGTCTTCTGGGCTCAACTGCCAG
-1381 CTCCATCAGTTACTGGTTGCTGTGACCAATGGGCAAGTTATTCATCTCTCCATATCTTT
-1321 TCCTCAGTTTAAATGGGAATAATGGGTAACCACTCCAGGGTCACAGAGAGGCTTAC
-1261 AGAAAACGATTCCTGTGTAATGGCTTGCAGTAATAATTCAATACCTGCCAGCTATTCTTA
-1201 TTCCACATCCAGGCCCTTTGCGCTGCTGGGTGAAAACACATGTCAGTGTTCCTGAC
-1141 GGTTCACACAAGAGATTCCAAAATTACAACCTGCCAGTCTGAAGAATCTCCAAAACAT
-1081 CCGCAGGCATCCTTGGAGGCGCGGGCTTGGGGATGGGACTGCCCGCCCGGCTCTGAACA

FIGURE 26

-1021 GGAATCGCTGCGCCAGGCACACACACACGCCAGCCTGTGTGTGCGGCCGAGTCCGCT
-961 GCGGTCCCGGGTGAAGCAGCGCTGTGCTGTGTGGCGGGGACAGGCCATTGTTCCGACGGCT
-901 ACCGAGTCCCGCCGCGCTGCGCCGGGAGGAGGCGGGGCTTCGCGGTGCCCGCAAGCTCCA
-841 GATCTTGGGTGGCTGCCACTCTCTCCCTGCCACCGCGCTGGGGGCAAGGAAGACGGGAG
-781 GAGATGTTAGTGGTGGGCGCGCCCGGAGGGTTACCACTGTTTCTCGAGAAACTTCCCA
-721 GTGCGCACCCACCGCTTCTCCGTGTGCGCGAGGGCGGCTCTCGGGCTAGGCTCCCGCGCC
-661 CAGCGCCAAACCGGCTCCGACGCGCTTCCAGAGAGAAAGCTCCCGACCGGGATGCGGG
-601 GCAGAGGCCACGCGCGGCTCGAAGACAGAACTGAGAAGGAGAAACAGAGGGGAGGGGAG
-541 CGAGGAGCTGGGGCAGAGGGACAGCGATTGCGCGGACCGCAATGGCAACGCCAGGAG
-481 AGTGTGCACCAAAATTCCTTCCGCGCAATGACGAGCGGAGGTTTACAGAGGCTCATAGC
-421 ATTTCCCCAGAGGCACGGGACGCGCCAGCGCGCGGTGGTGTGGTGTGGTGTGGGAGC
-361 ATCCCGGCGCGCTGCTGCGGTGCGCGCGAGGCTCGGGCTCTGTCTCTCCCTCCCGCG
-301 CCTTAOCTCGACCGGGACCGCGCGCGCGCAGTCAACTCTCGCACTTGGCCCTGCTTGG
-241 CAGCGGATAAAAGGGGCTGAGGAAATACCGGACCGGTACCGGCTTCCGACGCTAGCC
-181 TTTAAATTCGCGGCTCGGGGACCTCCACGCAACGCGGCTAGCGCGGACCAACGAGCTAGG
-121 TGCAGGCGCGCGGCTCAGCGGCTAACCGGCGGCTTCGAAACCGCGAGTCTCCGCGGAC
-61 CCGGAACTTCGCTCCGAGCCTCAGCGCGCTCGAAAGTGATCCCGGCATC

FIGURE 26 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

41/50

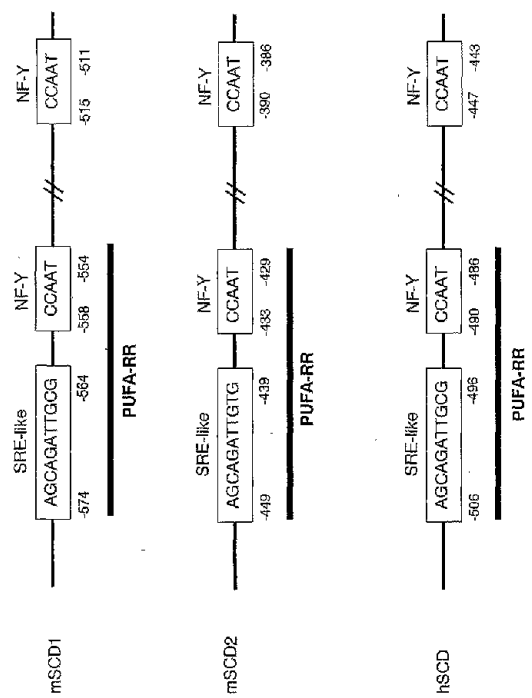


FIGURE 27

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

42/50

5' ATG GAT GAA TCT GCA CTG ACC CTT GGT ACA ATA GAT GTT TCT TAT CTG CCA CAT
M D E S A L T L G T I D V S Y L F H

60 TCA TCA GAA TAC AGT GTT GGT CGA TGT AAG CAC ACA AGT GAG GAA TGG GGT GAG
S S E Y S V G R C K H T S E E W G R

120 TGT GGC TTT AGA CCC ACC ATC TTC AGA TCT GCA ACT TTA AAA TGG AAA GAA AGC
C G F R P T I F R S A T L K W K E S

180 CTA ATG AGT CCG AAA AGG CCA TTT GTT GGA AGA TGT TGT TAC TCC TGC ACT CCG
L M S R K R P F V G R C C Y S C T P

240 CAG AGC TGG GAC AAA TTT TTC AAC CCC AGT ATC CCG TCT TTG GGT TTG CCG AAT
Q S W D K F F N P S I P S L G L R N

300 GTT ATT TAT ATC AAT GAA ACT CAC ACA AGA CAC CGC GGA TGG CTT GCA AGA CCG
V I Y I N E T H T R H R G W L A R R

360 CTT TCT TAC GTT CTT TTT ATT CAA GAG CGA GAT GTG CAT AAG GGC ATG TTT GGC
L S Y V L F I Q E R D V H K G M F A

420 ACC AAT GTG ACT GAA AAT GTG CTG AAC AGC AGT AGA GTA CAA GAG GCA ATT GCA
T N V T E N V L N S S R V Q E A I A

480 GAA GTG GCT GCT GAA TTA AAC CTT GAT GGT TCT GCC CAG CAG CAA TCA AAA GCC
E V A A E L N P D G S A Q Q Q S K A

540 GTT AAC AAA GTG AAA AAG AAA GCT AAA AGG ATT CTT CAA GAA ATG GTT GGC ACT
V H K V K K R A K R I L Q E M V A T

570 GTC TCA CCG GCA ATG ATC AGA CTG ACT GGG TGG GTG CTG CTA AAA CTG TTC AAC
V S P A M I R L T G W V L L K L F N

Figure 28

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

43/50

```

600          630
AGC TTC TTT TGG AAC ATT CAA ATT CAC AAA GGT CAA CTT GAG ATG GTT AAA GCT
S F F W N I Q I H K G Q L E M V K A

560          690
GCA ACT GAG ACG AAT TTG CCG CTT CTG TTT CTA CCA GTT CAT AGA TGC CAG ATT
A T S T N L P L L F L P V H R S H I

720          750
GAC TAT CTG CTG CTC ACT TTC ATT CTC TTC TGC CAT AAC ATC AAA GCA CCA TAC
D Y L L L L T F I L F C H N I K A P Y

780          810
ATT GCT TCA GGC AAT AAT CTC AAC ATC CCA ATC TTC AGT ACC TTG ATC CAT AAG
I A S G N N L N T P I F S T L I H K

840
CTT GCG GCG TTC TTC ATA CGA CGA ACG CTC GAT GAA ACA CCA GAT GGA CGS AAA
L G G F F I R R R L D E T P D G R K

870          900
GAT GGT CTC TAT AGA GCT TTG CTC CAT GCG CAT ATA GGT GAA TTA CTT CGA CAG
D V L Y R A L L H G H I V S L L R Q

930          960
CAG CAA TTC TTG GAG ATC TTC CTG GAA GGC ACA CGT TCT AGG AGT GGA AAA ACC
Q Q F L E I F L E G I R S R S G K T

990          1020
TCT TGT GCT CCG GCA GGA CTT TTG TCA GTT GTG GTA GAT ACT CTG TCT ACC AAT
S C A R A G L L S V V V D T L S T N

1050          1080
GTC ATC CCA GAC ATC TTG ATA ATA CCT GTT GGA ATC TCC TAT GAT CCG ATT ATC
V I P D I L I I P V G I S Y D R I I

1110
GAA GGT CAC TAC AAT GGT GAA CAA CTG GGC AAA CTT AAG AAG AAT GAG AGC CTG
E G H Y N G E Q L G K P K K N R S L

1140          1170
TGG AGT GTA GCA AGA GGT GTT ATT AGA ATG TTA CGA AAA AAC TAT GGT TGT GTC
W S V A R G V I R M L R K N Y G C V

```

Figure 28 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

44/50

1200 1230
CGA GTG GAT TTT GCA CAG CCA TTT TCC TTA ABG GAA TAT TTA GAA AGC CAA AGT
R V D F A Q P F S L K E Y L E S Q S

1260 1290
CAG AAA CCG GTG TCT GCT CTA CTT TCC CTG GAG CAA GCG TTG TTA CCA GCT ATA
Q K P V S A L L S L E Q A L L P A I

1320 1350
CTT CTT TCA AGA CCC AGT GAT GCT GCT GAT GAA GGT AGA GAC ACG TCC ATT AAT
L P S R P S D A A D E G R D T S I N

1380
GAG TCC AGA AAT GCA ACA GAT GAA TCC CTA CCA AGG AGG TTG ATT GCA AAT CTG
B S R N A T D R S L R R R L I A N L

1410 1440
GCT GAG CAT ATT CTA TTC ACT GCT AGC AAG TCC TGT GGC ATT ATG TCC ACA CAC
A E H I L F T A S K S C A I M S T E

1470 1500
ATT GTG GCT TGC CTG CTC CTC TAC AGA CAC AGG CAG GGA ATT GAT CTC TCC ACA
I V A C L L L Y R H R Q G I D L S T

1530 1560
TTG GTC GAA GAC TTC TTT CTG ATG AAA GAG GAA CTC CTG GCT GGT GAT TTT GAC
L V E D F F V M K E E V L A R D F D

1590 1620
CTG GGG TTC TCA GGA AAT TCA GAA GAT GTA GGA ATG CAT GGC ATA CAG CTG CTG
L G F B G H S B D V V M H A I Q L L

1650
GGA AAT TGT GTC ACA ATC ACC CAC ACT AGC AGG AAC GAT GAG TTT TTT ATC ACC
G N C V T I T K T S R N D E F F I T

1680 1710
CCC AGC ACA ACT GTC CCA TCA GTC TTC GAA CTC AAC TTC TAC AGC AAT GGG GTA
P S T T V P S V F E L N F Y S N G V

1740 1770
CTT CAT GTC TTT ATC ATG GAG GCG ATC ATA GCT TGC AGC CTT CAT GCA GTC CTG
L H V F I M E A I I A C S L Y A V L

Figure 28 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

45/50

1800
AAC AAG AAG GGA CTG GGG GGT CCC ACT AGC ACC CCA CCT AAC CTG ATC AGC CAG
N K R G L G G P T S T P P N L I S Q

1830
GAG CAG CTG CTG GGG AAG GCG GCC AGC CTG TGC TAC CTT CTC TCC AAT GAA GGC
E Q L V R K A A S L C Y L L S N E G

1860
ACC ATC TCA CTG CCT TGC CAG ACA TTT TAC CAA GTC TGC CAT GAA ACA GTA GGA
T I S L P C Q T F Y Q V C H E T V G

1890
AAG TTT ATC CAG TAT GGC ATT CTT ACA GTG GCA GAG CAC GAT GAC CAG GAA GAT
K F I Q Y G I L T V A E H D D Q E D

1920
ATC AAT CCT AGT CTT GCT CAG CAG CAG TGG GAC AAG AAG CTT CCA GAA CCT TTG
I S P S L A E Q Q W D K K L P E P L

1950
TCT TGG AGA AGT GAT GAA GAA GAT GAA GAC AGT GAC TTT GCG CAG GAA CAG CGA
S W R S D S E D R D S D F G E E Q R

1980
GAT TGC TAC CTG AAG GTG AGC CAA TCC AAG GAG CAC CAG CAG TTT ATC ACC TTC
D C Y L K V S Q S K E H Q Q F I T F

2010
TTA CAG AGA CTC CTT GGG CCT TTG CTG GAG GCG TAC AGC TCT GCT GCC ATC TTT
L Q R L L G F L L S A Y S S A A I F

2040
GTT CAC AAC TTC AGT GGT CCT GTT CCA GAA CTT GAG TAT CTG CAA AAG TTG CAC
V H N F S G P V P E P E Y L Q K L R

2070
AAA TAC CTA ATA ACC AGA ACA GAA AGA AAT GTT GCA GTA TAT GCT GAG AGT GCG
K Y L I T R T E R N V A V Y A E S A

2100
ACA TAT TGT CTT GTG AAG AAT GCT GTG AAA ATG TTT AAG GAT ATT GGG GTT TTC
T Y C L V K N A V K M F K D I G V F

Figure 28 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

46/50

2400 2430
AAG GAG ACC AAA CAA AAG AGA GTG TGT GTF TTA GAA CTG AGC AGC ACT TTT CTA
K E T E Q K R V S V L E L S S T F L

2460
CCT CAA TGC AAC CGA CAA AAA CTT CTA GAA TAT ATT CTG AGT TTT GTG GCG CTG
P Q C N R Q K L L E Y I L S F V V L

TAG 3'
*

Figure 28 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

47/50

hGPAT 75
 hGPAT 75
 mGPAT 75
 MDESAITGIDVSLPHSEYSGCKIVGKNGGKNTLPSATIAWKSLSKAPFVGCCTCTQSW
 MDESVLQIDVYLNSEYSGCKINVDGCKTIFRSATIAWKSLSKAPFVGCCTCTQSW
 MDESVLQIDVYLNSEYSGCKINVDGCKTIFRSATIAWKSLSKAPFVGCCTCTQSW
 hGPAT 150
 hGPAT 150
 mGPAT 150
 DREPSISGIRNAYTNEPTIRHGTARLSVLTICRUVKCAATNVEKVINSRVCEATVAAS
 EATFNSISLIRNAYTNEPTIRHGTARLSVLTICRUVKCAATNVEKVINSRVCEATVAAS
 EATFNSISLIRNAYTNEPTIRHGTARLSVLTICRUVKCAATNVEKVINSRVCEATVAAS
 hGPAT 225
 hGPAT 225
 mGPAT 225
 NPDSACQSSNNAWLTAKLLOAVATNSKVTGKLTNUKLENSINNOIHCQLENVZATNMLPL
 NPDSACQSSNNAWLTAKLLOAVATNSKVTGKLTNUKLENSINNOIHCQLENVZATNMLPL
 NPDSACQSSNNAWLTAKLLOAVATNSKVTGKLTNUKLENSINNOIHCQLENVZATNMLPL
 hGPAT 300
 hGPAT 300
 mGPAT 300
 FLVHRSHDYLLAFICENIKAPYIASGNINLPESTLHKIGFFIRRELDPQADVYRALHGH
 FLVHRSHDYLLAFICENIKAPYIASGNINLPESTLHKIGFFIRRELDPQADVYRALHGH
 FLVHRSHDYLLAFICENIKAPYIASGNINLPESTLHKIGFFIRRELDPQADVYRALHGH
 hGPAT 375
 hGPAT 375
 mGPAT 375
 VELLQOQFLEFEGTSRSKSCARGLISVWQTSNVVPTIITFVQISNDRIEGHNGQLGKKN
 VELLQOQFLEFEGTSRSKSCARGLISVWQTSNVVPTIITFVQISNDRIEGHNGQLGKKN
 VELLQOQFLEFEGTSRSKSCARGLISVWQTSNVVPTIITFVQISNDRIEGHNGQLGKKN
 hGPAT 450
 hGPAT 450
 mGPAT 450
 ESLNVAIGVIRNIRKTCVYVDAQPSDESDSQQVWZLSLEQIHFAIPERSDAEGPNTSL
 ESLNVAIGVIRNIRKTCVYVDAQPSDESDSQQVWZLSLEQIHFAIPERSDAEGPNTSL
 ESLNVAIGVIRNIRKTCVYVDAQPSDESDSQQVWZLSLEQIHFAIPERSDAEGPNTSL

FIGURE 29

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

48/50

hGPAT 525
iGPAT 525
mGPAT 525
ESNATDESIPRLANLASHIETATACANSTHIVACIATPHAGQDLSHVEDFVMEVAVARDEDAE
ESNAADEAFRRANANARHTPTAKSCANSTHIVACIATPHAGQDLSHVEDFVMEVAVARDEDAE
ESNPADEAFRRANANARHTPTAKSCANSTHIVACIATPHAGQDLSHVEDFVMEVAVARDEDAE
ESNPADEAFRRANANARHTPTAKSCANSTHIVACIATPHAGQDLSHVEDFVMEVAVARDEDAE
hGPAT 600
iGPAT 600
mGPAT 600
SGSENVVHACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACI
SGSENVVHACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACI
SGSENVVHACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACI
SGSENVVHACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACIACI
hGPAT 675
iGPAT 675
mGPAT 675
GPTSTPPHLSQOLVRKASCLLSNCTLSLQDPEYOVHETWCKETQXGILVADHDQDLSPLAQD
GSAGCLHLSQOLVRKASCLLSNCTLSLQDPEYOVHETWCKETQXGILVADHDQDLSPLAQD
GSAGCLHLSQOLVRKASCLLSNCTLSLQDPEYOVHETWCKETQXGILVADHDQDLSPLAQD
GSAGCLHLSQOLVRKASCLLSNCTLSLQDPEYOVHETWCKETQXGILVADHDQDLSPLAQD
hGPAT 750
iGPAT 750
mGPAT 749
YDKLPEFVNRDEDESDCEPQKGCALVSCSCKOQFTEFORHGFMEYSSAIVHNSGEVTPD
YDKLPEFVNRDEDESDCEPQKGCALVSCSCKOQFTEFORHGFMEYSSAIVHNSGEVTPD
YDKLPEFVNRDEDESDCEPQKGCALVSCSCKOQFTEFORHGFMEYSSAIVHNSGEVTPD
YDKLPEFVNRDEDESDCEPQKGCALVSCSCKOQFTEFORHGFMEYSSAIVHNSGEVTPD
YDKLPEFVNRDEDESDCEPQKGCALVSCSCKOQFTEFORHGFMEYSSAIVHNSGEVTPD
hGPAT 825
iGPAT 825
mGPAT 824
XLOKHEVHETERNVAVASATCICVNAVADNDGVKRETCMAVYVLSDEDECONKLIYHLS
XLOKHEVHETERNVAVASATCICVNAVADNDGVKRETCMAVYVLSDEDECONKLIYHLS
XLOKHEVHETERNVAVASATCICVNAVADNDGVKRETCMAVYVLSDEDECONKLIYHLS
XLOKHEVHETERNVAVASATCICVNAVADNDGVKRETCMAVYVLSDEDECONKLIYHLS
XLOKHEVHETERNVAVASATCICVNAVADNDGVKRETCMAVYVLSDEDECONKLIYHLS
hGPAT 828
iGPAT 828
mGPAT 827
XVL 828
XVL 828
XVL 827

FIGURE 29 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

49/50

-34534 TTGGCTCACCTCAGTGGCCCCAGTCAGGCACATCTCTACCAGAGTAGATGCAAAATAAATA
-34474 ACTGTTGAACGAATGCAATTTTACTTAATAGAGGGSTTCCCTTAAGTTCCCTTAAATAT
-34414 TGAGCTCTAAATATCAAGACCCCTTTGAGGGSTTCTCTACAGTCTATAGGGCCCTTAAG
-34354 AGCCTCAGAGGAGGAGAGCGGAGTTTTTATGCCATGTAGTCTTTGCAACAATAAGCAGGA
-34294 AGCGACTGACAGTCTTTAAAGTCACATGGACACAGCTAGCAAGGGCCCTTTATTCGCCCT
-34234 ACACCTTCTTAGTTCCAGAACTACTGTCTTTACTAGAGCTCTTCATTAAGCCGAACAGA
-34174 GCAATAATAGTTTTTGAAAGGGGAGGGTGGCAGCAGCTGCAAGCAGCATGAGNAATAGAG
-34114 AAGACCAAGTCATGACTGCTTAAGACAAATACGAAATGCACATAAAGCAATCCCAACA
-34054 TCTCTCCACAACTTCTCAGGGTCACAGTCAGTGAGCTGCACATCTGCTGTCAAAATAGGC
-33994 TCACCCCATGGGGACCCGAGCCCGGTCAGCCCGAGTCAAACTCCCTTCCCTTCAGCAG
-33934 TCAGAAATGCAAAATGGAAACAGCCAGGCCCGGAGCCTGAGGCCCATGTGACACTCAA
-33874 CCTGTGGACACCTCCGCTGAGAAATGAGGTTACTGAGCTCAGAGCTTTACCCCCACTTAG
-33814 AAAATCCCCACAGGCAATGCCGAGAGACACCATTCATTGCTCATTAAATGTACAA
-33754 GCCCTGAAAATGCATCCAGAGCCTGGGTCTGTTCTCCTTCGAGTCCGAAGGAAGCCTG
-33694 TGAATTGCTGGCCAGCTCAGCCTAGCGGCCCTTATCTCTGACTGGTTATTAATTGATTA
-33634 AAGAGCCTTCCCTCTTTCCGGTGTTCAAAACATGCAATGGGAGAAATTTGCTGCTGCCGG
-33574 GGGACTCTTTCTGAGGTTACTGTGGAGCACCCAAAGTCTGTACCCCTCTGGCCCTGCAAA

FIGURE 30

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

50/50

-33514 CAGGCACCCAGAGGACCAGACCTTGCTTATTCACCCACACCCCTGGACTGTCTTCTCCA
-33454 GAGTCTCCATCAGCTTTGCTAATCGACTGATTGGAATAATTCCCAAAACACCAAGT
-33394 CAAGCATACAGGTATTTAAAAACCTGGGCTGCGAGGAGTAATTTCTTAGGATGTCAATGAC
-33334 ATGAGACACGGGGGTAGGACGAGGAAGCCTGGGAAGCAGCTCGAATGCCAGGAGGGCAG
-33274 ACACAGTAGGAGAGAAAGTCAAGAAAAGAACTCGAATCATGGAATTTCTGCAAG
-33214 GCAAAACAGAGCTCCTTGGGCATAGTTATTTGAGCTGACAGAGGTGCAAGCAGCTTG
-33154 TGATCTAACATTACATCTCTGTGCAATTTGCTCCTCAGAAATCCTTCCCGAGTTTTTGC
-33094 TACTCTTTTGGCTCCATGAAATCCTCCATCCTGGCTCAGAACCCCAATCCTGAGAAG
-33034 GTTTGGACAGTTTATGAAAAATCTAATTGCTTTAGCTTGAAACGTCACCAATCTGATT
-32974 TGCAAACGGCAGATGGCCTTCAAAGGCTCTGCTTAGTAGTACAAATCCTGCTACCAATCC
-32914 TCCTGATGTTGGCTACAGAGGAAGAGGAGGCTGAGAATGCTTTTTATGAAAGTTGA
-32854 TTCCCACTTTAAGATCTCTCTTTAAGGGGTATATTCAATCTTATCCCAGTGAATCCC
-32794 TACTCAGGGTTGTTTTCTGAGCTTGGATCGGCCAGATAGCTTTATGTCAAAGGACTTTCT
-32734 CACTGTAGAGGAAGCTGGGCTCCATATGGGCCAGCAGGATTTAACCATCTGGAATGAA
-32674 GATCAAGACAGCAGAAAAGACAGACTTCATTTCTCTGTAGGTTTGGCTGGAGATGGC
-32614 AGCAGAGGGGAAGATACGATGCAAAACCAAGGAAATCAATACTTTTCTTTTATGATTGAG
-32554 TGGAAAAGGATGTTTTTACG

FIGURE 30 (continued)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

SEQUENCE LISTING

<110> Xenon Genetics Inc.

<120> Pat Regulated Genes, Uses Thereof, and Compounds for Modulating Same

<130> 42320-0007

<140>

<141>

<150> US 60/246,589

<151> 2000-11-17

<160> 90

<170> PatentIn Ver. 2.1.

<210> 1

<211> 933

<212> DNA

<213> rat

<400> 1

```

atggattttg ttgctggggc cattggagga gtctgggtg ttgctgtgg ctacctctg 60
gatacagtga aggtcaaaat ccagactgag gccagttaca caagcatctg gaactgtgtc 120
cgggacaacat atcgtcaaga ggggtgtgtg ggattctaca gaggcctctc actgctgtgt 180
tgcacagctgt ccctgtgtgt atctgtatcc ttctgtacct acccaacatg cctggccac 240
atttgcgctt tccgtacagg cagcaggac gtccagccca ccaaggctga catcaactc 300
tcaggatggg cctctggcct tgtccgggtg ttctgacgt caccactga ggtggccaaa 360
gtccgctctg agacacaggc caaatctag acacagcagc ggcgacctc ggcctctgg 420
acatctgtgg ctcccgcttt gtgtccagca cccactggtt gcttgagcc caggcctaag 480
taccgtgggc cactacattt tttagtcaca gtggcccgag aggggggtct ggcgggactc 540
tacaaggcca gctcgctctt actccttcgt gaaggccact cctttgccac ctactttctc 600
tcctatgctg tgcctctgga gtggctcacc cctgtggccc agagtacgc agatgtctta 660
gggtgtgctg tggctggagg ctgtgcgggg gtccctggcc gggctgtggc taagcccatg 720
gaogttatca agtcccgctt gcaggcgat gggcagggcc agcagcgcta ccggggcctc 780
ctgcactgtg tggtagccag cgtgcgggag gagggtccca gagtgtcttt caagggactg 840
gcactcaact gctgcgggc ctttctgtc aacatgggtg tcttcgtggc ttatgaggt 900
gtgtgagggc taactcaggc cctgctcaca tag 933

```

<210> 2

<211> 310

<212> PRT

<213> rat

<400> 2

```

Met Asp Phe Val Ala Gly Ala Ile Gly Gly Val Cys Gly Val Ala Val
1      5      10      15
Gly Tyr Pro Leu Asp Thr Val Lys Val Lys Ile Gln Thr Glu Ala Lys
20     25     30
Tyr Thr Ser Ile Trp His Cys Val Arg Asp Thr Tyr Arg Gln Glu Arg
35     40     45     50
Leu Trp Gly Phe Tyr Arg Gly Leu Ser Leu Pro Val Cys Thr Val Ser
55     60

```

1/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Leu Val Ser Ser Val Ser Phe Gly Thr Tyr His His Cys Leu Ala His
 65 70 75 80
 Ile Cys Arg Phe Arg Tyr Gly Ser Thr Asp Val Lys Pro Thr Lys Ala
 85 90 95
 Asp Ile Thr Leu Ser Gly Cys Ala Ser Gly Leu Val Arg Val Phe Leu
 100 105 110
 Thr Ser Pro Thr Glu Val Ala Lys Val Arg Leu Gln Thr Gln Ala Gln
 115 120 125
 Ser Gln Thr Gln Gln Arg Arg Pro Ser Ala Ser Trp Thr Ser Val Ala
 130 135 140
 Pro Ala Leu Cys Pro Ala Pro Thr Ala Cys Leu Glu Pro Arg Pro Lys
 145 150 155 160
 Tyr Ser Gly Pro Leu His Cys Leu Val Thr Val Ala Arg Glu Glu Gly
 165 170 175
 Leu Arg Gly Leu Tyr Lys Gly Ser Ser Ala Leu Leu Leu Arg Glu Gly
 180 185 190
 His Ser Phe Ala Thr Tyr Phe Leu Ser Tyr Ala Val Leu Ser Glu Trp
 195 200 205
 Leu Thr Pro Ala Gly Gln Ser Gln Pro Asp Val Leu Gly Val Leu Val
 210 215 220
 Ala Gly Gly Cys Ala Gly Val Leu Ala Trp Ala Val Ala Thr Pro Met
 225 230 235 240
 Asp Val Ile Lys Ser Arg Leu Gln Ala Asp Gly Gln Gly Gln Gln Arg
 245 250 255
 Tyr Arg Gly Leu Leu His Cys Val Val Thr Ser Val Arg Glu Glu Gly
 260 265 270
 Pro Arg Val Leu Phe Lys Gly Leu Ala Leu Asn Cys Cys Arg Ala Phe
 275 280 285
 Pro Val Asn Met Val Val Phe Val Ala Tyr Glu Ala Val Leu Arg Leu
 290 295 300
 Thr Gln Gly Leu Leu Thr
 305 310

<210> 3
 <211> 927
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 atggattttg tgcctgggac catcggagac gtctggcgtg ttgctgtggg ctaccccttg 60
 gacacgggtga aggtcaggat ccagacggag ccaaaataca caggcatctg gcactgcgtc 120
 cgggatacgt atcaccgaga gcgcgtgtgg ggcttctacc ggggcctctc gctgcctgtg 180
 tgcacgggtgt cctcgtatc ttcgtgtct ttggcact acctccactg cctgggcac 240

2/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

atctgcgggc tccggtaagg caaccctgac gccaaagcca ccaaggccga catcacgctc 306
 tccggatggc cctccggcct cgtccgcgtg ttcttgagct cgcctactga ggtggccaaa 360
 gtccgcttgc agacgcagac acagggcgag aagcagcagc ggccgcttcc ggcttcgggg 420
 ccgttggtcg tgcctcccat ggtccctgtg ccccaagcct gccagagacc caagtaccgc 480
 gggccactgc actgcctggc cagggtagcc cggaggaggg ggctgtggcg cctctacaag 540
 ggcagatcgg acctggcttc acgggagggc cactcccttg ccactactct cctttccac 600
 gggtctctct ggcgtggctt agccctgctt ggcacagccc ggccagatgt ccggggcg 660
 ctggtggccg ggggtctgtc aggagtcctg gcttggggtg tggccacccc catggagctg 720
 atcaagtoga gactgcaggc agacggggag ggtcggagtc gctacggggg tctctgac 780
 tgtatggtga ccagcttgc agaggagga ccccggtccc ttttcagggg gctggtactc 840
 aattgtgccc ggcctttccc tgcacacatg gtggctctcg tgcctatga ggcagtgctg 900
 aggtcgccc ggggtctgct cacatag 927

<210> 4
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Met Asp Phe Val Ala Gly Ala Ile Gly Val Cys Gly Val Ala Val
 1 5 10 15
 Gly Tyr Pro Leu Asp Thr Val Lys Val Arg Ile Gln Thr Glu Pro Lys
 20 25 30
 Tyr Thr Gly Ile Trp His Cys Val Arg Asp Thr Tyr His Arg Glu Arg
 35 40 45
 Val Trp Gly Phe Tyr Arg Gly Leu Ser Leu Pro Val Cys Thr Val Ser
 50 55 60
 Leu Val Ser Ser Val Ser Phe Gly Thr Tyr Arg His Cys Leu Ala His
 65 70 75 80
 Ile Cys Arg Leu Arg Tyr Gly Asn Pro Asp Ala Lys Pro Thr Lys Ala
 85 90 95
 Asp Ile Thr Leu Ser Gly Cys Ala Ser Gly Leu Val Arg Val Phe Leu
 100 105 110
 Thr Ser Pro Thr Glu Val Ala Lys Val Arg Leu Gln Thr Gln Thr Gln
 115 120 125
 Ala Gln Lys Gln Gln Arg Arg Leu Ser Ala Ser Gly Pro Leu Ala Val
 130 135 140
 Pro Pro Met Cys Pro Val Pro Pro Ala Cys Pro Glu Pro Lys Tyr Arg
 145 150 155 160
 Gly Pro Leu His Cys Leu Ala Thr Val Ala Arg Glu Glu Gly Leu Cys
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Lys Gly Ser Ser Ala Leu Val Leu Arg Asp Gly His Ser
 180 185 190
 Phe Ala Thr Tyr Phe Leu Ser Tyr Ala Val Leu Cys Glu Trp Leu Ser
 195 200 205
 Pro Ala Gly His Ser Arg Pro Asp Val Pro Gly Val Leu Val Ala Gly

3/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

210 215 220
Gly Cys Ala Gly Val Leu Ala Trp Ala Val Ala Thr Pro Met Asp Val
225 230 235 240
Ile Lys Ser Arg Leu Gln Ala Asp Gly Gln Gly Gln Arg Arg Tyr Arg
245 250 255
Gly Leu Leu His Cys Met Val Thr Ser Val Arg Glu Glu Gly Pro Arg
260 265 270
Val Leu Phe Lys Gly Leu Val Leu Asn Cys Cys Arg Ala Phe Pro Val
275 280 285
Asn Met Val Val Phe Val Ala Tyr Glu Ala Val Leu Arg Leu Ala Arg
290 295 300
Gly Leu Leu Thr
305
<210> 5
<211> 1500
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5
tggccttggg tgggccaatt cccgcccttt gccctctgcc gtggcagctg gcactgctca 60
tccctgtctc cccacttgcc tataaatagc cgggctggca ggggggctgt cccctccatca 120
gctctcagcc tggccaaggc cagctcagcc gtccagccat tagaggacag gaaaaacagg 180
agacaaagag cctcctggcc ttggcaactg tcccgaggcg tggcagatg ggtgagctgg 240
gcctcatgca tcaacacttg cccctccctc atcctgctgg cattccagtc tgtggggcac 300
tcacttagat tctgttgctc agcagctgtg tggcagaggt acctccacag cctccctgag 360
ccttggtgtc tccgtggag atctccaaag gatgcagtc aggtccacat gggcatgac 420
tgagtcacct tgagagccct ctggggccct cccaggcggg cctggatata ccagagggtg 480
gggtgtatga gagcatctgg ggatccatc cagccctgcc gctctgtgg ccttggacaa 540
gcccccttc tgggctcaca tggccccato tgtgaaatgg ggagcactaa cgttgcgctg 600
tctccctcct ggggcggtga ggagatcct agagcctgag agtaggggga gcttgatgaa 660
ctgttaggtg ggggtgcagg gcaaggaggt cctgtttttt acagtgcaca gcagacagaa 720
gtagcgtctt agtggagagg ttcccccctc agggggggcc cagccgctgg tccagagggt 780
gaatggag cctctgtccc tggctcatgt gggcaggggg acttggtgga ggcagccttg 840
gccttcgctc ctgggtccag ggggacacat tcccatggag cagagactag ggaaccggg 900
caccgggaag ggtgagagca gatggtgggt gctgttctgt ggttcagccc tgtccttgc 960
acccctccc tccctgccaa ctggagctcc ttgaggacag ggaactggct tcaatttgc 1020
gggtgtagca tcaagcaagt aagtgttttt tgagttagta agagaggag ctttgcaggt 1080
ttccagggca ggggtcctga gcaaatcng gggagtggg aaagcccgag ggcacacagt 1140
aaggcctggg cctggacttg gaggggcaga gctgtcacag ccccatctct ggcctctccc 1200
aggaggtggt tggatgtgat ggggcagtc cctgtctctc tgggtgctgt caccctccgt 1260
gctctctcct gtattttcct gacacctggg tcccgaggcg actgggacaa gggctccggg 1320
ggcagggggg agtccagct gtgtgcggcg tggcctcagc aggtctgct tccggtccc 1380
tccctggcg caggtatlla aggtctgaga ggggcagct gggagctgt gaggccccc 1440
tggtggacc aagccctct caggcaggca gaccagggg cccccgca caccctgttc 1500
<210> 6
<211> 684
<212> DNA
<213> rat
<400> 6

4/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

```

atgtttgagc ccaagagctg caccacacac taccctgtgg gtgaccggga ctcacgaga 60
gccatcttga tcgaccctgt tctggagaca gccaccggg atgctcagct gattaaggag 120
ctggggctga agctgctcta tgggtgagac acccactgac atgctgacat catcacgggc 180
tcaggggctt tccgacccct cctccgggc tctcagtcgg tcatctctcg cctcagcgga 240
gctcaggctg atttgcatac cggggaaggt gattccatcc cctttggacg ctttgettlg 300
gagactcggg ccagccctgg coacccccca ggtgtgtgca cctttgtcct gaattgcccag 360
agcagggctt tcaatggaga tgcctactgt atccgggggt gtggaagAAC agacttccaa 420
caaggttggc cgaagacttt gtaccactca gtagacgaga agactttcac acttccaggc 480
aactgtctaa tctaccctgc tcatgattac caagggtgca cagttttcac tctggaggag 540
gaacggactc tgaacccacg gctacatctc agctgtgagc agttttatca ggtcatggac 600
aacttgactc tgcacaagcc aactcagata gacattggcg ttcctgcaaa tatggctgt 660
ggggctccaga ctccacctc ctga 684

```

```

<210> 7
<211> 227
<212> PRT
<213> Rat

```

```

<400> 7
Met Phe Glu Pro Lys Ser Cys Thr Tyr Thr Leu Leu Gly Asp Arg
1 5 10 15
Asp Ser Arg Glu Ala Ile Leu Ile Asp Pro Val Leu Glu Thr Ala His
20 25 30
Arg Asp Ala Gln Leu Ile Lys Glu Leu Gly Leu Lys Leu Leu Tyr Ala
35 40 45
Val Asn Thr His Cys His Ala Asp His Ile Thr Gly Ser Gly Val Leu
50 55 60
Arg Ser Leu Leu Pro Gly Cys Gln Ser Val Ile Ser Arg Leu Ser Gly
65 70 75 80
Ala Gln Ala Asp Leu His Ile Gly Glu Gly Asp Ser Ile Pro Phe Gly
85 90 95
Arg Phe Ala Leu Glu Thr Arg Ala Ser Pro Gly His Thr Pro Gly Cys
100 105 110
Val Thr Phe Val Leu Asn Asp Gln Ser Met Ala Phe Thr Gly Asp Ala
115 120 125
Leu Leu Ile Arg Gly Cys Gly Arg Thr Asp Phe Gln Gln Gly Cys Ala
130 135 140
Lys Thr Leu Tyr His Ser Val His Glu Lys Ile Phe Thr Leu Pro Gly
145 150 155 160
Asn Cys Leu Ile Tyr Pro Ala His Asp Tyr His Gly Leu Thr Val Ser
165 170 175
Thr Val Gln Glu Glu Arg Thr Leu Asn Pro Arg Leu Thr Leu Ser Cys
180 185 190
Glu Glu Phe Ile Lys Val Met Asp Asn Leu Asn Leu Pro Lys Pro His
195 200 205
Gln Ile Asp Ile Ala Val Pro Ala Asn Met Arg Cys Gly Val Gln Thr
5/35

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

210 215 220

Pro Pro Ser
225

<210> 8
<211> 684
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
atgttcgagc ctgtgagctg cacccttcacg tacctgtctgg gtgacagaga gtcccgaggag 60
gccgttctga togacccagt cctggaacaa gcccttcggg atgcccagct gatcaaggag 120
ctggggctgc ggtgtctcta tctgtgaaat acccactgcc acgaggacca cattacaggc 180
tcggggctgc tccgttcctt cctccctggc tgcagctctg tcabctcccg ccttagtggg 240
gcccaggctg ccttaacat tgaggatgga gactctatcc gcttcggggc cttcgctgtg 300
gagaccaggc ccagccctgg ccacacccaa ggtgtgtgta ccttcgtctt gaatgaccac 360
agcatggcct tcactggaga tgcctgttg atcctgggt gtggcgagac agacttccac 420
caaggctgtg ccagacatt gtaccactcg gtccatgaaa agacttccac acttccaggc 480
gactgtctga tctaccctgc tccagattac catgggttca cagtgtccac cgtggaggag 540
gagaggactc tgaacccctg gctcaccctc agctgtgagg agtttgtcaa aatcatgggc 600
aacctgaact tgcctaaacc tcagcagata gactttgtct ttccagccaa catgcgctgt 660
gggtgcaga caccactgc ctga 684

<210> 9
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Met Phe Glu Pro Val Ser Cys Thr Phe Thr Tyr Leu Leu Gly Asp Arg
1 5 10 15
Glu Ser Arg Glu Ala Val Leu Ile Asp Pro Val Leu Glu Thr Ala Pro
20 25 30
Arg Asp Ala Gln Leu Ile Lys Glu Leu Gly Leu Arg Leu Leu Tyr Ala
35 40 45
Val Asn Thr His Cys His Ala Asp His Ile Thr Gly Ser Gly Leu Leu
50 55 60
Arg Ser Leu Leu Pro Gly Cys Gln Ser Val Ile Ser Arg Leu Ser Gly
65 70 75 80
Ala Gln Ala Asp Leu His Ile Glu Asp Gly Asp Ser Ile Arg Phe Gly
85 90 95
Arg Phe Ala Leu Glu Thr Arg Ala Ser Pro Gly His Thr Pro Gly Cys
100 105 110
Val Thr Phe Val Leu Asn Asp His Ser Met Ala Phe Thr Gly Asp Ala
115 120 125
Leu Leu Ile Arg Gly Cys Gly Arg Thr Asp Phe Gln Gln Gly Cys Ala
130 135 140
Lys Thr Leu Tyr His Ser Val His Glu Lys Ile Phe Thr Leu Pro Gly
6/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

PCT/CA01/01632

[illegible]

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

aagactgtga aagaagaccc cgtgcagct gacagtgtct acgcagccag tcagatgct 1260
 tccgaagcc tctgttttta tgatgatggg gcaggctcct ggaagatgg ccacagagt 1320
 gctctactgc ctgtggagcc ccagaagcc tgggagctca aacggggggg accagcagag 1380
 ccgagggccc aggaccacat ccgacatgac catgaggaca gaatccacga gacacccaag 1440
 tacttgagag agacctggcc agaggatacc gaggacaatg ggcacagccc caatttctcc 1500
 caccacaagg atggtttcca cgacagggat ctggggccca acaccaccat caaatctctc 1560
 tag 1563

<210> 12
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> rat

<400> 12
 Met Asp Ala Val Leu Glu Pro Phe Pro Ala Asp Arg Leu Phe Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Phe Leu Asp Leu Gly Asp Leu Asn Glu Ser Asp Phe Leu Asn
 20 25 30
 Asn Ala His Phe Pro Glu His Leu Asp His Phe Val Glu Asn Met Glu
 35 40 45
 Asp Phe Ser Asn Asp Leu Phe Ser Ser Phe Phe Asp Asp Pro Val Leu
 50 55 60
 Asp Glu Lys Ser Pro Leu Leu Asp Met Glu Leu Asp Ser Pro Ala Pro
 65 70 75 80
 Gly Ile Gln Ala Glu His Ser Tyr Ser Leu Ser Gly Asp Ser Ala Pro
 85 90 95
 Gln Ser Pro Leu Val Pro Val Lys Met Glu Asp Thr Thr Gln Asp Met
 100 105 110
 Glu His Gly Ala Trp Ala Leu Gly Asn Lys Leu Cys Ser Ile Met Val
 115 120 125
 Lys Gln Glu Gln Ser Pro Glu Leu Pro Val Asp Pro Leu Ala Ala Ser
 130 135 140
 Ser Ala Met Ala Ala Thr Met Ala Thr Pro Pro Leu Leu Gly Leu
 145 150 155 160
 Ser Pro Ile Ser Arg Leu Pro Ile Pro His Gln Ala Pro Gly Glu Met
 165 170 175
 Thr Gln Leu Pro Val Ile Lys Ala Glu Pro Pro Glu Met Ser Gln Phe
 180 185 190
 Leu Lys Val Thr Gln Glu Asp Leu Val Gln Met Pro Pro Thr Pro Pro
 195 200 205
 Ser Ser His Gly Ser Asp Ser Asp Gly Ser Gln Ser Pro Arg Ser Leu
 210 215 220
 Pro Pro Ser Ser Pro Val Arg Pro Met Ala Arg Ser Ser Thr Ala Ile
 225 230 235 240

8/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Ser Thr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Pro His Lys Leu Gln Gly Thr Ser
 245 250 255
 Gly Pro Leu Leu Leu Thr Glu Glu Glu Lys Arg Thr Leu Ile Ala Glu
 260 265 270
 Gly Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Leu Pro Leu Thr Lys Ala Glu Glu Lys
 275 280 285
 Ala Leu Lys Arg Val Arg Arg Lys Ile Lys Asn Lys Ile Ser Ala Gln
 290 295 300
 Glu Ser Arg Arg Lys Lys Lys Glu Tyr Val Glu Cys Leu Glu Lys Lys
 305 310 315 320
 Val Glu Thr Tyr Thr Ser Glu Asn Asn Glu Leu Trp Lys Lys Val Glu
 325 330 335
 Thr Leu Glu Thr Ala Asn Arg Thr Leu Leu Gln Gln Leu Gln Lys Leu
 340 345 350
 Gln Thr Leu Val Thr Ser Lys Ile Ser Arg Pro Tyr Lys Met Ala Ala
 355 360 365
 Thr Gln Thr Gly Thr Cys Leu Met Val Ala Ala Leu Cys Phe Val Leu
 370 375 380
 Val Leu Gly Ser Leu Ala Pro Cys Leu Pro Ala Phe Ser Ser Gly Ser
 385 390 395 400
 Lys Thr Val Lys Glu Asp Pro Val Ala Ala Asp Ser Val Tyr Ala Ala
 405 410 415
 Ser Gln Met Pro Ser Arg Ser Leu Leu Phe Tyr Asp Asp Gly Ala Gly
 420 425 430
 Ser Trp Glu Asp Gly His Arg Gly Ala Leu Leu Pro Val Glu Pro Pro
 435 440 445
 Glu Gly Trp Glu Leu Lys Pro Gly Gly Pro Ala Glu Pro Arg Pro Gln
 450 455 460
 Asp His Leu Arg His Asp His Ala Asp Ser Ile His Glu Thr Thr Lys
 465 470 475 480
 Tyr Leu Arg Glu Thr Trp Pro Glu Asp Thr Glu Asp Asn Gly Ala Ser
 485 490 495
 Pro Asn Phe Ser His Pro Lys Glu Trp Phe His Asp Arg Asp Leu Gly
 500 505 510
 Pro Asn Thr Thr Ile Lys Leu Ser
 515 520

<210> 13
 <211> 1560
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 13
 atggagcgcg tcttggaaac ctccccggcc gacagctgt tccccggatc cagcttctctg 60
 gacttggggg atctgaacga gtcggacttc ctcaacaatg cgcactttcc cgagacacttg 120
 gacctcttta cggagaacat ggaggacttc tccaatgauc tgttcagcag cttttttgat 180
 gacctgtgtc tggatgagaa gagccctcta ttggacatgg aactggactc cctcaccgca 240
 ggcatccagg cggagcacag ctactccctg agcggcgact cagcgcacca gagccccctt 300
 gtagccatga agatggagga caccacccaa gatgcagagc atggagcatg ggcgtctgga 360
 caaaaactgt gctccatcat gg-gaagcag gagcagagcc cggagctgct cgtggacctt 420
 ctggctgccc cctcggccat ggctggcgcg gcgcgcatgg caccacccc gctgtctgag 480
 ctccagccctt tgtccaggct gccatccccc caccagctcc cgggagagat gactcagctg 540
 ccagtgatca aagcagaguc ttggagggtg aaccagttcc tcaaatgac accggaggac 600
 ctggtgcaga tgcctccagc gcccccacgc agccatggca gtgacgcga cggctccagc 660
 agtccccctt ctctgcctcc ctccagccct gtcaggccca tggcgcgctc ctccacggcc 720
 atctccactt cccactcctt cactgcccc cacaattac aggggacatc agggccctgt 780
 ctctgcacag aggaggagaa gcggacccct attgtgagg gctaccccat cccacaaaa 840
 ctccccctca ccaaaagcga ggagaaggcc ttgaagagag tccggaggaa aatcaagaac 900
 aagatctccag cccaggagag cgtcgttaag aagaaggagt atgtggagtg tctagaaaa 960
 aagtgagaa catttcaatc tgagacactt gaactgtgga agaaggtgga gacctggag 1020
 aatgcacaa ggacctctct ccagcagctg cagaacctcc agactctggt caccacag 1080
 atctccagac cttacaagat ggccgcaccc cagactggga cctgctctat gttggcagcc 1140
 ttgtctcttg ttctgtgctt gggctccctc gtgccttgcc ttcctcagtt ctctccggc 1200
 tccagacttg tgaaggagaa ccccttgctc gcagacggcg tctacacggc cagcagatg 1260
 cctcccgcaa gctctctatt ctacgatgac gggcgaggct tatgggagaa tggccgcagc 1320
 accctgctgc ccatggagcc ccagatggc tgggaaatca accccggggg gccggcagag 1380
 cagcggcccc gggacacact gcagcatgat cactgggaca gacccacga gaccacacag 1440
 taactgagtg aggcctggca taagaagggt ggaacaggca ccggcccca cctctccac 1500
 tccaaggagt ggttccacga cagggatctg ggcccaaca caccatcaa actctctag 1560

<210> 14
 <211> 519
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Met Asp Ala Val Leu Glu Pro Phe Pro Ala Asp Arg Leu Phe Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Phe Leu Asp Leu Gly Asp Leu Asn Glu Ser Asp Phe Leu Asn
 20 25 30
 Asn Ala His Phe Pro Glu His Leu Asp His Phe Thr Glu Asn Met Glu
 35 40 45
 Asp Phe Ser Asn Asp Leu Phe Ser Ser Phe Phe Asp Asp Pro Val Leu
 50 55 60
 Asp Glu Lys Ser Pro Leu Leu Asp Met Glu Leu Asp Ser Pro Thr Pro
 65 70 75 80
 Gly Ile Glu Ala Glu His Ser Tyr Ser Leu Ser Gly Asp Ser Ala Pro
 85 90 95
 Gln Ser Pro Leu Val Pro Ile Lys Met Glu Asp Thr Thr Gln Asp Ala
 100 105 110
 Glu His Gly Ala Trp Ala Leu Gly His Lys Leu Cys Ser Ile Met Val
 115 120 125
 Lys Gln Glu Gln Ser Pro Glu Leu Pro Val Asp Pro Leu Ala Ala Pro

10/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

```

130          135          140
Ser Ala Met Ala Ala Ala Ala Met Ala Thr Thr Pro Leu Leu Gly
145          150          155
Leu Ser Pro Leu Ser Arg Leu Pro Ile Pro His Gln Ala Pro Gly Glu
165          170          175
Met Thr Gln Leu Pro Val Ile Lys Ala Glu Pro Leu Glu Val Asn Gln
180          185          190
Phe Leu Lys Val Thr Pro Glu Asp Leu Val Gln Met Pro Pro Thr Pro
195          200          205
Pro Ser Ser His Gly Ser Asp Ser Asp Gly Ser Glu Ser Pro Arg Ser
210          215          220
Leu Pro Pro Ser Ser Pro Val Arg Pro Met Ala Arg Ser Ser Thr Ala
225          230          235
Ile Ser Thr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Pro His Lys Leu Gln Gly Thr
245          250          255
Ser Gly Pro Leu Leu Leu Thr Glu Glu Glu Lys Arg Thr Leu Ile Ala
260          265          270
Glu Gly Tyr Pro Ile Pro Thr Lys Leu Pro Leu Thr Lys Ala Glu Glu
275          280          285
Lys Ala Leu Lys Arg Val Arg Arg Lys Ile Lys Asn Lys Ile Ser Ala
290          295          300
Gln Glu Ser Arg Arg Lys Lys Lys Glu Tyr Val Glu Cys Leu Glu Lys
305          310          315
Lys Val Glu Thr Phe Thr Ser Glu Asn Asn Glu Leu Trp Lys Lys Val
325          330          335
Glu Thr Leu Glu Asn Ala Asn Arg Thr Leu Leu Gln Gln Leu Gln Lys
340          345          350
Leu Gln Thr Leu Val Thr Asn Lys Ile Ser Arg Pro Tyr Lys Met Ala
355          360          365
Ala Thr Gln Thr Gly Thr Cys Leu Met Val Ala Ala Leu Cys Phe Val
370          375          380
Leu Val Leu Gly Ser Leu Val Pro Cys Leu Pro Glu Phe Ser Ser Gly
385          390          395          400
Ser Gln Thr Val Lys Glu Asp Pro Leu Ala Ala Asp Gly Val Tyr Thr
405          410          415
Ala Ser Gln Met Pro Ser Arg Ser Leu Leu Phe Tyr Asp Asp Gly Ala
420          425          430
Gly Leu Trp Glu Asp Gly Arg Ser Thr Leu Leu Pro Met Glu Pro Pro
435          440          445
Asp Gly Trp Glu Ile Asn Pro Gly Gly Pro Ala Glu Gln Arg Pro Arg

```

11/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

```

450          455          460
Asp His Leu Gln His Asp His Leu Asp Ser Thr His Glu Thr Thr Lys
465          470          475          480
Tyr Leu Ser Glu Ala Trp Pro Lys Asp Gly Gly Asn Gly Thr Ser Pro
485          490          495
Asp Phe Ser His Ser Lys Glu Trp Phe His Asp Arg Asp Leu Gly Pro
500          505          510
Asn Thr Thr Ile Lys Leu Ser
515

<210> 15
<211> 883
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
gtcaaaaaaa tagtaataat aataaataaa attttataaa agctgaaaaa ctcccccggt 60
ggggggagat ctgttgaggg gactgtgaaa tggattcccc tgactggggt tgggagcagg 120
tttagtataa ggctggaagg atggaatatag ctccctcacc aatttacggg acagtgggtg 180
gtgaagcgtt aaatgccaaa tgttccagga acactgttat cggttccagg actattgttg 240
ctttaagccc ccaccttgag cattccagaga agagagatta ctgaagacgaa gttgcagatg 300
tctcttataa aaaggagaga ggatttcctcg agccnngccc tctttctcatt aatattaaat 360
tctttgtgat attgatgtgg gggcgtggcg ccttggccag ctgggctagc cagccagggg 420
ttcccggttt caccagagag aaagttaacg aagacgtgag gaggagagag cagagacaga 480
ggagagggcg gcagccaccc agtctcgggg gacgacttag ctcccccgcc ccggctccca 540
ccctgtccgg ggggctcccg aagccclcag ccccaacctc gggctcccca tggagccag 600
ctgtgcccga ggaggagcag gaggaggtgg agtcggctga atgcccaggg tggcccccgg 660
gcccctgagc ccctcccgct cctagccgct gccctaaggc ccttgccgag ccgcgcccgc 720
ccacccgggg ccgcgcgcgc cctgtccgcc cctccccggc ggcttccgcc cggacccggc 780
cccccccggt ttccagagc tcaggcagga gctctggact gggcgcgccg ccgccttggg 840
gtgagggagc ccagtggaag ggggggtccc gggcccggtg gcg 883

<210> 16
<211> 1542
<212> DNA
<213> rat

<400> 16
atgtctctgt tgactactgt actactcttc tgggggttca ctctggggcc aggaatgtct 60
cttctggcttg attctggcag tgaacctgaa ctacgggcag agcctcaatc cttgctggaa 120
ccctggggcaa acctcaacct ggtctgtgca gtctgattgc ctaccaaggt cttcgagcgtg 180
atcatgaatg ggtggttctt gagtcaagtc cgaactggaga caccgggtgt gtcatatcgc 240
ttttccctgg gggccattac aagtaaccaac agtggcgctt accgtggccc atgtggcggtg 300
gaacccccct ttgacattca actgocagcg ctgagcaagt ggacaaatgt naggcctgt 360
ttgaggtgta cagggaaga gacattgctt cccacctcag ctcaagctga tccagttctc 420
tggatcacac ctggtggcct gccctgtctac atcatgtgcc ggggtgccat ggaagtgta 480
acctaacctg tgaggagaga aggggtggat ggtacccaga aacctgatgt ccagacacag 540
ggagagcgtg gctttctaat ctacaagcct ggtactaca gctgcagcta cctaaccat 600
gcaggaggca aacctctgta gccacgtgct attgtgacca tcaagatgtu tgcacacacg 660
cttccaccca gtctgtgttt aatgggaagt taactaacga tctaccccca gaagacacat 720
gagacgcttg cttgcaaacg tcttnggaat gacgcgcaat tccaaactcag caaaggagag 780
aggggtgctga atattcaagg gtccagcccc accagagatg ctaccatata ctatgtgaac 840
ttgagggaac tggataacca aagtcctttt acctgccgct accgtatgca caaatatctg 900
catgtttggt cggaggacag caagcccgtg gagtgatgt ggagtgaaga gaaactacca 960

```

12/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

gcccgggac tcaatgcaga gccatcaag: cacaacctgg agcctgggtc aacagtgcag 1020
 ctctgatgta ctgcacacaa ggtgggcttg cgttttggcc tgcacggcca gggcaaacra 1080
 gatctagtgg tggcgagat gctgaattcg tctgggagcc aagctgtctt tggcctgcac 1140
 aatatctcaa caatcgactc tggcaactac agttgtatct acatggaaca agcaccaccc 1200
 ttctcaggat ctgcttccag tggccttra gagctgggga taaatgggccc agcaccacag 1260
 ccaaggctgg aagctctgtg gaagggcaag gttctctctg gccatgaagc catctttcaa 1320
 tgcctggccc atgtgcccag ggtcagcatg gagctgggtac gtgagggtct taaaacaccc 1380
 ttctggatgg cttaacacac aagcaacctc gcttttctga agcgtctctt cgtgggtccc 1440
 caacatacag gcaactacag ctgcogctat actgcccgtg cacccttcaac abttgaatca 1500
 gggatccagt accctgtgga agttgtagta gaaggtagct aa 1542

<210> 17
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> rat

<400> 17
 Met Ser Leu Leu Thr Thr Val Leu Leu Leu Trp Gly Phe Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Pro Gly Asn Ala Leu Trp Leu Asp Ser Gly Ser Glu Pro Glu Leu Arg
 20 25 30
 Ala Glu Pro Gln Ser Leu Leu Glu Pro Trp Ala Asn Leu Thr Leu Val
 35 40 45
 Cys Ala Val Asp Leu Pro Thr Lys Val Phe Glu Leu Ile Met Asn Gly
 50 55 60
 Trp Phe Leu Ser Gln Val Arg Leu Glu Thr Pro Val Leu Ser Tyr Arg
 65 70 75 80
 Phe ser Leu Gly Ala Ile Thr Ser Asn Asn Ser Gly Val Tyr Arg Cys
 85 90 95
 Arg Cys Gly Val Glu Pro Pro Val Asp Ile Gln Leu Pro Ala Leu Ser
 100 105 110
 Lys Trp Thr Met Leu Ser Asn Ala Leu Glu Val Thr Gly Lys Glu Pro
 115 120 125
 Leu Pro Pro Pro Ser Ala His Ala Asp Pro Val Ser Trp Ile Thr Pro
 130 135 140
 Gly Gly Leu Pro Val Tyr Ile Met Cys Arg Val Ala Met Arg Gly Val
 145 150 155 160
 Thr Tyr Leu Leu Arg Lys Glu Gly Val Asp Gly Thr Gln Lys Pro Asp
 165 170 175
 Val Gln His Lys Gly Thr Ala Gly Phe Leu Ile Tyr Lys Pro Gly Asn
 180 185 190
 Tyr Ser Cys Ser Tyr Leu Thr His Ala Gly Gly Lys Pro Ser Glu Pro
 195 200 205
 Ser Ala Ile Val Thr Ile Lys Met Ser Ala Thr Gln Leu Pro Pro Ser
 210 215 220

13/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Leu Cys Leu Met Gly Ser Tyr Leu Thr Ile Tyr Pro Gln Lys Thr His
 225 230 235 240
 Glu Thr Leu Ala Cys Lys Ala Pro Arg Asn Ala Ala Glu Phe Gln Leu
 245 250 255
 Arg Gln Gly Glu Arg Val Leu Asn Ile Gln Gly Phe Ser Pro Thr Arg
 260 265 270
 Asp Ala Thr Ile Tyr Tyr Val Asn Leu Lys Glu Leu Asp Asn Gln Ser
 275 280 285
 Pro Phe Thr Cys Arg Tyr Arg Met His Lys Tyr Met His Val Trp Ser
 290 295 300
 Glu Asp Ser Lys Pro Val Glu Leu Met Trp Ser Asp Glu Lys Leu Pro
 305 310 315 320
 Ala Pro Val Leu Thr Ala Glu Pro Ser Ser His Asn Leu Glu Pro Gly
 325 330 335
 Ser Thr Val Glu Leu Arg Cys Thr Ala His Lys Ala Gly Leu Arg Phe
 340 345 350
 Gly Leu Gln Arg Gln Gly Lys Pro Asp Leu Val Val Val Gln Met Leu
 355 360 365
 Asn Ser Ser Gly Thr Glu Ala Val Phe Glu Leu His Asn Ile Ser Thr
 370 375 380
 Ile Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Ile Tyr Met Glu Gln Ala Pro Pro
 385 390 395 400
 Phe Ser Gly Ser Ala Ser Ser Glu Pro Leu Glu Leu Arg Ile Asn Gly
 405 410 415
 Pro Ala Pro Lys Pro Arg Leu Glu Ala Leu Trp Lys Gly Lys Val Pro
 420 425 430
 Leu Gly His Glu Ala Ile Phe Gln Cys His Gly His Val Pro Arg Val
 435 440 445
 Ser Met Glu Leu Val Arg Glu Gly Phe Lys Thr Pro Phe Trp Met Ala
 450 455 460
 Ser Thr Thr Ser Thr Ser Ala Phe Leu Lys Leu Ser Phe Val Gly Pro
 465 470 475 480
 Gln His Thr Gly Asn Tyr Ser Cys Arg Tyr Thr Ala Leu Ser Pro Phe
 485 490 495
 Thr Phe Glu Ser Gly Ile Ser Asp Pro Val Glu Val Val Val Glu Gly
 500 505 510
 Ser

<216> 18
 <211> 1488

14/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 atgtccatgc tcttggtctt tctcttgctg tgggtgglca cctggggccc agtgaccgaa 60
 gacgccatkt tttatgagac gacgcccagc ctgtgggacg agtccgaatc actgctcgaa 120
 ccccttgcca atgtgacgct gacgtgccag gcccgccctgg agactccaga cttccagctg 180
 ttcaagaatg ggggtggcca ggaagctgtg caccctgact caoctgcoat caagcacuag 240
 ttccctgctga cgggtgacac ccaggggccc taccgtgtgc gctcgggctt gtccaccaga 300
 tggaccacag tgagcaagct cctggagctg acagggccaa agtccctgce tgcctccctgg 360
 ctctcgatgg cgcagtgct ctggatcacc cccggcctga aaacaacagc agtctccga 420
 ggtgtgtgctc ggggtgtgac tttctgtctg aggggggagg ggcaccatga gttctctggag 480
 gtgctgtagg cccaggagga tgtggaggcc acctttccag tccatccagc tggcaactac 540
 agctgcagct accggaccga tggggaaagg gccctctctg agcccagcgc tactgtgacc 600
 attggaggag tgcctgcacc accaccgctt gtcctgagtc accatggaga gtccctccag 660
 gtcccgacac ctggcaacaa ggtgaccttc acctggctgg ctccctcgag tggagtgga 720
 ttccagctac ggcgcgggga gaagagctg ctggtacca ggaagcagac cagccctagt 780
 cgcactcttt ttcacttgaa cgcggtggcc ctgggggatg gaggtcacta caoctgcgcc 840
 tacaggctgc atgacaacca aaacggctgg tccggggaca gcgcgcggt cgagctgatt 900
 ctgagcgatg agaogctgcc cgcgcggag tcttccccc agccggagtc cggcagggcc 960
 ttgcggctgc ggtgcctggc gccctggag ggcgcgcgt tgcctctggt gcgcaggac 1020
 agggggcggc gccgcgtgca ccgtttccag agcccgctg ggaacgaggc gctcttcgag 1080
 ctgcacacaa tttccgtggc tgactccgcc aactacagct gcgtctacgt ggaacctgaag 1140
 ccgccttttg ggggctccgc gccacggag cgtctggagc tgcacgtgga cggacccctt 1200
 cccagccctc agctccgggc gactggagt ggggctgtcc tggcgggccc agatgcgctc 1260
 ctgcgtctgg agggaccat ccccgagct accttgagc tgcctggcga gggcgagagc 1320
 aagccctga agacgttccg cacccccgg gccgcggcga acctcgagct gatcttctgt 1380
 gggcccccag accccggcaa ctacaggtgc cgtaccgct cctgggtgcc ccacaccttc 1440
 gaatcgagag tccagcacc tgtggagctc ctggtggcag aaagctga 1488

<210> 19
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Met Ser Met Leu Val Val Phe Leu Leu Trp Gly Val Thr Trp Gly
 1 5 10 15
 Pro Val Thr Glu Ala Ala Ile Phe Tyr Glu Thr Gln Pro Ser Leu Trp
 20 25 30
 Ala Glu Ser Glu Ser Leu Leu Lys Pro Leu Ala Asn Val Thr Leu Thr
 35 40 45
 Cys Gln Ala Arg Leu Glu Thr Pro Asp Phe Gln Leu Phe Lys Asn Gly
 50 55 60
 Val Ala Gln Glu Pro Val His Leu Asp Ser Pro Ala Ile Lys His Gln
 65 70 75 80
 Phe Leu Leu Thr Gly Asp Thr Gln Gly Arg Tyr Arg Cys Arg Ser Gly
 85 90 95
 Leu Ser Thr Gly Trp Thr Gln Leu Ser Lys Leu Leu Glu Leu Thr Gly
 100 105 110
 Pro Lys Ser Leu Pro Ala Pro Trp Leu Ser Met Ala Pro Val Ser Trp
 115 120 125

15/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

```

Ile Thr Pro Gly Leu Lys Thr Thr Ala Val Cys Arg Gly Val Leu Arg
130                      135                      140
Gly Val Thr Phe Leu Leu Arg Arg Glu Gly Asp His Glu Phe Leu Glu
145                      150                      155                      160
Val Pro Glu Ala Gln Glu Asp Val Glu Ala Thr Phe Pro Val His Gln
165                      170                      175
Pro Gly Asn Tyr Ser Cys Ser Tyr Arg Thr Asp Gly Glu Gly Ala Leu
180                      185                      190
Ser Glu Pro Ser Ala Thr Val Thr Ile Glu Glu Leu Ala Ala Pro Pro
195                      200                      205
Pro Pro Val Leu Met His His Gly Glu Ser Ser Gln Val Leu His Pro
210                      215                      220
Gly Asn Lys Val Thr Leu Thr Cys Val Ala Pro Leu Ser Gly Val Asp
225                      230                      235                      240
Phe Gln Leu Arg Arg Gly Glu Lys Glu Leu Leu Val Pro Arg Ser Ser
245                      250                      255
Thr Ser Pro Asp Arg Ile Phe Phe His Leu Asn Ala Val Ala Leu Gly
260                      265                      270
Asp Gly Gly His Tyr Thr Cys Arg Tyr Arg Leu His Asp Asn Gln Asn
275                      280                      285
Gly Trp Ser Gly Asp Ser Ala Pro Val Glu Leu Ile Leu Ser Asp Glu
290                      295                      300
Thr Leu Pro Ala Pro Glu Phe Ser Pro Glu Pro Glu Ser Gly Arg Ala
305                      310                      315                      320
Leu Arg Leu Arg Cys Leu Ala Pro Leu Glu Gly Ala Arg Phe Ala Leu
325                      330                      335
Val Arg Glu Asp Arg Gly Gly Arg Arg Val His Arg Phe Gln Ser Pro
340                      345                      350
Ala Gly Thr Glu Ala Leu Phe Glu Leu His Asp Ile Ser Val Ala Asp
355                      360                      365
Ser Ala Asn Tyr Ser Cys Val Tyr Val Asp Leu Lys Pro Pro Phe Gly
370                      375                      380
Gly Ser Ala Pro Ser Glu Arg Leu Glu Leu His Val Asp Gly Pro Pro
385                      390                      395                      400
Pro Arg Pro Gln Leu Arg Ala Thr Trp Ser Gly Ala Val Leu Ala Gly
405                      410                      415
Arg Asp Ala Val Leu Arg Cys Glu Gly Pro Ile Pro Asp Val Thr Phe
420                      425                      430
Glu Leu Leu Arg Glu Gly Glu Thr Lys Ala Val Lys Thr Val Arg Thr
435                      440                      445

```

16/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Pro Gly Ala Ala Ala Asn Leu Glu Leu Ile Phe Val Gly Pro Gln His
 450 455 460
 Ala Gly Asn Tyr Arg Cys Arg Tyr Arg Ser Trp Val Pro His Thr Phe
 465 470 475 480
 Glu Ser Glu Leu Ser Asp Pro Val Glu Leu Leu Val Ala Glu Ser
 485 490 495

<210> 20
 <211> 430
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 tgaaccccac ctttgggtgc acatgtgcag lgtgggtgtga cagggggggg ctgcctgggc 60
 ttacagcccg gaactctcca cttagactca gcagctccag gttaggtggg gagaactcag 120
 cgtctctctc tagaacaggt tctaggatcc atcactgaaa tgaggatgag gtggtttttaa 180
 catcatttta tcaactcttga tttagtttat caatcataca tgattattga ttataattgt 240
 tgcctgggcat cctgagggct cagaagtcca ccttttgcct tgaccccatg ggggcccctg 300
 ccccgcttcc cgggaaggac aaacaaggga agaggtcagt gcccgagcca ccccaccgac 360
 ctcccttggg gccatctgc tgcagagctc caccctagac actcactgca ccggagttag 420
 cgggacccac 430

<210> 21
 <211> 1970
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 gagagcgaga ctctctctca aaaaaacaaa aaacaaagga attaagcaaa tttagacattg 60
 cagagagaaac ctgagggggg tcagaccacg tacagatttc tgtgcaaat gccagtaact 120
 tctagggcat gactggatga gctgtccaca tctgaataca tccagctctt ltcagaactt 180
 tctacacgga caggagacca ggaactggaat gcagctctct ggtcactggc cagagagtgt 240
 gctcagccct gagaccagt gccacaacaa gagctgctta gtctacctcc caggaaatcc 300
 cagtgcttg tcttctctgg aagtgaatca ttggcgagc actccgtatt ttctctctt 360
 cccaggggaa ggaatctagg gcagtatttg ggaagacat gggcattgaa ggaacccggg 420
 tgaatgcata gctgctctgg ttctgagctc tcatggttaag gctctacag acacgggaaa 480
 gatgggggca cagggacaga tcaatagggt cagagcatct cagggacgga gggcaatatg 540
 gtcttagaca ggaattaaaga gcttgggctc tcatatggtg tttctgggct caactgccag 600
 ctccatcaat tcttggttgc ttgtaccatg ggcagtttat tccatctctc catatctctt 660
 tctcacttt taaatgggaa taatggggta cccactctcc aggtctacag agaggtctac 720
 agaaaaagat tcttctgaat tggcttgcag taataattca atactctgca gctattctta 780
 ttccacatcc aagcccttcc gcttcttctt ggtggaahac acatgtcagt gttctctgac 840
 ggtttccaca aagaagattc caaatttaca acctgccagt ctgaagaatc tccaaaacat 900
 cccgacgaca tcttggagga cggggcttgg ggaatgggact gccggccggg gtcttgaaca 960
 ggaatgcgtg ggcggggcac acacacacca gccagcctgt gtttgcgggc ggaatccggt 1020
 ggggtccagg gtgagccggc cgtgctggtt gggcggggca gaggcatlgt tgcagggggt 1080
 accagagccc cccgctctgc cgggagggga ggcggggctt cccgctctcc ccaagctcca 1140
 gatctggggg tggctgcccac gtctctctgc caggggctg ggggagcgga agacgggacg 1200
 ggaatgttaa tggtagggcg ccccgagggg ttccctactg ttccctgaga aacttcccca 1260
 gtgcccaccc acctgttctc cgtgtgcccg agggccgggt ctgggttagg ctccgggccc 1320
 cagccccaaa ccggtctccc agccctctcc agagagaaag ctcccgagcg gggatgcagg 1380
 gcagagagcc agcgccgggt ggaagagaga ctgagagggg gaaacagagg ggaaggggag 1440
 cgaagagctg gcggcagagg gaacagaga ttgcgcggg ccaatggcaa cggcaggacg 1500
 aggtggcacc aaattccctt aggcacatga cgaagcggag ttacagaaag cctcattagc 1560
 atttcccacg aggcaggggt aggggagag ggcggctggt gtgggtcagg tctcggcagg 1620

17/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

```

atccccggcg ccttgctgag gtccgcgcga gnetcgccct ctgtctcttc cccctccgcg 1680
ccttaacctc acgcgggaac gcccgccgca gtaacctact cgaactttgc cctgcttg 1740
cagccgataa aagggggctg aggaataacc ggcacggctc accgcttgc agctctagcc 1800
tttaaatctc cgcctcgggg acctccacgc accgcggcta gcgcgcgcaa ccagctagcg 1860
tgcaggcgc cgcggctcag cgcgtaccgc cgggcttcga aacgcagtc ctccggcgac 1920
ccgaacttc gtccgggagc ctccgcccc tggaaagtga tcccgcatc 1970

```

```

<210> 22
<211> 11
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 22
agcagattgc g 11

```

```

<210> 23
<211> 5
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 23
ccaat 5

```

```

<210> 24
<211> 2487
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 24
atgggtgaat ctgcaactgac ccttggtaca atagatgttt cttatctgac acattcatca 60
gaalacagtg ttggtcgatg taagaacaca agtgggaat ggggtgagtg tggctttaga 120
cccccctatc tcagatctgc aactttaaaa tggaaagaaa gctaatgag tcggaaaagg 180
ccattttgtg gaagatgttg ttactctctg actccccaga gctgggcaaa atttttcaac 240
cccagtcacc cgtcttttggg ttctgggaat gttatttata tcaatgaaac tcacacaaga 300
caccgggcat ggcttgcgaag acgctcttct taogtttttt ttattcaaga gcagatgtg 360
cataaggcca tgtttgccac caatgtgact gaaaatgtgc tgaacagcag tagagtaaca 420
gaggcaattg cagaagtggc tgcgtgaatta aacctgtatg gttctgcca gcagcaatca 480
aaagccgtta acaaaagtga aaagaaagct aaaaggattc ttcaagaaat ggttgcctac 540
gtctcacagg caatgatcag actgactggg tgggtgctgc taaaactgtt caacagcttc 600
ttttggaaca ttcaattca caaagylcaa ctlyagatgy tlaagctgc aactgagacg 660
aaktggcggg ttctgtttct accagttcat agatcccata tgaatctct gttgtctct 720
ttctttctct tctgcatatc catcaagca cctacatttg ctccaggcaa taatctcac 780
ttcccaatct tcagtacctt gatccataag cttgggggct tcttcatacg acgaaggctc 840
gatgaacac cagatggacg gaaagatgtt cttctatagag ctttgcctca tgggcatata 900
gttgaaattc ttgcacagca gcaattcttg gagatcttcc tggaaaggcac acgttctagg 960
agtggaaaaa cctcttctgc tggggcagga cttttgtcag ttgtgtgaga tactctgtct 1020
accaatgtca tcccagacat cttgataala cctgttggaa tctctatga tgcattatc 1080
gaaggteact acaatgggtg acaactgggc aaccttaaga agaattgagag cctgtggagt 1140
gtacgaagag gtgttattag aatgttacga aaaaactatg gttgtgtccg agtggatttt 1200
gcacagcaat ttctctttaa ggaatattta gaaagcaaaa gtccagaacc ggtgtctgtc 1260
ctacttcccc tggagcagcg gttgttaccg gctatcttcc ctccagacc cagtgtgtct 1320
gttgatgaag gtgagagcac gtccattaat ggttcnagaa atgcacacga tgaatcccta 1380
cgaaggaggt tgattgcaaa tctggctgag catattctat tcaactgctg caagtctctt 1440
gccttatgt ccacacacat tctggcttgc ctgctctctc acagacacag ccagggaatt 1500
gatctctcca cattgttoga agacttcttt gtgatgaaag aggaagtccl ggctcgtgat 1560
tttgacctgg ggtttctcgg aaattccagaa gatgtatga tgcattgccat acagctgctg 1620
gaaattgtgt tcacaatcac ccacacacag aggaacgatg agttttttat caccctcagc 1680

```

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

```

acaactgtcc catcagtcctt cgaactcaac ttctacagca atgggggtact tcatgtcttt 1740
atcatggagg ccatcatagc ttgcagcctt tatgcagltc tgaacaagag gggactgggg 1800
ggctccacta gcaacccacc taacctgac agccaggagc agctgggtgc gaggccggcc 1860
agcctgtgct accttctctc caatgaaggc accatctcac tgctttgcca gacattttac 1920
caagtctgcc atgaacacgt aggaaggttt atccagtatg gcattcttcc agtggcagag 1980
cagcatgacc aggaagatal cagtcctagt ctgtctgagc agcagtgagg cagaagcttc 2040
ccagacactt tgcttggag aagtatgaa gaagtgaag acagtgaatt tgggagagaa 2100
cagcagagatt gctacctgaa ggtgagccaa tccagagagc accagcagtt tatcacttcc 2160
ttacagagac ccatctggcc ttgctggag gctacagct ctctgcat ctctgttcc 2220
aacttcagct gtctgttcc agsacctgag tatctgcaca agttgcaca atacctata 2280
accagaacag aaagaagtgt tgcagtatat gctgagagtg ccacatatg tctgtgaag 2340
aatgctgtga aaatgtttaa ggtatattgg gttttcaagg agaccaaa aaagagagtg 2400
tctgttttag aactgagcag cacttttcta cctcaatgca ccgacaaaa acttctagaa 2460
tatattctga gttttgtggt gctgtag 2487

```

<210> 25
 <211> 829
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Met Asp Glu Ser Ala Leu Thr Leu Gly Thr Ile Asp Val Ser Tyr Leu
 1 5 10 15
 Pro His Ser Ser Glu Tyr Ser Val Gly Arg Cys Lys His Thr Ser Glu
 20 25 30
 Glu Trp Gly Glu Cys Gly Phe Arg Pro Thr Ile Phe Arg Ser Ala Thr
 35 40 45
 Leu Lys Trp Lys Glu Ser Leu Met Ser Arg Lys Arg Pro Phe Val Gly
 50 55 60
 Arg Cys Cys Tyr Ser Cys Thr Pro Gln Ser Trp Asp Lys Phe Phe Asn
 65 70 75 80
 Pro Ser Ile Pro Ser Leu Gly Leu Arg Asn Val Ile Tyr Ile Asn Glu
 85 90 95
 Thr His Thr Arg His Arg Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Ser Tyr Val
 100 105 110
 Leu Phe Ile Gln Glu Arg Asp Val His Lys Gly Met Phe Ala Thr Asn
 115 120 125
 Val Thr Glu Asn Val Leu Asn Ser Ser Arg Val Gln Glu Ala Ile Ala
 130 135 140
 Glu Val Ala Ala Glu Leu Asn Pro Asp Gly Ser Ala Gln Gln Gln Ser
 145 150 155
 Lys Ala Val Asn Lys Val Lys Lys Lys Ala Lys Arg Ile Leu Gln Glu
 165 170 175
 Met Val Ala Thr Val Ser Pro Ala Met Ile Arg Leu Thr Gly Trp Val
 180 185 190
 Leu Leu Lys Leu Phe Asn Ser Phe Phe Trp Asn Ile Gln Ile His Lys
 195 200 205

19/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Gly Gln Leu Glu Met Val Lys Ala Ala Thr Glu Thr Asn Leu Pro Leu
 210 215 220
 Leu Phe Leu Pro Val His Arg Ser His Ile Asp Tyr Leu Leu Leu Thr
 225 230 235 240
 Phe Ile Leu Phe Cys His Asn Ile Lys Ala Pro Tyr Ile Ala Ser Gly
 245 250 255
 Asn Asn Leu Asn Ile Pro Ile Phe Ser Thr Leu Ile His Lys Leu Gly
 260 265 270
 Gly Phe Phe Ile Arg Arg Arg Leu Asp Glu Thr Pro Asp Gly Arg Lys
 275 280 285
 Asp Val Leu Tyr Arg Ala Leu Leu His Gly His Ile Val Glu Leu Leu
 290 295 300
 Arg Gln Gln Gln Phe Leu Glu Ile Phe Leu Glu Gly Thr Arg Ser Arg
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Thr Ser Cys Ala Arg Ala Gly Leu Leu Ser Val Val Val
 325 330 335
 Asp Thr Leu Ser Thr Asn Val Ile Pro Asp Ile Leu Ile Ile Pro Val
 340 345 350
 Gly Ile Ser Tyr Asp Arg Ile Ile Glu Gly His Tyr Asn Gly Glu Gln
 355 360 365
 Leu Gly Lys Pro Lys Lys Asn Glu Ser Leu Trp Ser Val Ala Arg Gly
 370 375 380
 Val Ile Arg Met Leu Arg Lys Asn Tyr Gly Cys Val Arg Val Asp Phe
 385 390 395 400
 Ala Gln Pro Phe Ser Leu Lys Glu Tyr Leu Glu Ser Gln Ser Gln Lys
 405 410 415
 Pro Val Ser Ala Leu Leu Ser Leu Glu Gln Ala Leu Leu Pro Ala Ile
 420 425 430
 Leu Pro Ser Arg Pro Ser Asp Ala Ala Asp Glu Gly Arg Asp Thr Ser
 435 440 445
 Ile Asn Glu Ser Arg Asn Ala Thr Asp Glu Ser Leu Arg Arg Arg Leu
 450 455 460
 Ile Ala Asn Leu Ala Glu His Ile Leu Phe Thr Ala Ser Lys Ser Cys
 465 470 475 480
 Ala Ile Met Ser Thr His Ile Val Ala Cys Leu Leu Leu Tyr Arg His
 485 490 495
 Arg Gln Gly Ile Asp Leu Ser Thr Leu Val Glu Asp Phe Phe Val Met
 500 505 510
 Lys Glu Glu Val Leu Ala Arg Asp Phe Asp Leu Gly Phe Ser Gly Asn
 515 520 525

20/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

Ser Glu Asp Val Val Met His Ala Ile Gln Leu Leu Gly Asn Cys Val
 530 535 540
 Thr Ile Thr His Thr Ser Arg Asn Asp Glu Phe Phe Ile Thr Pro Ser
 545 550 555 560
 Thr Thr Val Pro Ser Val Phe Glu Leu Asn Phe Tyr Ser Asn Gly Val
 565 570 575
 Leu His Val Phe Ile Met Glu Ala Ile Ile Ala Cys Ser Leu Tyr Ala
 580 585 590
 Val Leu Asn Lys Arg Gly Leu Gly Gly Pro Thr Ser Thr Pro Pro Asn
 595 600 605
 Leu Ile Ser Gln Glu Gln Leu Val Arg Lys Ala Ala Ser Leu Cys Tyr
 610 615 620
 Leu Leu Ser Asn Glu Gly Thr Ile Ser Leu Pro Cys Gln Thr Phe Tyr
 625 630 635 640
 Gln Val Cys His Glu Thr Val Gly Lys Phe Ile Gln Tyr Gly Ile Leu
 645 650 655
 Thr Val Ala Glu His Asp Asp Gln Glu Asp Ile Ser Pro Ser Leu Ala
 660 665 670
 Glu Gln Gln Trp Asp Lys Lys Leu Pro Glu Pro Leu Ser Trp Arg Ser
 675 680 685
 Asp Glu Glu Asp Glu Asp Ser Asp Phe Gly Glu Glu Gln Arg Asp Cys
 690 695 700
 Tyr Leu Lys Val Ser Gln Ser Lys Glu His Gln Gln Phe Ile Thr Phe
 705 710 715 720
 Leu Gln Arg Leu Leu Gly Pro Leu Leu Glu Ala Tyr Ser Ser Ala Ala
 725 730 735
 Ile Phe Val His Asn Phe Ser Gly Pro Val Pro Glu Pro Glu Tyr Leu
 740 745 750
 Gln Lys Leu His Lys Tyr Leu Ile Thr Arg Thr Glu Arg Asn Val Ala
 755 760 765
 Val Tyr Ala Glu Ser Ala Thr Tyr Cys Leu Val Lys Asn Ala Val Lys
 770 775 780
 Met Phe Lys Asp Ile Gly Val Phe Lys Glu Thr Lys Gln Lys Arg Val
 785 790 795 800
 Ser Val Leu Glu Leu Ser Ser Thr Phe Leu Pro Gln Cys Asn Arg Gln
 805 810 815
 Lys Leu Leu Glu Tyr Ile Leu Ser Phe Val Val Leu *
 820 825

<210> 26

21/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<211> 2000
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 ttggctcacc tcagtgcccc cagtcagcac atctctacca gactagatgc aaataaala 60
 actgttgtaac gaatgcataat ttacctataa agagggttcc ccttaagttc ctttaaatat 120
 tgagctctaa tatatcaaga cctcttgagg gtrtgtctac cagctotatg ggctctgaag 180
 agctcagag gaaggagagg gagtttttat gcatgtatgc ttggcaacaa ctaagcagga 240
 agcgctgac agtgttttaa gtccacatga ccagctagc aagggccttt attogccct 300
 acacctctt agttccaga acctactgtc ttactatagc ctcttcataa gcgaacaga 360
 gcaataatag ttttgaaagg ggagggtggc agcagctgga aagaggatga agaatagag 420
 aagaccaaag tcatgactgc ttcaagacaa atacgaatg caculaaagc atctccaaca 480
 tctctccnca acctctctag ggtcacagtc agtgagctgc acatctgggt tcaaataggc 540
 tcaccccatg gggacccccc ccccgctcag ccccgctcaa acctcccttc ccttcagcag 600
 tgagaatgac aaattgaaa cagccaggcc cggagcctga cggcccatgt gaacactcaa 660
 gctgtggaca cctccgctga gatgaggtt actgagctca gagctttact cccaggttag 720
 aaaatcccca ccaggcaatg cgaagagac accattcatt gcatcattaa attgtacaa 780
 gccctgaat gcactccaga agcctgggtc tgtttgtctc tgcagtcgga aggaagcctg 840
 tgattggctg gccaaagctca gcttagcagg ccttatctct gactgggttat tatttgatta 900
 aagagcttc cctctcttgc ggtgtttcaa aactgcattg ggagaatttg ctgctgcggg 960
 ggagctcttt ctgagcttac tgtggagcac ccaagcttg tcagctcttg gcggtgcaaa 1020
 caggcaacca gaggaacccg accttgctta ttcaaccaca gcctgggact gttcttcca 1080
 gactctccat cagcttttgc aatcgactga ttggaataa ttctcaaac accaccaagt 1140
 caaggataca ggtattttaa aactctgggt gcaggagta atttcttagg atgtcatgac 1200
 atgagacag ggggtaggac gaggaagcct gggagcagc gtggaatgca ggagaygag 1260
 acacagtagg aagaagaaag tcaagaaaaa gaactcagaa tcatggaatt ctgtgcanaa 1320
 gcaaaactga ggtgcttggg catagttatt tgcagctgac aagaggtgca agcacgtttg 1380
 tgatgtacaa ttacatctg tctgcatctg ctctcatga aatccttccc gactttttgc 1440
 tactcttttg gcttccatga aatcctccat cctggctcag aacccccaaa tcttgagaag 1500
 gttttggaca gtttaaaaa aatctaatlg ctttagcttg aaacgtcacc aatctgatt 1560
 tgcacagggc acatggctt caaaggctct gcttagtagt acaaatcttg gtacccatcc 1620
 logtgaatgt ggctcagag gaagagggag gactggagaa tgtcttttat gaaagttag 1680
 ttccactctt aagatctgtg ttaacgggt gatattcatt ctatcccca ctgtattccc 1740
 tactcagggt tgttttctga gcttggatcg gccagatagc ttlatgtcaa aggaclttct 1800
 cactgtagag gaaagctggg ctccatagtg gccagcagag atttaaccat ctggaatgaa 1860
 gatcaaaagc agcagaaaag acagacttca ttctctctg taggtttggc tggagatggc 1920
 agcagagggg aagatacgtat gcaaaaccaa ggaatcaat acttttgggt tagtattgag 1980
 tggaaaagaa tgtttttacg 2000

<310> 27
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 27
 attaaccttc actaaatgct gggga 25

<210> 28
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 28
attaaccctc actaaatgg tcatag 26

<210> 29
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 29
attaaccctc actaaatgct ggtgg 25

<210> 30
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 30
attaaccctc actaaatgct ggtag 25

<210> 31
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 31
attaaccctc actaaagatc tgactg 26

<210> 32
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 32
attaaccctc actaaatgct gggtg 25

<210> 33
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

23/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 33
attaaccctc actaatgct gtagg 25

<210> 34
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 34
attaaccctc actaatgga gctgg 25

<210> 35
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 35
attaaccctc actaatgtg gcagg 25

<210> 36
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 36
attaaccctc actaagcac cgtcc 25

<210> 37
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 37
cattatgctg agtgaatctc ttttttttaa 30

<210> 38
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

24/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 38
cattatgctg agtgatatct ttttttttac 30

<210> 39
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 39
cattatgctg agtgatatct ttttttttag 30

<210> 40
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 40
cattatgctg agtgatatct ttttttttca 30

<210> 41
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 41
cattatgctg agtgatatct ttttttttcc 30

<210> 42
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 42
cattatgctg agtgatatct ttttttttcg 30

<210> 43
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

25/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 43
cattatgctg agtgatatct ttttttttga 30

<210> 44
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 44
cattatgctg agtgatatct ttttttttgc 30

<210> 45
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 45
cattatgctg agtgatatct ttttttttgg 30

<210> 46
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 46
actagctaac ggcgcgcagt gtgctgg 27

<210> 47
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 47
actagctaac ggcgcgcagt gtgctgg 27

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

26/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 48
gtggttttcg tggcttatga g 21

<210> 49
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 49
gctacgccca tggacgttat caagtcc 27

<210> 50
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 50
gctacgccca tggacgttat caagtcc 27

<210> 51
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 51
cacgctgggat ccgccaccat ggattttgtt gctggggcca ttgg 44

<210> 52
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 52
cacgctgggta ccacgcgtgc caccatggat tttyctctg gagecatcg 49

<210> 53
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

27/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 53
caecggggta ccacgcgtgc caccatggat ttgtcgctg gagccatcg 49

<210> 54
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 54
atatcacgat gcggcgccct atgtgagcag acccgggcg agc 43

<210> 55
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 55
atatcacgat gcggcgcca tgtgagcagg cctgagtga gcc 43

<210> 56
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 56
atatcacgat gcggcgcca tgtgagcaga cccggggcga gc 42

<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 57
ccggttcttc tgcggcagat g 21

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

28/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 58
tggaagtcgtg ttcttcacaca 20

<210> 59
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 59
cagcggggat cggccaccat gtttagccc aagagctgca cc 42

<210> 60
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 60
cagcggggat cggccaccat gtttagcct gtgagctgca cc 42

<210> 61
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 61
atatcacgat gcggcgcgc agggaggtgg agtctggacc c 41

<210> 62
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 62
atatcacgat gcggcgcgc aggcagtggg tgtctgcacc 40

<210> 63
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

29/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 63
atatcacgat gcggcgcca ggagggtgga gtotggaccc 40
<210> 64
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 64
atatcacgat gcggcgcca ggcagtggt gtotgcacc 39
<210> 65
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 65
ctggagcagg gtctgttgg cngtctct 28
<210> 66
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 66
cacgcgggta ccacgcgtgc caccatggac gcctcttgg aacctttcc 49
<210> 67
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 67
cacgcgggta ccacgcgtgc caccatggac gcctcttgg aacctttcc 49
<210> 68
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

30/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 68
cagcgctcg agclaggaga gtttgatggt ggtggtggg 39

<210> 69
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 69
ctcgaggag agtttgatgg tgggtgtggg 30

<210> 70
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 70
caaccctttc caagggcact ttctctgtg 28

<210> 71
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 71
cagcggggat ccgccaccat gtctctgttg actactg 37

<210> 72
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 72
cagcggggat ccgccaccat gtccatgctc gtggtctttc tc 42

<210> 73
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 73
atatcacgat gcggcgctt agctacctt tactacaact tccacaggg 49

<210> 74
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 74
atatcacgat gcggcgctt agctttctgc caccaggagc 40

<210> 75
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 75
atatcacgat gcggcgctt gctacottct actacaactt ccacaggg 48

<210> 76
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 76
atatcacgat gcggcgcca gctttctgac accaggagc 39

<210> 77
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 77
cacgcgggat cgcacccat ggatgaatct gcaatgaccc ttgg 44

<210> 78
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

32/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 78
atatcagat gggccgcut acgcaccac aaaacacaga atatattcta g 51

<210> 79
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 79
ggaagatctg agagcgagac ttctctcaa 30

<210> 80
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 80
ggaagatctg atgcgggat cactttcc 28

<210> 81
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 81
tggccttgga tgggcactt ccgc 25

<210> 82
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 82
gaacaagggtg tggcggggag gccctgggtc 30

<210> 83
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

33/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 83
ggaaaaaaa cggccccgag gctatgagtg 30

<210> 84
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 84
ctgccgcagg aggatggggg etc 23

<210> 85
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 85
ttaaaaagct gaaaatctcc ccggttgagg gggatc 37

<210> 86
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 86
cgccagccggc tccggggacc cccttcc 27

<210> 87
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 87
tgaaccccac ctttgggtgc acatgtgcag 30

<210> 88
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

34/35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40666

PCT/CA01/01632

<400> 88
gatggctcgcg ctactccgg tgcagtcag

29

<210> 89
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 69
ttggctcacc tcagtgcacc cagtc

25

<210> 90
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 90
tgggttttgcg tcgtatcttc cctctgctg ccctc

35

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
23 May 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/040666 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
A01K 67/027, C07K 14/00, 16/00, C12N 5/10, G01N
33/50, 33/53(CA). JENKINS, D., Kenneth [CA/CA]; 1804 Gettard
Drive, Coldbrook, Nova Scotia B4R 1A3 (CA). NWAKA,
Solomon, O. [NG/CA]; 2075 Langille Drive, Coldbrook,
Nova Scotia B4R 1G3 (CA).

(21) International Application Number: PCT/CA01/01632

(74) Agent: HELLER, David, J.; RIDOUT & MAYBIE LLP,
One Queen Street East, Suite 2400, Toronto, Ontario M5C
3B1 (CA).(22) International Filing Date:
19 November 2001 (19.11.2001)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, AU, AZ,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, NG, NI, NO, NZ, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/248,589 17 November 2000 (17.11.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): XENON
GENETICS INC. [CA/CA]; 8501 - 520 West 6th Ave.,
Vancouver, British Columbia V5Z 4T5 (CA).(72) Inventors and
(75) Inventors/Applicants (for US only): WINTHER,
Michael, David [CA/CA]; 10 Anderson Blvd., Kentville,
Nova Scotia B4H 5G9 (CA). GOLDBERG, Y., Paul
[CA/CA]; 62 West 18 Ave., Vancouver, British Columbia
V5Y 2A1 (CA). KNICKLE, Leah, Christine [CA/CA];
49 Craig Dr., Kentville, Nova Scotia B4N 5H2 (CA).
HAADE, Martin [DE/CA]; 1404 George Street, Cold-
brook, Nova Scotia B4R 1B5 (CA). ALLEN, Stephen,
John [CA/CA]; 9049 Commercial St., Suite 150, New
Minas, Nova Scotia B4N 5A4 (CA). PONTON, Andre
[CA/CA]; 15 Oakwood Drive, Kingston, Nova Scotia B0P
1R0 (CA). DE ANTUENO, Roberto, Justo [CA/CA];
1520 Ashlee Dr., Coldbrook, Nova Scotia B4R 1A1(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KH, LS, MW, MY, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
10 April 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/040666 A3

(54) Title: FAT REGULATED GENES, USES THEREOF, AND COMPOUNDS FOR MODULATING SAME

(57) Abstract: The present invention relates to methods for identifying genes regulated by fat and their subsequent use in determin-
ing compositions for use in the treatment of disease, by utilizing the identified genes and their proteins. The identified compositions
regulate the expression of the fat regulated genes or modulate the activity of their protein products. The nucleotide and amino acid
sequences for MECP, a novel mitochondrial carrier protein and PTF, a fat responsive transcription factor, are taught. The nucleotide
sequence for A1BG, a plasma glycoprotein is taught. The nucleotide and amino acid sequences for human GBA1 and rat GLOL are
taught. Control sequences for human MECP, GLOL, PTF1, SCD, GPAT and A1BG are taught. Polyunsaturated fatty acid regulation
functions are taught for SCD1, SCD2, SCD, GGP2, GPAT, UAS, COMT, Apo A-1, INSIG1, PTF1, GLOL, A1GB, Spot-14, delta-3,
delta 2 enoyl CoA isomerase, and MECP.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 01/81632
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 A01K67/027 C07K14/00 C07K15/00 C12N5/10 G01N33/50 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 37491 A (BOUGUELERET LYDIE ;DUMAS JEAN BAPTISTE (FR); GENSET SA (FR); DUCLE) 29 June 2000 (2000-06-29) SEQ ID NO: 41, 91 page 90 -page 91 page 105; table 5 --- -/--	1-22, 36-50, 84-110, 120-136
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document describing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" nonwritten material relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 September 2002		Date of mailing of the international search report 14.01.2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5618, Postfach 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-2010		Authorized officer Schmitz, T

Form PCT/ISCA/2010 (Second edition) July 1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 01/01632
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WILLIAMS S C ET AL: "CIS-ACTING DETERMINANTS OF BASAL AND LIPID-REGULATED APOLIPOPROTEIN A-IV EXPRESSION IN MICE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 32, 1989, pages 19009-19016, XP002213898 ISSN: 0021-9258 abstract page 19015, left-hand column, line 31 - line 46 page 19015, right-hand column, last paragraph	
A	KARIKO KATALIN ET AL: "Stimulatory effect of unsaturated fatty acids on the level of plasminogen activator inhibitor-1 mRNA in cultured human endothelial cells." FEBS LETTERS, vol. 361, no. 1, 1995, pages 118-122, XP002213899 ISSN: 0014-5793 the whole document -----	

Form PCTISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA 01/01632**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 43-46, 92-96, 103-105, 120-123, 130, 133, 136 are directed to a method of treatment or diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 5, 36-42, 124-129, 131, 132, 134, 135 (all partially)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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.:
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.:
1-22, 36-50, 84-110, 120-136 (all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/CA 01/01632

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 5, 36-42, 124-129, 131, 132, 134, 135 (all partially)

Present claim 5 relates to an extremely large number of possible sequences. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the sequences claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the full length of the sequences (SEQ ID NO:1, 2).

Present claims 36-42, 124-129, 131, 132, 134, 135 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the modulation of a segment of polynucleotides or polypeptides. The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for no such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compounds by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the antibody binding to the claimed polypeptide.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/CA 01/01632

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-22, 36-50, 84-110, 120-136 (all partially)

Fat regulated protein and nucleic acid sequence coding therefor (SEQ ID NO:1 and 2).

Further vectors, host cells, methods, processes, compositions, uses, antibodies, compounds all related to said protein or nucleic acid.

2. Claims: 1-136 (all partially)

As subject 1, but referring to SEQ ID NO:3 and 4. Additionally the control region (SEQ ID NO:5).

3. Claims: 1-22, 36-60 66, 67, 69-75, 77-110, 120-136 (all partially)

As subject 1, but referring to SEQ ID NO:6 and 7.

4. Claims: 1-136 (all partially)

As subject 1, but referring to SEQ ID NO:8 and 9. Additionally the control region (SEQ ID NO:10).

5. Claims: 1-22, 36-60 66, 67, 69-75, 77-110, 120-136 (all partially)

As subject 1, but referring to SEQ ID NO:11 and 12.

6. Claims: 1-136 (all partially)

As subject 1, but referring to SEQ ID NO:13 and 14. Additionally the control region (SEQ ID NO:15).

7. Claims: 1-22, 36-60 66, 67, 69-75, 77-110, 120-136 (all partially)

As subject 1, but referring to SEQ ID NO:16 and 17.

8. Claims: 1-136 (all partially)

As subject 1, but referring to SEQ ID NO:18 and 19.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/CA 01/01632

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Additionally the control region (SEQ ID NO:20).

9. Claims: 1-136 (all partially)

As subject 1, but referring to SEQ ID NO:24 and 25.
Additionally the control region (SEQ ID NO:26).

10. Claims: 23-56, 61-65, 68-74, 76-79, 84-91, 111-119,
124-136 (all partially)

The control region of the human SCD gene (SEQ ID NO:21).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CA 01/01632

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0037491	A	29-06-2000	
		AU 1675900 A	12-07-2000
		EP 1144444 A2	17-10-2001
		WO 0037491 A2	29-06-2000
		US 6455230 B1	24-09-2002
		AU 5550400 A	31-01-2001
		AU 5838200 A	31-01-2001
		AU 5838300 A	31-01-2001
		EP 1200576 A2	02-05-2002
		WO 0100880 A2	04-01-2001
		WO 0100661 A2	04-01-2001
		WO 0100803 A2	04-01-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 9/00	4 C 2 0 6
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 15/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 P 19/04	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

- (72)発明者 ウィンター、マイケル デイビッド
カナダ国 B 4 H 5 G 9 ノバ スコシア州 ケントビル アンダーソン ブルバード 1 0
- (72)発明者 ゴールドバーグ、ワイ. ポール
カナダ国 V 5 Y 2 A 4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスト エイティーン アベニュー 6 2
- (72)発明者 ニックル、リー クリスティン
カナダ国 B 4 N 5 H 2 ノバ スコシア州 ケントビル クレイグ ドライブ 4 9
- (72)発明者 ハールト、マーティン
カナダ国 B 4 R 1 B 5 ノバ スコシア州 コールドブルック ジョージ ストリート 1 4 0 4
- (72)発明者 アレン、スティーブン ジョン
カナダ国 B 4 N 5 A 4 ノバ スコシア州 ニュー マイナス コマーシャル ストリート 9 0 4 9 スイート 1 5 0

- (72)発明者 ポントン、アンドレ
カナダ国 B O P 1 R 0 ノバ スコシア州 キングストン オークウッド ドライブ 1 5
- (72)発明者 ダントゥエノ、ロベルト ジュスト
カナダ国 B 4 R 1 A 1 ノバ スコシア州 コールドブルック アシュリー ドライブ 1 5
2 0
- (72)発明者 ジェンキンス、ディ. ケネス
カナダ国 B 4 R 1 A 3 ノバ スコシア州 コールドブルック ジェラルド ドライブ 1 8
0 4
- (72)発明者 スワカ、ソロモン オー.
カナダ国 B 4 R 1 C 3 ノバ スコシア州 コールドブルック ランジル ドライブ 2 0 7
5

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB50 BB51 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 FA11
FB02 FB08
4B024 AA01 AA11 BA01 BA21 CA02 DA02 EA04 FA02 GA11 HA01
HA14 HA15
4B063 QA18 QQ08 QQ43 QR32 QR55 QS34
4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA91X AB01 BA02 CA24 CA44
4C084 AA17 BA01 BA22 BA35 CA53 NA14 ZA181 ZA361 ZA811 ZA89
ZA941 ZB111 ZB261 ZC211 ZC351
4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA18 ZA36 ZA81 ZA89
ZA94 ZB11 ZB26 ZC35
4C206 AA01 AA03 DA03 MA01 MA04 NA14 ZA18 ZA36 ZA81 ZA89
ZA94 ZB11 ZB26 ZC35
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA30 DA75 EA27 EA28 FA74

专利名称(译)	基因由脂肪控制，其使用和化合物调节它		
公开(公告)号	JP2004512852A	公开(公告)日	2004-04-30
申请号	JP2002543661	申请日	2001-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	XENON遗传学		
申请(专利权)人(译)	氙气遗传学公司		
[标]发明人	ウィンターマイケルデイビッド ゴールドバーグワイポール ニックルリークリスティン ハールトマーティン アレンスティーブンジョン ポントンアンドレ ダントウエノロベルトジュスト ジェンキンスディケネス スワカソロモンオー		
发明人	ウィンター、マイケル デイビッド ゴールドバーグ、ワイ.ポール ニックル、リー クリスティン ハールト、マーティン アレン、スティーブン ジョン ポントン、アンドレ ダントウエノ、ロベルト ジュスト ジェンキンス、ディ.ケネス スワカ、ソロモン オー.		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/19 A61K31/7088 A61K31/711 A61K38/00 A61K45/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/04 A61P25/18 A61P29/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/775 C07K16 /18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1 /68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P3/10 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/04 A61P25/18 A61P29/00 A61P35 /00 C07K14/47 C07K14/4705 C07K14/473 C07K14/775		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/19 A61K31/7088 A61K31/711 A61K45/00 A61P3/10 A61P9 /00 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/04 A61P25/18 A61P29/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA01 4B024/BA21 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024 /HA14 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA91X 4B065/AB01 4B065 /BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA35 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA181 4C084/ZA361 4C084/ZA811 4C084/ZA89 4C084/ZA941 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C084/ZC211 4C084/ZC351 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA18 4C086/ZA36 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086 /ZB11 4C086/ZB26 4C086/ZC35 4C206/AA01 4C206/AA03 4C206/DA03 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/NA14 4C206/ZA18 4C206/ZA36 4C206/ZA81 4C206/ZA89 4C206/ZA94 4C206/ZB11 4C206 /ZB26 4C206/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045/DA75 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/FA74		

代理人(译)	昂达诚
优先权	60/248589 2000-11-17 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明涉及用于鉴定受脂肪调节的基因的方法，以及它们在随后用于通过利用鉴定的基因及其蛋白确定用于治疗疾病的组合物中的用途。鉴定出的组合物调节脂肪调节基因的表达或调节其蛋白质产物的活性。讲授了METP（一种新型的线粒体载体蛋白）和FTF1（一种脂肪响应性转录因子）的核苷酸和氨基酸序列。教导了血浆糖蛋白A1BG的核苷酸序列。教导了人GPAT和大鼠GLOL的核苷酸和氨基添加序列。教导了人METP，GLOL，FTF1，SCD，GPAT和A1BG的控制序列。教授了SCD1，SCD2，SCD，G6PD，GPAT，FAS，COMT，Apo A-1，INSIG1，FTF1，GLOL，A1GB，Spot-14，delta-3，delta-2-enoyl-CoA的多不饱和脂肪酸调节功能 异构酶和METP

グリオキサラーゼII中の残基	GLOL中の残基
D29	D25
T53	T51
T111	T109
G133	G126
C141	C134
K143	R136
E174	D169
Y175	Y170