

(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2005-500030

(P2005-500030A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>A O 1 K 67/027</b>	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 P 1/14	4 B O 2 4
<b>A 6 1 P 1/14</b>	A 6 1 P 3/00	4 B O 6 3
<b>A 6 1 P 3/00</b>	A 6 1 P 3/04	4 B O 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	4 B O 6 5
		(全 224 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-503819 (P2003-503819)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・94080-4990・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(86) (22) 出願日	平成14年4月3日 (2002.4.3)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月12日 (2003.12.12)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/010513	(72) 発明者	ゴッダード, オードリー アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131, サン フランシスコ, コンゴ ストリート 110
(87) 国際公開番号	W02002/101069		
(87) 国際公開日	平成14年12月19日 (2002.12.19)		
(31) 優先権主張番号	09/880, 457		
(32) 優先日	平成13年6月12日 (2001.6.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NS 4 核酸及びポリペプチド並びに体重異常の治療のための使用

## (57) 【要約】

本発明は、新規ポリペプチド NS 4 およびそのポリペプチドをコード化する核酸分子に関する。また、そのような核酸配列を含むベクターおよび宿主細胞、異種ポリペプチド配列に融合した本発明のポリペプチドを含むキメラポリペプチド分子、本発明のポリペプチドに結合する抗体、および本発明のポリペプチドの生成方法がさらに提供される。さらに、体重異常（例えば、肥満、悪液質または摂食異常）の治療方法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) (i) 図 4 (a) (配列番号 4) の約 1 または約 20 から約 87、(ii) 図 4 (b) (配列番号 5) の約 1 または約 20 から約 95、または (iii) 図 4 (c) (配列番号 6) の約 1 または約 20 から約 95 のアミノ酸残基の配列を有する NS4 ポリペプチドをコード化する DNA 分子、あるいは (a) の DNA 分子の相補鎖に対し、少なくとも約 80% の配列同一性を有する DNA を含む、単離された核酸分子。

## 【請求項 2】

(i) 図 1 (配列番号 1) の約 486 または約 543 から約 746、(ii) 図 2 (配列番号 2) の約 1784 または約 1841 から約 2068、または (iii) 図 3 (配列番号 3) の約 447 または約 504 から約 731 のヌクレオチド位置の配列を有する、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

10

## 【請求項 3】

(a) (i) 図 4 (a) (配列番号 4) の約 1 または約 20 から約 87、(ii) 図 4 (b) (配列番号 5) の約 1 または約 20 から約 95、または (iii) 図 4 (c) (配列番号 6) の約 1 または約 20 から約 95 のアミノ酸残基の配列をコード化するヌクレオチド配列を有する、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 4】

(a) (i) 2001 年 5 月 15 日に ATCC 寄託番号 PTA - 3376 (DNA 146649 - 1789R1) で、(ii) 2000 年 4 月 4 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1627 で、または (iii) 2000 年 5 月 31 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1971 (DNA 149995 - 2871) で ATCC に寄託された ヒト cDNA によりコード化された成熟ポリペプチドをコード化する DNA 分子、あるいは (b) (a) の DNA 分子の相補鎖に対し、少なくとも約 80% の配列同一性を有する DNA を含む、単離された核酸分子。

20

## 【請求項 5】

(a) (i) 2001 年 5 月 15 日に ATCC 寄託番号 PTA - 3376 (DNA 146649 - 1789R1) で、(ii) 2000 年 4 月 4 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1627 で、または (iii) 2000 年 5 月 31 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1971 (DNA 149995 - 2871) で ATCC に寄託された ヒト cDNA によりコード化されるその成熟ポリペプチドをコード化する DNA、あるいは (b) (a) の DNA 分子の相補鎖を含む、請求項 4 に記載の単離された核酸分子。

30

## 【請求項 6】

(a) (i) 2001 年 5 月 15 日に ATCC 寄託番号 PTA - 3376 (DNA 146649 - 1789R1) で、(ii) 2000 年 4 月 4 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1627 で、または (iii) 2000 年 5 月 31 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1971 (DNA 149995 - 2871) で ATCC に寄託された ヒト cDNA の完全長ポリペプチドコード化配列、あるいは (b) (a) の DNA 分子の相補鎖に対し、少なくとも約 80% の核酸配列同一性を有する DNA を含む、単離された核酸分子。

## 【請求項 7】

(a) (i) 2001 年 5 月 15 日に ATCC 寄託番号 PTA - 3376 (DNA 146649 - 1789R1) で、(ii) 2000 年 4 月 4 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1627 で、または (iii) 2000 年 5 月 31 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1971 (DNA 149995 - 2871) で ATCC に寄託された ヒトタンパク質 cDNA の完全長ポリペプチドコード化配列、あるいは (b) (a) の DNA 分子の相補鎖を含む、請求項 6 に記載の単離された核酸分子。

40

## 【請求項 8】

(i) 図 4 (a) (配列番号 4) の約 1 または約 20 から約 87、(ii) 図 4 (b) (配列番号 5) の約 1 または約 20 から約 95、または (iii) 図 4 (c) (配列番号 6) の約 1 または約 20 から約 95 のアミノ酸をコード化する核酸配列の相補鎖にハイブリ

50

ダイズするDNAを含むNS4ポリペプチドをコード化する、単離された核酸分子。

【請求項9】

核酸が、(i)図1(配列番号1)の約486または約543から約746、(ii)図2(配列番号2)の約1784または約1841から約2068、または(iii)図3(配列番号3)の約447または約504から約731のヌクレオチドをそれぞれ含む、(i)図4(a)(配列番号4)の約1または約20から約87、(ii)図4(b)(配列番号5)の約1または約20から約95、または(iii)図4(c)(配列番号6)の約1または約20から約95のアミノ酸をコード化する、請求項8に記載の単離された核酸分子。

【請求項10】

ハイブリダイゼーションがストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件の下で行われる、請求項9に記載の単離された核酸分子。

10

【請求項11】

少なくとも31のヌクレオチドを含み、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の下で、(a)(i)図4(a)(配列番号4)の約1または約20から約87、(ii)図4(b)(配列番号5)の約1または約20から約95、または(iii)図4(c)(配列番号6)の約1または約20から約95のアミノ酸残基の配列を有するNS4ポリペプチドをコード化するDNA分子、あるいは、(b)(a)のDNA分子の相補鎖と、試験DNA分子とをハイブリダイズすること、および試験DNA分子を単離することにより生成される、単離された核酸分子。

20

【請求項12】

(a)または(b)に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する請求項11に記載の単離された核酸分子。

【請求項13】

請求項1に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項14】

ベクターにより形質転換した宿主細胞により認識される制御配列に、前記核酸分子が作用可能にリンクする、請求項13に記載のベクター。

【請求項15】

登録番号(i)PTA-3376(DNA146649-1789R1)、(ii)PTA-1627で、または(iii)PTA-1971(DNA149995-2871)でATCCに寄託された核酸分子。

30

【請求項16】

請求項13に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項17】

前記細胞が、CHO細胞、大腸菌および酵母からなる群から選択される、請求項16に記載の宿主細胞。

【請求項18】

請求項17に記載の宿主細胞を、前記NS4ポリペプチドの発現に適した条件下で培養すること、および細胞培地から前記NS4ポリペプチドを回収することを含む、NS4ポリペプチド生成方法。

40

【請求項19】

(i)図4(a)(配列番号4)の約1または約20から約87、(ii)図4(b)(配列番号5)の約1または約20から約95、または(iii)図4(c)(配列番号6)の約1または約20から約95のアミノ酸残基の配列に対し、少なくとも約80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、単離されたNS4ポリペプチド。

【請求項20】

(i)図4(a)(配列番号4)の約1または約20から約87、(ii)図4(b)(配列番号5)の約1または約20から約95、または(iii)図4(c)(配列番号6)の約1または約20から約95のアミノ酸残基を含む、請求項19に記載の単離された

50

NS4ポリペプチド。

【請求項21】

(i) 2001年5月15日にATCC寄託番号PTA-3376(DNA146649-1789R1)で、(ii) 2000年4月4日にATCC寄託番号PTA-1627で、または(iii) 2000年5月31日にATCC寄託番号PTA-1971(DNA149995-2871)でATCCに寄託されたベクターのcDNA挿入によりコードされるポリペプチドに対し、少なくとも約80%の配列同一性を有する、単離されたNS4ポリペプチド。

【請求項22】

(i) 2001年5月15日にATCC寄託番号PTA-3376(DNA146649-1789R1)で、(ii) 2000年4月4日にATCC寄託番号PTA-1627で、または(iii) 2000年5月31日にATCC寄託番号PTA-1971(DNA149995-2871)でATCCに寄託されたベクターのcDNA挿入によりコードされる、請求項21に記載の単離されたNS4ポリペプチド。 10

【請求項23】

(i) 図4(a)(配列番号4)の約1または約20から約87、(ii) 図4(b)(配列番号5)の約1または約20から約95、または(iii) 図4(c)(配列番号6)の約1または約20から約95のアミノ酸残基の配列、あるいは、抗NS4抗体に結合部位を提供するのに十分なその断片を含む、単離されたNS4ポリペプチド。

【請求項24】

(i) ストリンジェントな条件の下で、(a)(i) 図4(a)(配列番号4)の約1または約20から約87、(ii) 図4(b)(配列番号5)の約1または約20から約95、または(iii) 図4(c)(配列番号6)の約1または約20から約95のアミノ酸残基の配列を含むNS4ポリペプチドをコードするDNA分子、あるいは(b)(a)のDNA分子の相補鎖と、試験DNA分子とをハイブリダイズすること、(ii) 前記ポリペプチドの発現に適した条件の下で前記試験DNA分子を含む宿主細胞を培養すること、および(iii) 細胞培地から前記ポリペプチドを回収することにより生成される、単離されたポリペプチド。 20

【請求項25】

(a) または(b) に対して前記試験DNAが少なくとも約80%の配列同一性を有する、請求項24に記載の単離されたポリペプチド。 30

【請求項26】

異種アミノ酸配列に融合されたNS4ポリペプチドを含むキメラ分子。

【請求項27】

前記異種アミノ酸配列は、エピトープタグ配列または免疫グロブリンのFc領域である、請求項26に記載のキメラ分子。

【請求項28】

NS4ポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項29】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、および抗体断片からなる群から選択される、請求項28に記載の抗体。 40

【請求項30】

製薬的に許容される担体を含む混合材料中に、(a) NS4ポリペプチド、(b) NS4ポリペプチドのアゴニスト、(c) NS4ポリペプチドのアンタゴニスト、または(d) 抗NS4抗体を含む物質の組成物。

【請求項31】

a) NS4の試料に候補生物活性剤を加えること、および  
b) 前記NS4に対する前記候補剤の結合を決定すること  
を含み、NS4に対する結合能を有する生物活性剤のスクリーニング方法であって、結合が生物活性剤のNS4に対する結合能を示す、方法。 50

## 【請求項 3 2】

NS 4 の活性を調節する能力を有する生物活性剤のスクリーニング方法であって、

a) NS 4 の試料に候補生物活性剤を加えること、および

b) NS 4 の生物学的活性における変調を決定すること

を含み、変調が NS 4 の活性を調節する生物活性剤の能力を示す、スクリーニング方法。

## 【請求項 3 3】

NS 4 のレセプターを同定する方法であって、NS 4 に細胞膜物質を含む組成物を組み合わせ、NS 4 を細胞膜物質上のレセプターと複合させることと、前記レセプターを NS 4 レセプターとして同定することを含む同定方法。

## 【請求項 3 4】

NS 4 は前記レセプターに結合し、前記 NS 4 とレセプターを架橋する段階をさらに含む、請求項 3 3 に記載の同定方法。

## 【請求項 3 5】

前記組成物が細胞である、請求項 3 3 に記載の方法。

## 【請求項 3 6】

前記組成物が細胞膜抽出調製物である、請求項 3 3 に記載の方法。

## 【請求項 3 7】

体重異常を有する個体の治療方法であって、治療的に有効量の NS 4 を含む組成物を前記個体に投与することを含む方法。

## 【請求項 3 8】

体重異常が肥満、悪液質および摂食障害からなる群から選択される、請求項 3 7 に記載の方法。

## 【請求項 3 9】

前記肥満の治療方法が、さらに、肥満に関連する状態の治療に繋がる、請求項 3 8 に記載の治療方法。

## 【請求項 4 0】

前記 NS 4 が、図 4 ( a ) ( 配列番号 4 )、図 4 ( b ) ( 配列番号 5 ) または図 4 ( c ) ( 配列番号 6 ) に示すアミノ酸配列に対し、少なくとも約 80 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 3 7 に記載の方法。

## 【請求項 4 1】

個体の総体重を減少させる方法であって、治療的に有効量の NS 4 を前記個体に投与することを含む、方法。

## 【請求項 4 2】

前記総体重の減少が、前記個体の体脂肪の減少を含む、請求項 3 7 に記載の治療方法。

## 【請求項 4 3】

前記 NS 4 が、図 4 ( a ) ( 配列番号 4 )、図 4 ( b ) ( 配列番号 5 ) または図 4 ( c ) ( 配列番号 6 ) に示すアミノ酸配列に対し、少なくとも約 80 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 3 7 に記載の治療方法。

## 【請求項 4 4】

治療的に有効量の NS 4 を前記個体に投与することを含む、個体における少なくとも 1 種のトリグリセリドまたは遊離脂肪酸のレベルを減少させる方法。

## 【請求項 4 5】

前記 NS 4 が、図 4 ( a ) ( 配列番号 4 )、図 4 ( b ) ( 配列番号 5 ) または図 4 ( c ) ( 配列番号 6 ) に示すアミノ酸配列に対し、少なくとも約 80 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 4 4 に記載の方法。

## 【請求項 4 6】

治療的に有効量の NS 4 を個体に投与することを含む、個体の代謝率を上昇させる方法。

## 【請求項 4 7】

前記 NS 4 が、図 4 ( a ) ( 配列番号 4 )、図 4 ( b ) ( 配列番号 5 ) または図 4 ( c ) ( 配列番号 6 ) に示すアミノ酸配列に対し、少なくとも約 80 % のアミノ酸配列同一性を

10

20

30

40

50

有する、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

NS 4 をコード化する導入遺伝子を含むゲノムを有する齧歯動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳類の体重制御に関わる新規遺伝子である、ヒト NS 4 遺伝子を含めた NS 4 遺伝子に関する。本発明の範囲には、本明細書で NS 4 ポリペプチドと称される新規ポリペプチドをコード化する新規 DNA の同定および単離と、その組み換え生産と、哺乳類の体重制御に關与するそのようなポリペプチドを使用する方法、組成物およびアッセイとを含む。本発明は、NS 4 核酸のヌクレオチド配列、宿主細胞発現系、およびトランスジェニック動物を含め、そのような発現系により形質転換した宿主を包含する。さらには、NS 4 タンパク質、NS 4 アミノ酸配列を含むポリペプチドおよびペプチド、NS 4 タンパク質の融合タンパク質、ポリペプチドおよびペプチド、ならびにそれらに特異的に結合する抗体も本発明に含まれる。

10

【0002】

本発明はまた、肥満、悪液質、および摂食障害を含む哺乳類の体重異常の診断と治療、ならびに、そのような異常に陥り易い対象を特定するための、方法および組成物に関する。さらに、本発明は、NS 4 ポリペプチドの発現および/または NS 4 ポリペプチドの活性を調節する組成物を同定するための、本発明の NS 4 ポリペプチドの使用法に関する。そのような化合物は、肥満、悪液質、および摂食障害を含む哺乳類の体重異常の治療における治療薬として有用である。

20

【背景技術】

【0003】

肥満は、現代社会に広く（壮年人口の 30 から 50 %）蔓延する慢性病である。神経性食欲不振症および神経性過食症などの他の体重異常も健康に対する深刻な脅威となっている。さらに、摂食障害および悪液質（消耗）などの障害は、癌、嚢胞性繊維症、および AIDS など、他の疾病の顕著な兆候である。肥満、または除脂肪体重に対する体脂肪の過多は、社会的な不名誉だけでなく、寿命短縮、有害な心理的発達、生殖疾患、例えば多嚢胞卵巣、感染症、静脈瘤、黒色表皮腫、及び湿疹などの皮膚疾患、運動不耐性症、代謝異常、摂食亢進、糖尿病、インシュリン抵抗症、高血圧、高コレステロール血症、脳卒中、高脂血症、胆石症、骨関節炎、整形外科的傷害、血栓疾患、癌、及び心臓冠状動脈疾患を含む多くの医学的課題と関連がある。（Rissanen 他、British Medical Journal, 301: 835-837, 1990年；Nishina, P.M. 他、Metab. 43: 554-558, 1994年；Grundy, S.M. & Barnett, J.P., Dis. Mon. 36: 641-731, 1990年）。

30

【0004】

肥満は単に行動上の問題、つまり自発的過食ではない。むしろ、肥満体の対象と正常体重の対象との間に見られる身体の差異は、代謝および神経性/代謝性相互作用に起因している。これらの差異は、或る程度までは、遺伝子発現、および/または遺伝子産物または遺伝子活性の差異によるものである（Friedman, J.M. 他、Mammalian Gene 1: 130-144, 1991年）。

40

【0005】

肥満疫学は、この障害が遺伝的特徴を提示することを強く示している（Stunkard, N. Eng. J. Med. 322: 1438, 1990年）。Moll は、多くの人種において肥満は少数の遺伝子座によって制御されると思われることを報告している（Moll 他、Am. J. Hum. Gen. 49: 1243, 1991年）。加えて、ヒト双生児の研究は、体重管理は実質的に遺伝子に基づくことを強く示唆し、その遺伝率は 80 - 90 % と推定している（Simopoulos, A.P. & Childs, B., Eds., 1989年、"Genetic Variation and Nutrition in Obesity", World Review of Nutrition and Diabetes 63, S. Karger, Basel, Switzerland; Borjeson, M., 1976年, Acta Paediatr. Scand. 65: 279-287）。

50

## 【0006】

他の研究では、体系的に過食することにより意図的に体重増加を試みた非肥満の人は、そのような体重増加に対する耐性が比較的大きく、非常に高カロリーの摂取によってのみ増加した体重を維持することができた。対照的に、自然的に肥満の人は、通常または中程度の高カロリー摂取のみで肥満状態を維持できた。加えて、異なる系統の豚、牛等が肥満に対して異なる傾向を有していることは、動物管理において常識的である。ヒト肥満および肥満の動物モデルの遺伝子研究は、肥満が、食物摂取および食事誘発性エネルギー消費の両方、ならびに脂肪の身体同化作用と非脂肪の身体同化作用とのバランスの、複合的な制御欠陥に起因することを示している。

## 【0007】

ヒトおよびその他の種には、顕著な症状に肥満を特徴とする多くの遺伝病があり、多くの場合異常形態的特徴および精神発達遅滞を伴う。例えば、プラダー・ウィリ症候群 (PWS; Knoll, J.H.他、Am. J. Med. Genet. 46: 2-6, 1993年参照) は約出生20,000件のうち1件に発生し、新生児の筋緊張不足、顔面および生殖器の奇形、ならびに一般的肥満を伴う。

## 【0008】

PWSに加え、その他多くの多面的症候群が、その症状に肥満を含むことを特徴としている。これら症候群は遺伝的に単純で、常染色体劣性対立遺伝子に關与しているように思われる。このような疾病には、中でも、アールストロム (Ahlstroem) 症候群、カーペンター症候群、バルデー・ビードル症候群、コーエン症候群、モルガニー・スチュワート症候群およびモルガニー・モネル症候群が含まれる。

## 【0009】

肥満の研究には、多くのモデルが存在する (例えば、Bray, G. A., Prog. Brain Res. 93: 333-341, 1992年; Bray, G.A., Amer. J. Clin. Nutr. 5: 891-902, 1989年を参照)。例えば、肥満の症状を含む症候群を引き起こす突然変異を有する動物も同定されている。このような動物を肥満研究のモデルとして使用しようとする試みが行われており、遺伝的肥満のためにこれまでに最も良く研究された動物モデルはマウスである。(参考文献として、例えば Friedman, J.M.他、Mamm. Gen. 1: 130-144, 1991年; Friedman, J.M.および Liebel, R.L., Cell 69: 217-220, 1992年を参照のこと。)

## 【0010】

マウスを使った研究により、肥満が、遺伝率の高い非常に複雑な性質を有することが確認された。多数の遺伝子座における突然変異が肥満表現形に繋がることが同定されている。これらには、常染色体劣性突然変異 *obese (ob)*、*diabetes (db)*、*fat (fat)* および *tubby (tub)* を含む。

## 【0011】

アグーチ座における優性の *Yellow* 突然変異 (*Ay*) は、中程度の成人発症肥満、黄色の毛色、腫瘍形成の高発症率の原因となる多面的症候群 (Herberg, L.および Coleman, D.L., Metabolism 26:59, 1977年)、ならびに体脂肪の異常な解剖学的分布 (Coleman, D.L., Diabetologia 14: 141-148, 1978年) を引き起こす。突然変異により、通常は新生児の皮膚のみでしか見られないタンパク質の広範囲に亘る発現が見られる (Michaud, E. J.他、Genes Devel. 8: 1463-1472, 1994年)。アグーチタンパク質は、インビトロにおけるメラノコルチンレセプター MC1-R および MC4-R に結合する *α-MSH* の競合アンタゴニストであることが報告されており (Lu他、Nature 371: 799-802, 1996年)、その中で著者は、アグーチの制御されていない偏在性発現が、毛嚢外に発現したメラノコルチンレセプターの拮抗作用により、肥満を引き起こすと推察している。

## 【0012】

したがって、要約すると、肥満は世界的に重要な健康問題であり、遺伝率の高い複合型疾病である。このような疾患の重大性、高い罹患率、不均一性の可能性を考えると、体重管理に関わる遺伝子の同定に対するニーズは大きい。

## 【0013】

10

20

30

40

50

我々の社会における肥満の蔓延と、上述したようなそれに関する深刻な結果を考えると、肥満患者の減量に有効である可能性のある治療薬は、患者の健康に大きな効果を持ちうる。製薬業界では、大きな副作用無しに肥満患者の総体重を理想体重まで減少させ、肥満患者がその減少した体重を維持するのを助ける薬剤が必要とされている。

【0014】

肥満に対する現在既知の治療法は、標準的な食事療法および運動、低カロリーの食事、行動療法、食欲抑制剤、発熱薬剤、食事吸収阻害剤に関する薬物療法、顎配線、ウェストコード及び風船のような機械装置、及び手術を含む。(Jung及びChong, *Clinical Endocrinology*, 35: 11-20(1991); Bray, *Am. J. Clin. Nutr.*, 55: 538S-544S, 1992年)。タンパク質節約修飾絶食が、思春期の減量において効果的であることが報告されている。(Leeら., *Clin. Pediatr.*, 31:234-236, 1992年4月)。肥満の治療としてのカロリー制限は、貯蔵体タンパク質の異化を引き起こし、負の窒素バランスを起こす。従って、タンパク質補給食事療法は、カロリー制限下での窒素減少を少なくする手段として人気を得ている。残念なことには、このような食事療法では、単に緩やかな窒素節約しか生じないので、細い体容積と貯蔵タンパク質を維持するためのより効果的な方法が必要である。更に、肥満の理想的な治療には、体脂肪の減少を加速させることが含まれる。このような処置への種々の手段は、Weintraub及びBray, *Med. Clinics N. Amer.*, 73: 237(1989); Bray, *Nutrition Reviews*, 49:33(1991)で論じられているものを含む。

10

【0015】

このように、肥満患者の体重を正常で理想的な体重に戻すのに有用な治療法が求められている。

20

【0016】

さらに、長期的に低体重を維持できる、肥満およびその他体重異常の療法が求められている。

【発明の開示】

【0017】

(本発明の概要)

本発明は、体重の制御に関与し、さらには肥満、悪液質および摂食障害などの哺乳類の体重異常に関わる新規ポリペプチドをコード化する核酸の同定に関する。核酸分子は、ヒトNS4ポリヌクレオチドを含む哺乳類NS4ポリヌクレオチドに対応するヌクレオチド配列を示す。本発明の核酸分子の具体的な例を、本明細書ではDNA146649-1789R1、DNA149986-2883およびDNA149995-2871と表示する。

30

【0018】

一実施形態では、本発明はNS4ポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。特に、このようなNS4ポリペプチドは、PRO19652ポリペプチド、PRO19816ポリペプチド、PRO19650ポリペプチドでありうる。

【0019】

一実施態様では、単離された核酸分子は、(a)概ね(i)図4(a)(配列番号4)の1または約20から約87、(ii)図4(b)(配列番号5)の1または約20から約95、または(iii)図4(c)(配列番号6)の1または約20から約95のアミノ酸残基の配列を有するポリペプチドをコード化するDNA分子、あるいは、(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、または少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

40

【0020】

別の態様では、単離された核酸分子は、(a)(i)図4(a)(配列番号4)の1または約20から約87、(ii)図4(b)(配列番号5)の1または約20から約95、

50

または ( i i i ) 図 4 ( c ) ( 配列番号 6 ) の 1 または約 20 から約 95 のアミノ酸残基の配列を有する NS4 ポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列、あるいは、( b ) ( a ) の DNA 分子の相補鎖を含む。

【 0 0 2 1 】

さらに別の態様では、単離された核酸分子は、( a ) 概ね ( i ) 図 1 ( 配列番号 1 ) の 486 または約 543 から約 746、( i i ) 図 2 ( 配列番号 2 ) の 1784 または約 1841 から約 2068、または ( i i i ) 図 3 ( 配列番号 3 ) の 447 または約 504 から約 731 のヌクレオチド配列を有する DNA 分子、あるいは、( b ) ( a ) の DNA 分子の相補鎖に対して、少なくとも約 80% の核酸配列同一性、または少なくとも約 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

10

【 0 0 2 2 】

また別の態様では、単離された核酸分子は、( a ) ( i ) 図 1 ( 配列番号 1 ) の約 486 または約 543 から約 746、( i i ) 図 2 ( 配列番号 2 ) の約 1784 または約 1841 から約 2068、または ( i i i ) 図 3 ( 配列番号 3 ) の約 447 または約 504 から約 731 のヌクレオチド配列、あるいは、( b ) ( a ) の DNA 分子の相補鎖を含む。

【 0 0 2 3 】

また別の態様では、単離された核酸分子は、( a ) ( i ) 2001 年 5 月 15 日に ATCC 寄託番号 PTA - 3376 ( DNA 146649 - 1789R1 ) で、( i i ) 2000 年 4 月 4 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1627 ( DNA 149986 - 2883 ) で、または ( i i i ) 2000 年 5 月 31 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1971 ( DNA 149995 - 2871 ) で ATCC に寄託されたヒトタンパク質 cDNA によりコード化されるその成熟ポリペプチドをコード化する DNA 分子、あるいは、( b ) ( a ) のヌクレオチド配列の相補鎖に対し、少なくとも約 80% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

20

【 0 0 2 4 】

また別の態様では、単離された核酸分子は、( a ) ( i ) 2001 年 5 月 15 日に ATCC 寄託番号 PTA - 3376 ( DNA 146649 - 1789R1 ) で、( i i ) 2000 年 4 月 4 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1627 ( DNA 149986 - 2883 ) で、または ( i i i ) 2000 年 5 月 31 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1971 ( DNA 149995 - 2871 ) で ATCC に寄託された DNA の完全長ポリペプチドコード化配列、あるいは、( b ) ( a ) のヌクレオチド配列の相補鎖に対し、少なくとも約 80% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

30

特定の態様では、単離された核酸分子は、( a ) ( i ) 2001 年 5 月 15 日に ATCC 寄託番号 PTA - 3376 ( DNA 146649 - 1789R1 ) で、( i i ) 2000 年 4 月 4 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1627 ( DNA 149986 - 2883 ) で、または ( i i i ) 2000 年 5 月 31 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1971 ( DNA 149995 - 2871 ) で ATCC に寄託された DNA の完全長ポリペプチドコード化配列、あるいは、( b ) ( a ) のヌクレオチド配列の相補鎖を含む。

40

【 0 0 2 5 】

さらに別の態様では、単離された核酸分子は、概ね ( a ) ( i ) 図 4 ( a ) ( 配列番号 4 ) の 1 または約 20 から約 87、( i i ) 図 4 ( b ) ( 配列番号 5 ) の 1 または約 20 から約 95、または ( i i i ) 図 4 ( c ) ( 配列番号 6 ) の 1 または約 20 から約 95 のアミノ酸残基をコード化する核酸配列、あるいは、( b ) ( a ) の DNA 分子の相補鎖、の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む後述の活性 NS4 ポリペプチドをコ

50

ード化するヌクレオチド配列である。

【0026】

さらに別の態様では、単離された核酸分子は、(a)(i)図1(配列番号1)の約486または約543から約746、(ii)図2(配列番号2)の約1784または約1841から約2068、または(iii)図3(配列番号3)の約447または約504から約731のヌクレオチドの間の核酸配列、あるいは、(b)(a)のDNA分子の相補鎖、の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む後述の活性NS4ポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列である。好ましくは、ハイブリダイゼーションはストリンジентなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件で行われる。

【0027】

さらに別の態様では、単離された核酸は、少なくとも約22のヌクレオチド残基を含むヌクレオチド配列であって、(a)(i)図4(a)(配列番号4)の約1または約20から約87、(ii)図4(b)(配列番号5)の約1または約20から約95、または(iii)図4(c)(配列番号6)の約1または約20から約95のアミノ酸残基の配列を有するNS4ポリペプチドをコード化するDNA分子、あるいは、(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対し、試験DNA分子が、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の核酸配列同一性を有するストリンジентな条件下で、試験DNA分子をハイブリダイゼーションすること、および試験DNA分子を単離することにより生じるヌクレオチド配列である。

【0028】

さらに別の態様では、単離された核酸分子は、N末端シグナル配列および/または開始メチオニンを持たないNS4ポリペプチドをコード化するか、またはそのようなコード化核酸分子と相補的であるDNAを含む。シグナルペプチドを、それぞれ図4(a)、4(b)および4(c)(配列番号4、5および6)の約アミノ酸1位から約アミノ酸19位から伸びていると仮に同定した。しかしながら、シグナルペプチドのC末端境界は様々であるが、本明細書の冒頭で述べたように、シグナルペプチドC末端境界のいずれの側においても約5アミノ酸を超えないと考えるのが妥当であることに注意されたい。この場合、シグナルペプチドのC末端境界は、そのようなタイプのアミノ酸配列エレメントを同定する技術において通常採用される基準に従って同定することができる(例えば、Nielsen他、*Prot. Eng.* 10:1-6, 1997年およびvon Heinje他、*Nucl. Acids. Res.* 14:4683-4690, 1986年)。さらに、分泌ポリペプチド由来のシグナル配列の分割が完全に均一でなく、その結果分泌種が複数になる場合があることが認識されている。本発明では、これらのポリペプチド、およびそれらをコード化するポリヌクレオチドについて考慮する。このため、本発明の用途のための、図4(a)、4(b)および4(c)(配列番号4、5および6)にそれぞれ示すNS4ポリペプチドのシグナルペプチドは、図4(a)、4(b)および4(c)のアミノ酸1からXからそれぞれ伸びている。ここで、Xは、図4(a)、4(b)および4(c)(配列番号4、5および6)それぞれのアミノ酸14ないし24のいずれか1つである。したがって、本発明に含まれるNS4ポリペプチドの成熟形態は、:(i)図4(a)(配列番号4)のXから87;(ii)図4(b)(配列番号5)のXから95、および(iii)図4(c)(配列番号6)のXから95アミノ酸残基を含むものを含む(Xは図4(a)(配列番号4)、図4(b)(配列番号5)および図4(c)(配列番号6)の14ないし24のいずれか1つのアミノ酸であり、その変異体は後述する)。これらポリペプチドをコード化する単離された核酸分子についても考慮する。

【0029】

さらに別の態様では、本発明は、例えばハイブリダイゼーションプローブとしての使用が可能なコード化配列を含むか、または抗NS4抗体に対する結合部位を含むポリペプチドを随意的にコード化するNS4ポリペプチドの断片をコード化するための、NS4ポリペプチド配列の断片を提供する。このような核酸断片は、通常は少なくとも約6、7、8

10

20

30

40

50

, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長にその参照長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列断片は図1（配列番号1）、図2（配列番号2）または図3（配列番号3）に示したヌクレオチド配列のコード化領域のいずれかから得られる。NS4ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、よく知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを使用してNS4ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を他の既知のヌクレオチド配列にアラインメントさせ、どのNS4ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することによって、常套的に決定し得ることを理解されたい。そのようなNS4ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の全てがここで考慮され、実験を過度に行うこと無しに決定される。また考慮されるものは、これらのヌクレオチド分子断片によりコード化されるNS4ポリペプチド断片、好ましくは抗NS4抗体に対する結合部位を含んでなるNS4ポリペプチド断片である。

10

20

30

40

#### 【0030】

さらに別の態様では、本発明はNS4またはその変異体をコード化するヌクレオチド配列を含むベクター（例えば発現ベクター）を提供する。このベクターは、上述の単離された核酸分子配列のいずれかを含むことができる。このようなベクターを含む宿主細胞も提供される。宿主細胞は、例えば、CHO細胞、大腸菌、バキュロウイルス、感染昆虫細胞、または酵母である。一態様では、本発明は、トランスジェニック動物を含め、NS4コード化ヌクレオチド配列により形質変換した宿主生物を含む。

#### 【0031】

別の実施態様では、本発明のトランスジェニック動物はNS4変異体、特に肥満、悪液質または摂食障害などの体重異常に関連した変異体を提供する。特に、そのようなトランスジェニック動物は、通常よりも高いか、または低いレベルでNS4導入遺伝子を発現するものを含む。別の特定の態様では、トランスジェニック動物は細胞のすべて又は一部（「モザイク」）でNS4を発現するものを含む。さらに別の特異的態様では、そのようなトランスジェニック動物は、NS4核酸が特定のタイプの細胞のみに導入されて発現しているものをさらに含む。さらに別の特異的態様では、本発明は「ノックアウト」動物、またはNS4ポリヌクレオチドを発現しないように、またはその発現量が低くなるように修飾された動物を含む。

#### 【0032】

さらに別の実施態様では、本発明は、上記で同定した単離された核酸配列によりコード化される単離されたNS4ポリペプチドを提供する。一態様では、本発明は単離された天然配列NS4ポリペプチドを提供し、それは一部の実施形態において、概ね、(i)図4(a)（配列番号4）の1または約20から87、(ii)図4(b)（配列番号5）の1または約20から約95、または(iii)図4(c)（配列番号6）の1または約20から約95の残基を含むアミノ酸配列を含む。

#### 【0033】

50

別の態様では、本発明は、概ね ( i ) 図 4 ( a ) ( 配列番号 4 ) の 1 または約 20 から 87、( i i ) 図 4 ( b ) ( 配列番号 5 ) の 1 または約 20 から約 95、または ( i i ) 図 4 ( c ) ( 配列番号 6 ) の 1 または約 20 から約 95 のアミノ酸残基の配列に対し、少なくとも約 80% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の核酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離された NS4 ポリペプチドを提供する。

**【0034】**

さらに別の態様では、単離された NS4 ポリペプチドは、( i ) 2001 年 5 月 15 日に ATCC 寄託番号 PTA - 3376 ( DNA 146649 - 1789R1 ) で、( i i ) 2000 年 4 月 4 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1627 ( DNA 149986 - 2883 ) で、または ( i i i ) 2000 年 5 月 31 日に ATCC 寄託番号 PTA - 1971 ( DNA 149995 - 2871 ) で ATCC に寄託されたヒトタンパク質 cDNA によりコード化されたアミノ酸配列に対し、少なくとも約 80% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の核酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

**【0035】**

さらに別の態様では、単離された NS4 ポリペプチドは、N 末端シグナル配列および/または開始メチオニンを持たないポリペプチドを含み、先述したようなアミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列によりコード化される。この製造方法も本明細書で開示する。これらの方法は、NS4 ポリペプチドの発現に適した条件下において適当なコード化核酸分子を含むベクターを含む細胞を培養することと、細胞培地から NS4 ポリペプチドを回収することを含む。

20

**【0036】**

さらに別の態様では、単離された NS4 ポリペプチドは、( i ) 図 4 ( a ) ( 配列番号 4 ) の 1 または約 20 から 87、( i i ) 図 4 ( b ) ( 配列番号 5 ) の 1 または約 20 から約 95、または ( i i ) 図 4 ( c ) ( 配列番号 6 ) の 1 または約 20 から約 95 のアミノ酸残基の配列か、または生物学的に活性であるかまたは抗 NS4 抗体に対する結合部位を提供するに十分なそのような配列の断片(ここで、生物学的活性を呈するか、または抗 NS4 抗体に対する結合部位を提供する NS4 ポリペプチド断片の同定は、当技術分野でよく知られた技術を使用して常套的に行うことができる)を含むポリペプチドである。好ましくは、NS4 断片は、その性質上、肥満を治療する能力を含めた天然 NS4 ポリペプチドの生物学的活性を保持している。

30

**【0037】**

さらに別の態様では、単離された NS4 ポリペプチドは、( 1 ) 試験 DNA 分子が、( a ) ( i ) 図 4 ( a ) ( 配列番号 4 ) の約 1 または約 20 から約 87、( i i ) 図 4 ( b ) ( 配列番号 5 ) の約 1 または約 20 から約 95、または ( i i i ) 図 4 ( c ) ( 配列番号 6 ) の約 1 または約 20 から約 95 のアミノ酸残基の配列を有する NS4 ポリペプチドをコード化する DNA 分子、あるいは、( b ) ( a ) の DNA 分子の相補鎖に対して、少なくとも約 80% の配列同一性、あるいは、少なくとも約 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の核酸配列同一性を有するストリンジェントな条件下で、試験 DNA 分子をハイブリダイズすること、( 2 ) ポリペプチドの発現に適した条件の下で試験 DNA 分子を含む宿主細胞を培養すること、および ( 3 ) 細胞培地からポリペプチドを回収することにより、生成されるポリペプチドである。

40

**【0038】**

さらに別の実施形態では、本発明は、異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合した NS4 ポリペプチドを含むキメラ分子を提供する。ここで、NS4 ポリペプチドは、先述した NS4 ポリペプチド、その変異体または断片を含んでよい。このようなキメラ分子の例

50

は、免疫グロブリンのエピトープタグ配列、またはFc領域に融合したNS4ポリペプチドを含む。

【0039】

別の実施形態では、本発明は、先述のNS4ポリペプチドと特異的に結合する以下に定義する抗体を提供する。随意で、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、または一本鎖抗体である。

【0040】

さらに別の実施形態では、本発明は天然NS4ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを提供する。特定の実施形態では、アゴニストまたはアンタゴニストは、小分子、NS4ポリペプチドによりコード化されるアミノ酸配列に対する抗体、アンチセンスまたはリボザイム分子またはDNA、あるいは、NS4ポリペプチドの発現を阻害または増強するために使用できる制御配列置換構築物である。

10

【0041】

さらに別の実施形態では、本発明は、NS4ポリペプチドに候補分子を接触させること、および前記NS4ポリペプチドが媒介する生物学的活性をモニターすることからなる、NS4ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの同定方法を提供する。特定の態様では、NS4ポリペプチドは天然配列NS4ポリペプチドである。

【0042】

さらに別の実施形態では、本発明は、担体と共に、NS4ポリペプチド、またはここに開示するNS4ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト、または抗NS4抗体を含む物質の組成物を、提供する。随意で、担体は、製薬的に許容される担体である。そのようなアゴニストまたはアンタゴニストは、例えば、小分子、NS4ポリペプチドに対する抗体、アンチセンスおよびリボザイムの分子およびDNA、またはNS4ポリヌクレオチドの発現を阻害するか増強するために使用可能な制御配列置換構築物を含む。

20

【0043】

さらに別の実施形態では、本発明は、NS4ポリペプチド、そのアゴニストまたはアンタゴニスト、あるいは抗NS4抗体に反応する状態の治療に有用な薬物の調製のための、NS4ポリペプチド、あるいは上述したNS4ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト、あるいは抗NS4抗体の使用法を提供する。

【0044】

さらに別の実施形態では、本発明は、NS4に結合できる生物活性剤のスクリーニング方法を提供する。一態様では、本方法は、NS4の試料に候補生物活性剤を加えることと、前記候補剤が前記NS4に結合するかの判断を行うこと（結合は、生物活性剤のNS4に対する結合能を示す）を含む。

30

【0045】

さらに別の実施形態では、本発明は、NS4の活性を調節することができる生物活性剤のスクリーニング方法を提供する。一態様では、本方法は、候補生物活性剤をNS4の試料に加える過程と、NS4の生物学的活性の変調を判断する工程を有し、ここで、変調は生物活性剤がNS4の活性を調節できることを示している。特定の一態様では、NS4活性は細胞中のグルコース取り込みを減少させる。別の特異的实施態様では、NS4活性は細胞からのレプチン放出を増大させる。さらに別の特異的態様では、NS4活性はグルコースの取り込み低下と細胞からのレプチン放出の増大の両方を行う。さらに別の特異的態様では、細胞は含脂肪細胞である。別の態様では、NS4活性は脂質および炭水化物の酸化を増大させる。さらに別の特異的態様では、細胞は肝細胞または筋肉細胞である。

40

【0046】

さらに別の実施形態では、本発明は、NS4のレセプターの同定方法を提供する。一態様では、本方法はNS4と細胞膜物質を含む組成物を組み合わせ、細胞膜物質上のレセプターとNS4を複合させることと、前記レセプターをNS4レセプターとして同定することを含む。一態様では、本方法は前記NS4とレセプターを架橋する工程を含む。細胞膜は無傷細胞か、または細胞膜抽出標本由来でありうる。

50

## 【0047】

さらに別の実施形態では、細胞、好ましくは含脂肪細胞からのレプチン放出を誘導する方法が提供される。一態様では、本方法は、少なくともレプチン放出を誘導するのに有効な量のNS4を細胞に対して投与することを含む。

## 【0048】

さらに別の実施形態では、細胞内、好ましくは含脂肪細胞内へのグルコース摂取の低下を誘導する方法が提供される。一態様では、本方法は、少なくともグルコース摂取の低下を誘導するのに有効な量のNS4を細胞に対して投与することを含む。

## 【0049】

さらに別の実施形態では、本発明は、少なくとも治療上有効な量のNS4ポリペプチドを含む組成物の投与を含む、体重異常について個体を治療する方法を提供する。一態様では、体重異常は肥満、悪液質、または摂食障害である。さらなる態様では、体重異常は、嚢胞性卵巣病、皮膚感染、静脈瘤、黒色表皮腫、及び湿疹、運動不耐性症、代謝異常、摂食亢進、糖尿病、インシュリン抵抗症、高血圧、高コレステロール血症、脳卒中、高脂血症、動脈硬化、胆石症、骨関節炎、整形外科的傷害、血栓疾患、癌、及び冠状動脈心疾患である。さらに別の態様では、治療対象となる体重異常は、癌、嚢胞性繊維症またはAIDSに関連している。

10

## 【0050】

さらに別の実施形態では、本発明は少なくとも治療上有効な量のNS4ポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストの個体への投与を含む、体重異常を被っている個体の治療方法を提供する。一態様では、個体の総体重が減少する。別の態様では、総体重に占める脂肪の割合が低下する。さらに別の態様では、総体重に占める除脂肪体重（非脂肪性組織）の割合が増大する。さらに別の態様では、個体の血清中の少なくとも1種のトリグリセリドまたは遊離脂肪酸の値が低下する。さらに別の態様では、個体の代謝率が上昇または低下する。

20

## 【0051】

さらに別の実施形態では、本発明は、哺乳類の体重異常の診断、ならびにそのような障害を生じ易い患者の識別のための方法を提供する。一態様では、本方法は、このような体重異常が疑われる患者からの試料のNS4の発現を測定することと、当該発現レベルを正常値と比較し、差異が認められる場合に体重異常を検出することとを含む。別の態様では、本方法は、体重異常の存在と相関する、患者の試料のNS4ポリヌクレオチド中の突然変異を検出することを含む。さらに別の態様では、本方法は、診断的DNA増幅分析のためのプライマーとして、または診断的ハイブリダイゼーションプローブとして、NS4核酸分子を使用することにより、NS4 DNA突然変異、対立遺伝子の変化、または制御欠陥、例えばNS4ポリヌクレオチドの発現の欠陥を同定することを含む。さらに別の態様では、本発明は、特定のNS4突然変異、対立遺伝子の変化、または制御欠陥に関連する体重異常を生じ易い個体の同定のための、DNA増幅分析の使用に関する。

30

## 【0052】

さらに別の実施形態では、本発明は、NS4ポリヌクレオチドおよび/またはNS4ポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための細胞および非細胞アッセイを提供する。特定の態様では、本発明による細胞ベースアッセイは、NS4ポリペプチドを発現する細胞、細胞系、あるいは構築細胞または細胞系を使用する。

40

## 【0053】

さらに別の実施形態では、本発明は、哺乳類NS4ポリヌクレオチドの発現および/またはその生物学的活性のレベルを調節する化合物を同定する方法を提供する。一態様では、本方法は：

- (a) NS4ポリヌクレオチドを発現する細胞に化合物を接触させること、
- (b) 細胞中のNS4 DNA発現レベルを測定すること、および
- (c) (b)で獲得したレベルを、化合物が存在しない状態で獲得されたNS4発現レベルと比較すること

50

を含み、化合物が存在しない状態で獲得されたレベルと (b) で取得したレベルとが相違する場合、NS4 活性を調節する化合物が同定される。

【0054】

さらに別の実施形態では、本発明は：

(a) NS4 ポリペプチドを含む細胞に化合物を接触させること、

(b) 細胞中の NS4 ポリペプチド、または活性のレベルを測定すること、および

(c) (b) で得られたレベルを、化合物が存在しない状態で得られた NS4 ポリペプチドまたは活性のレベルと比較すること

を含み、化合物が存在しない状態で得られたレベルと (b) で得られたレベルとが相違する場合に NS4 活性を調節する化合物が同定される、NS4 ポリペプチドの生物学的活性を調節する化合物の同定方法を提供する。

10

【0055】

さらに別の実施形態では、本発明は：

(a) 宿主 (例えば、NS4 導入遺伝子を発現するトランスジェニック動物) に化合物を投与すること、

(b) NS4 遺伝子転写物、NS4 発現または NS4 活性のレベルを測定すること、および

(c) (b) で獲得したレベルを、化合物が存在しない状態のレベルまたは活性と比較すること

を含み、化合物が存在しない状態で獲得されたレベルと (b) で獲得したレベルとが相違する場合、NS4 活性を調節する化合物が同定される、NS4 ポリペプチドの生物学的活性を調節する化合物の同定方法を提供する。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0056】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

I. 定義

ここで使用される際の「NS4 ポリペプチド」「NS4 タンパク質」及び「NS4」という用語は、天然配列 NS4、NS4 ポリペプチド変異体 (ここでさらに定義される) を含む。NS4 ポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、組換え及び/又は合成方法によって調製してもよい。「NS4ヌクレオチド」という用語は、この段落に記載されるポリペプチドをコード化する核酸を含む。

30

【0057】

「天然配列 NS4」には、天然由来の NS4 と同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。このような天然配列 NS4 は、自然から単離することもできるし、組換え及び/又は合成手段により産生することもできる。「天然配列 NS4」という用語には、特に、NS4 の自然に生じる切断又は分泌形態 (例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態 (例えば、選択的にスプライシングされた形態) 及び自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明のある実施態様では、天然配列 NS4 は、(i) 図 4 (a) (配列番号 4) の約 1 または約 20 から約 87、(ii) 図 4 (b) (配列番号 5) の約 1 または約 20 から約 95、または (iii) 図 4 (c) (配列番号 6) の約 1 または 20 から約 95 のアミノ酸を含む、成熟または完全長天然配列 NS4 である。また、図 4 (a)、図 4 (b) および図 4 (c) に開示された NS4 ポリペプチドは、本明細書においてアミノ酸位 1 として表すメチオニン残基で開始するように示されている一方、図 4 (a) (配列番号 4)、(b) (配列番号 5) および (c) (配列番号 6) におけるアミノ酸位置 1 の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基を各 NS4 ポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし可能でもある。

40

【0058】

NS4 ポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ECD」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しない NS4 ポリペプチドの形態を意味する。通常、NS4 ポリペプチド ECD は、それらの膜貫通及び/又は細胞質ドメインを 1% 未満、好ましくはそのようなドメ

50

インを0.5%未満しか持たない。本発明のNS4ポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約5アミノ酸を越えない可能性が高い。状況に応じては、従って、NS4ポリペプチドの細胞外ドメインは、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン/細胞外ドメインの境界のいずれかの側から約5を越えないアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、それらのポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明で考慮される。

#### 【0059】

ここに開示する種々のNS4ポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、本明細書及び/又は添付の図面に示す。例えば、DNA146649-1789R1(配列番号1)、DNA149986-2883(配列番号2)およびDNA149995-2871(配列番号3)によってコード化されるタンパク質については、シグナル配列はそれぞれ図1、2、および3に同定されている。しかし、注記するように、シグナルペプチドのC-末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドC-末端境界のいずれかの側で約5アミノ酸以下である可能性が最も高く、シグナルペプチドのC-末端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうる(例えば、Nielsen等, Prot. Eng. 10: 1-6 (1997)及びvon Heinje等, Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986))。さらに、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナル配列の切断は完全に均一ではなく、1つ以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに同定されるシグナルペプチドのC-末端境界の何れかの側の約5アミノ酸未以下で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

#### 【0060】

「NS4変異体ポリペプチド」(「NS4突然変異」または「NS4多型」を含む)とは、(a)(i)図4(a)(配列番号4)の約1または約20から約87、(ii)図4(b)(配列番号5)の約1または約20から約95、または(iii)図4(c)(配列番号6)の約1または約20から約95、(b)(i)図4(a)(配列番号4)のXから87、(ii)図4(b)(配列番号5)のXから95、および(iii)図4(c)(配列番号6)のXから95(ここでXは図4(a)(配列番号4)、図4(b)(配列番号5)および図4(c)(配列番号6)の14から24のアミノ酸のいずれか)、あるいは、(c)図4(a)、4(b)および4(c)(配列番号4、5、6)にそれぞれ示すアミノ酸配列の特に得られた断片のアミノ酸配列と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有するところで定義するような活性NS4ポリペプチドを意味する。このようなNS4変異体ポリペプチドには、例えば、図4(a)(配列番号4)、図4(b)(配列番号5)および図4(c)(配列番号6)の配列のN-および/またはC-末端および1又は複数の内部ドメインにおいて1つ又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたNS4ポリペプチドが含まれる。通常、NS4ポリペプチド変異体は、(a)(i)図4(a)(配列番号4)の約1または約20から約87、(ii)図4(b)(配列番号5)の約1または約20から約95、または(iii)図4(c)(配列番号6)の約1または約20から約95、(b)(i)図4(a)(配列番号4)のXから87、(ii)図4(b)(配列番号5)のXから95、および(iii)図4(c)(配列番号6)のXから95(ここでXは図4(a)(配列番号4)、図4(b)(配列番号5)および図4(c)(配列番号6)の14から24のアミノ酸のいずれか)、あるいは、(c)図4(a)、4(b)および4(c)(配列番号4、5、6)にそれぞれ示すアミノ酸配列の特に得られた断片に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%のアミノ酸配列同一性を有している。NS4変異体ポリペプチドは天然NS4ポリペプチド配列を明確に包含しないものである。通常、NS4変異体ポリペプチドは、少なくとも約

10 アミノ酸長、あるいは少なくとも約20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600アミノ酸長、又はそれ以上である。

#### 【0061】

ここで同定したNS4ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、最大のパーセント配列同一性を得るために、必要ならば配列を整列させて間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部として考慮しない後の、特定のNS4ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNA STAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表1に示したソースコードは米国著作権事務所、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2はジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

#### 【0062】

アミノ酸配列比較のために用いるALIGN-2の状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される：

分率  $X/Y$  の100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのプログラムのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた%アミノ酸配列同一性の計算の例として、「NS4」が対象となる仮説的NS4ポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」が対象となるNS4ポリペプチドが比較されているアミノ酸配列を表し、そして「X」、「Y」及び「Z」の各々が異なった仮説的アミノ酸残基数を表し、表2及び3は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「NS4」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示す。特に断らない限りは、ここで使用する全ての%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2比較コンピュータプログラムを用いた即前出の paragraphs に記載のようにして得られる。

#### 【0063】

「NS4変異体ポリヌクレオチド」又は「NS4変異体核酸配列」とは、ここで定義されるように、活性NS4ポリペプチドをコードし、(a)(i)図4(a)(配列番号4)の約1または約20から約87、(ii)図4(b)(配列番号5)の約1または約20

10

20

30

40

50

から約95、または(iii)図4(c)(配列番号6)の約1または約20から約95、(b)(i)図4(a)(配列番号4)のXから87、(ii)図4(b)(配列番号5)のXから95、および(iii)図4(c)(配列番号6)のXから95(ここでXは図4(a)(配列番号4)、図4(b)(配列番号5)および図4(c)(配列番号6)の14から24のアミノ酸のいずれか)、あるいは、(c)図4(a)、4(b)および4(c)(配列番号4、5、6)にそれぞれ示すアミノ酸配列の特に得られた断片のアミノ酸残基をコード化する核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常、NS4変異体ポリヌクレオチドは、(a)(i)図4(a)(配列番号4)の約1または約20から約87、(ii)図4(b)(配列番号5)の約1または約20から約95、または(iii)図4(c)(配列番号6)の約1または約20から約95の残基をコード化する核酸配列、(b)(i)図4(a)(配列番号4)のXから87、(ii)図4(b)(配列番号5)のXから95、および(iii)図4(c)(配列番号6)のXから95(ここでXは図4(a)(配列番号4)、図4(b)(配列番号5)および図4(c)(配列番号6)の14から24のアミノ酸のいずれか)のアミノ酸をコード化する核酸配列、あるいは、(c)図4(a)、4(b)および4(c)(配列番号4、5、6)にそれぞれ示すアミノ酸配列の特に得られた断片をコード化する核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の核酸配列同一性を有している。NS4ポリペプチド変異体は、天然NS4ヌクレオチド配列を含まない。

#### 【0064】

通常、NS4変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長にその参照長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。

#### 【0065】

ここで同定されるNS4ポリペプチドコード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」とは、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば配列を整列させ、間隙を導入した後の、NS4ポリペプチドコード化核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalig(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者は、比較する配列の全長に亘る最大アラインメントを達成するのに必要なあらゆるアルゴリズムを含め、アラインメント測定に適したパラメータを決定することができる。しかしながら、ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社に

よって作成され、下記の表 1 に示したソースコードは米国著作権事務所、ワシントン D.C.、20559 に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号 TXU510087 で登録されている。ALIGN-2 は ジェネテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、表 1 に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2 プログラムは、UNIX オペレーティングシステム、好ましくはデジタル UNIX V4.0D での使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2 プログラムによって設定され変動しない。

#### 【 0 0 6 6 】

ここでの目的のために、与えられた核酸配列 C の、与えられた核酸配列 D との、又はそれに対する % 核酸配列同一性（あるいは、与えられた核酸配列 D と、又はそれに対して或る程度の % 核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列 C と言うこともできる）は次のように計算される：

分率  $W / Z$  の 100 倍

ここで、W は配列アラインメントプログラム ALIGN-2 の C 及び D のプログラムのアラインメントによって同一であるとスコアされたヌクレオチドの数であり、Z は D の全ヌクレオチドである。核酸配列 C の長さが核酸配列 D の長さとは異なる場合、C の D に対する % 核酸配列同一性は、D の C に対する % 核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。% 核酸配列同一性の計算の例として、表 4 及び 5 が「比較 DNA」と称される核酸配列の「NS4 DNA」と称される核酸配列に対する % 核酸配列同一性の計算方法を示す。特に断らない限りは、ここでの全ての % 核酸配列同一性値は、直上のパラグラフに示したように ALIGN-2 コンピュータプログラムを用いて得られる。

#### 【 0 0 6 7 】

他の実施態様では、NS4 変異体ポリヌクレオチドとは、活性 NS4 ポリペプチドをコードする核酸分子であり、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、図 4 ( a ) ( 配列番号 4 )、図 4 ( b ) ( 配列番号 5 )、または図 4 ( c ) ( 配列番号 6 ) に示す完全長 NS4 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションすることができる。NS4 変異体ポリペプチドは、NS4 変異体ポリヌクレオチドによってコードされているものであり得る。

#### 【 0 0 6 8 】

ここで開示する種々のポリペプチドを記載するために使用される「単離」とは、自然環境の成分から同定及び分離及び / 又は回収されたポリペプチドを意味する。好ましくは、単離されたポリペプチドは、自然的に結合していたすべての成分との結合が無くなったものである。その自然環境の夾雑成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、( 1 )スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも 15 残基の N 末端又は内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、( 2 )クーマシーブルー又は好ましくは銀染色を用いた、非還元又は還元条件下での SDS-PAGE によって均一となるまで精製される。単離されたポリペプチドには、NS4 の自然環境の少なくとも 1 つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも 1 つの精製工程により調製される。

#### 【 0 0 6 9 】

「単離された」NS4 ポリペプチドをコードする核酸は、同定され、NS4 コード化核酸の天然源に通常付随している少なくとも 1 つの夾雑核酸分子から分離された核酸分子である。好ましくは、単離された核酸は天然に付随する全ての構成成分から遊離されている。単離された NS4 コード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在する NS4 コード化核酸分子とは区別される。しかし、単離された NS4 ポリペプチドコード化核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にある NS4 を通常発現する細胞に含まれる NS4 コード化核酸分子を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 0 】

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、状況に応じてはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

## 【 0 0 7 1 】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列又は分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているならば、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーが使用される。

10

## 【 0 0 7 2 】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗NS4モノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む)、多エピトープ特異性を持つ抗NS4抗体組成物、一本鎖抗NS4抗体、及び抗NS4抗体の断片を包含している(下記参照)。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である集団から得られる抗体を称する。

20

## 【 0 0 7 3 】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングに必要な温度が高くなり、プローブが短くなるとそれに必要な温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補鎖がその融点より低い環境に存在する場合に、変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション配列の間で所望される相同性の程度が高くなればなるほど、用いることができる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をよりストリンジェントにすることになり、低い温度はストリンジェンシーを低下させることになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの更なる詳細及び説明については、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology(Wiley Interscience Publishers, 1995)を参照のこと。

30

## 【 0 0 7 4 】

ここで定義される「ストリンジェントな条件」又は「高度のストリンジェントな条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温度、例えば、50において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42において50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は(3)42における50%ホルムアミド、5xSSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42における0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中の洗浄及び55での50%

40

50

ホルムアミド、次いで55におけるEDTAを含む0.1×SSCからなる高度のストリンジェントな洗浄を用いるものによって同定される。

【0075】

「中程度のストリンジェントな条件」は、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989)に記載されているように同定され、上記のストリンジェンシーより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度及び%SDS)の使用を含む。中程度のストリンジェントな条件は、20%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハード液、10%デキストラン硫酸、及び20mg/mLの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37での終夜インキュベーション、次いで1×SSC中37-50でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識する。

10

【0076】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」と融合したNS4ポリペプチド又は抗-NS4抗体を含んでなるキメラポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有し、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8~約50のアミノ酸残基(好ましくは、約10~約20の残基)を有する。

20

【0077】

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である(即ち「異種の」)アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3又はIgG-4サブタイプ、IgA(IgA-1及びIgA-2を含む)、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ること

30

【0078】

ここでの目的に対する「活性な」及び「活性」とは、天然又は天然発生NS4の生物学的及び/又は免疫学的活性を保持するNS4の形態を意味し、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生NS4によって生ずる(阻害性又は刺激性の)生物学的機能であって、天然又は天然発生NS4が有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を除くものを意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然発生NS4が有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を意味する。好ましい生物学的活性には、体重減少、脂肪過多症(体重に占める脂肪率)の減少、体重に占める除脂肪体重割合の増加のうち1または複数を含む。生物学的活性の別の定義は、個体における、代謝(または代謝率)の増大、含脂肪細胞無いへのグルコース取り込みの減少、含脂肪細胞からのレプチン放出の増大、トリグリセリドの減少、遊離脂肪酸の減少を含む。NS4の活性には、NS4により直接的に誘導されるものと、間接的に誘導されるものとがあるが、いずれもNS4の存在によるもので、NS4が存在しない場合には同様の結果は得られない。

40

【0079】

「治療」とは、障害の進行を防ぐ、または障害の症状を変化させる目的で行われる介入である。したがって、「治療」とは、治療上の処置及び予防的療法又は防護的療法の双方を称し、その目的は、標的である病的症状又は疾患を防ぐか又は減退(減少)させることである。治療を必要とするものには、疾患にすでに罹っているもの、ならびに、疾患が予防されるべきものを含む。体重異常の治療において、治療薬は、障害の病理的構成要因の反

50

応の大きさを直接的に減少、または増大させることができる（例えば、総体重を減少させる、体重に占める脂肪の割合を低下させる、体重に占める除脂肪体重の割合を上昇させる）か、疾病を、他の治療薬または方法による治療の効果が出やすいものにする。治療の効果の別の測定基準には、含脂肪細胞へのグルコース取り込みの減少、含脂肪細胞からのレプチン放出の増大、血清トリグリセリドまたは脂肪酸レベルの低下、代謝率の上昇などが含まれる。

【0080】

「有効量」とは、体重異常のインビトロ細胞ベースモデルにおいて、検知可能な改善を引き起こす、誘導する、またはそのような改善に帰結する、NS4の少なくとも最小の濃度である。例えば、含脂肪細胞へのグルコース取り込みの減少、含脂肪細胞からのレプチン放出の増大等である。さらに、「治療的有効量」とは、体重異常に関連する病理的症状を少なくとも緩和するか、または改善させるのに有効な、哺乳類に投与されるNS4少なくとも最小の濃度（量）である。例えば、体重減少、体重に占める脂肪率の低下、体重に占める除脂肪体重割合の上昇、代謝率の上昇、血清トリグリセリドまたは脂肪酸の低下等である。

10

【0081】

「治療」とは、治療上の処置及び予防的療法又は防護的療法の双方を称し、その目的は、標的である病的症状又は疾患を防ぐか又は減退（減少）させることである。治療を必要とするものには、疾患に罹りやすいものと同時に疾患にすでに罹っているもの、又は疾患が予防されるべきものを含む。

20

【0082】

「慢性」投与とは、初期の治療効果（活性）を長期間にわたって維持するようにするために、急性態様とは異なり連続的な態様での薬剤の投与を意味する。「間欠」投与とは、中絶無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。

【0083】

治療のための「哺乳動物」とは、哺乳動物に分類される任意の動物を意味し、ヒト、家畜用及び農場用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギ、フェレットなどを含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0084】

「個体」とは、対象となるあらゆる患者であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。

30

【0085】

「体重異常」は、異常な体重（例えば、正常よりも大きいか、または小さい）を特徴とする障害である。例えば、肥満度指数（ボディマスインデックス、BMI）が19.9未満または25.9以上である場合が体重異常である。体重異常の例としては、肥満、悪液質、摂食障害、過食症、嚢胞性卵巣病、頭蓋咽頭腫、プラダー・ウィリー症候群、フレアリッヒ症候群、II型糖尿病、成長ホルモン欠乏患者、正常範囲内の低身長変異、ターナー症候群が挙げられる。

【0086】

「肥満」は、（体重（kg）をメートルで表した身長<sup>2</sup>で割ることで計算する、哺乳動物の肥満度指数（ボディマスインデックス、BMI）の少なくとも25.9の状態に相当する。通常は、平均的な体重の人間は、19.9から25.9未満のBMIである。ここでの肥満とは、遺伝的又は環境的な原因であろうと、すべての原因に起因しうる。結果として肥満となりうる、又は肥満の原因となりうる疾患の例としては、食べ過ぎ及び過食症、多嚢胞性卵巣症候群、頭蓋咽頭腫、プラダー・ウィリー症候群、フレアリッヒ症候群、II型糖尿病、成長ホルモン欠乏患者、正常範囲内の低身長、ターナー症候群、並びに、例えば急性リンパ性白血病の子供など、代謝活性が低下や全無脂肪量のパーセントとしての安静時エネルギー消費量の低下を示す他の生理学的症状を含む。

40

【0087】

50

「肥満に関連する症状」とは、皮膚疾患に限定されないが、例えば感染症、静脈瘤、黒色表皮腫、及び湿疹、運動不耐性、糖尿病、インシュリン抵抗性、過食症、高血圧、高コレステロール血症、高脂血症、胆石症、変形性関節症、整形外科的傷害、血栓疾患、癌、及び冠動脈（または循環器）心疾患、特に個体における高トリグリセリド及び遊離脂肪酸に関連した心疾患などの、肥満の結果の又は肥満によって悪化する症状に相当する。

【0088】

1つ又は複数のさらなる治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）投与及び任意の順序での連続投与を含む。

【0089】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然NS4ポリペプチドの生物活性を部分的に又は完全に阻止、阻害、又は中和するあらゆる分子を指す。同様に「アゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然NS4ポリペプチドの生物活性を模倣するあらゆる分子を指す。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然NS4ポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、有機小分子、などを含む。NS4ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法は、NS4ポリペプチドを候補アンタゴニスト又はアゴニスト分子と接触させ、NS4ポリペプチドに通常は関連している1つ又は複数の生物活性の検出可能な変化を測定することを含みうる。

【0090】

ここで用いられる「担体」は、薬学的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（登録商標）を含む。

【0091】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及びFv断片；ダイアボディ(diabodies)；直鎖状抗体（Zapataら、Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]）；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【0092】

抗体のパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')<sub>2</sub>断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を架橋結合することができる。

【0093】

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。この配置において各可変ドメインの3つのCDRが相互作用してVH-VL二量体の表面に抗原結合部位を決定する。正しくは、6つのCDRが抗体に対する抗原結合特異性を与える。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分）でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

【0094】

また、Fab断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)も含む。Fab断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキ

シ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab'断片と相違する。ここで、Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つFab'を表す。F(ab')<sub>2</sub>抗体断片は、最初はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

【0095】

任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、及び と呼ばれる二つの明らかに異なる型の一方に分類される。

【0096】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列によって、免疫グロブリンは異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンの五つの主要なクラス:IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、それらの幾つかは更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgA2に分類される。

【0097】

「一本鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のVH及びVLドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、sFvが抗原結合にとって望ましい構造の形成を可能にする、VH及びVLドメイン間のポリペプチドリンカーを更に含む。sFvの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

【0098】

用語「ダイアボディ(diabodies)」は、二つの抗原結合部位を持つ小型の抗体断片を指し、その断片は同じポリペプチド鎖(VH-VL)内で軽鎖可変ドメイン(VL)に結合した重鎖可変ドメイン(VH)を含む。同じ鎖の二つのドメイン間に対形成するには短すぎるリンカーを用いることにより、ドメインは強制的に他の鎖の相補的ドメインと対形成して二つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号;W093/11161;及びHollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

【0099】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離及び/又は回収されたものである。その自然環境の夾雑成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1)ローリー法で測定した場合95%を超える抗体、最も好ましくは99重量%を超えるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0100】

特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに「特異的に結合する」又は「特異的である」抗体は、他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープとは実質的に結合せずに、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープへ結合するものである。

【0101】

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、「標識」抗体が生成されるように、抗体に直接又は間接的に抱合している検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識は、それ自体検出可能でもよく(例えば、放射性標識又は蛍光標識)、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変換を触媒してもよい。

【0102】

10

20

30

40

50

「固相」とは、本発明の抗体がそれに付着することのできる非水性マトリクスを意味する。ここに意図する固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス（例えば、孔制御ガラス）、多糖類（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンから形成されたものを含む。ある実施態様では、内容に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを構成することができ；その他では精製カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィークラム）とすることもできる。また、この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

【0103】

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物（NS4ポリペプチド又はその抗体など）の輸送に有用である。リポソームの成分は、通常は生体膜の脂質配列に類似する二層形式に配列させる。

【0104】

「小分子」とは、ここで、約500ダルトン未満の分子量を持つと定義される。

【0105】

表1

表1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int  _day[26][26] = {
/*
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

10

20

30

40

## 表1(続き)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4      /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT        3      /* value of matching bases */
#define DMIS        0      /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0       8      /* penalty for a gap */
#define DINS1       1      /* penalty per base */
#define PINS0       8      /* penalty for a gap */
#define PINS1       4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int            score;     /* score at last jmp */
    long           offset;    /* offset of prev block */
    short          ijmp;      /* current jmp index */
    struct jmp     jp;        /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;        /* number of leading spaces */
    short          n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
    int            x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char             *ofile;      /* output file name */
char             *namex[2];   /* seq names: getseqs() */
char             *prog;       /* prog name for err msgs */
char             *seqx[2];    /* seqs: getseqs() */
int              dmax;        /* best diag: nw() */
int              dmax0;       /* final diag */
int              dna;         /* set if dna: main() */
int              endgaps;     /* set if penalizing end gaps */
int              gapx, gapy;   /* total gaps in seqs */
int              len0, len1;  /* seq lens */
int              ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int              smax;        /* max score: nw() */
int              *xbm;        /* bitmap for matching */
long             offset;      /* current offset in jmp file */
struct           diag        *dx; /* holds diagonals */
struct           path        pp[2]; /* holds path for seqs */

char             *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char             *getseq(), *g_calloc();

```

10

20

30

## 表1(続き)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
int ac;
char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw(); /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps(); /* get the actual jmps */
    print(); /* print stats, alignment */

    cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

```

10

main

20

30

## 表1(続き)

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    char          *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int           *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int           ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int           *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int           mis;               /* score for each type */
    int           ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register      id;                /* diagonal index */
    register      ij;                /* jmp index */
    register      *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register      xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

nw

10

20

30

## 表1(続き)

...IIW

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

  /* update penalty for del in x seq;
   * favor new del over ongong del
   * ignore MAXGAP if weighting endgaps
   */
  if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else {
      dely[yy] -= ins1;
      ndely[yy]++;
    }
  } else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else
      ndely[yy]++;
  }

  /* update penalty for del in y seq;
   * favor new del over ongong del
   */
  if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else {
      delx -= ins1;
      ndelx++;
    }
  } else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else
      ndelx++;
  }

  /* pick the maximum score; we're favoring
   * mis over any del and delx over dely
   */

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

...nw
id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
} else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

10

20

30

40

## 表1(続き)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */
#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print() print
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "< first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "< second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

## 表1(続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                                           /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;                                  /* leading trailing overlap */
{
    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char    outx[32];
    double  pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

10

20

30

## 表1(続き)

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? ":":"s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? ":":"s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n< score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINSO, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n< score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINSO, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static nm; /* matches in core -- for checking */
static lmax; /* lengths of stripped file names */
static ij[2]; /* jmp index for a path */
static nc[2]; /* number at start of current line */
static ni[2]; /* current elem number -- for gapping */
static siz[2];
static char *ps[2]; /* ptr to current element */
static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int nn; /* char count */
    int more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(name[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

10

20

pr\_align

30

40

## 表1(続き)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i] + +];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i] + +];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr\_align

10

20

30

dumpblock

40

## 表1(続き)

```

...dumpblock

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
{
    int    ix;        /* index in out[] holding seq line */
    char   nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
{
    int    ix;
    putline

```

10

20

30

40

## 表1(続き)

```

int          i;
register char *px;

for (px = name[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

...putline

stars

## 表1(続き)

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

stripname

## 表1(続き)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_alloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;

int      cleanup();                          /* cleanup tmp file */
long     lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                  cleanup
{
    int    i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                           getseq
{
    char    *file;    /* file name */
    int     *len;     /* seq len */

    char    line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int     natgc, tlen;
    FILE    *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

10

20

30

40

## 表1(続き)

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;         /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjumps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;
        }
    }
}

```

...getseq

g\_alloc

readjumps

10

20

30

40

## 表1(続き)

...readjumps

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)                                writejumps
{
    int ix;
    char *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

10

20

30

40

50

【 0 1 0 6 】

表 2

N S 4                                   XXXXXXXXXXXXXXXXX                   (長さ = 15アミノ酸)  
 比較タンパク質                        XXXXXXXXYYYYYYY                   (長さ = 12アミノ酸)

%アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2で決定される2つのポリペプチド配列の間の一致するアミノ酸残基の数) ÷ (N S 4  
 4ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

5 ÷ 15 = 33.3%

【 0 1 0 7 】

表 3

N S 4                                   XXXXXXXXXX                       (長さ = 10アミノ酸)  
 比較タンパク質                        XXXXXXXXYYYYZZY                   (長さ = 15アミノ酸)

%アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2で決定される2つのポリペプチド配列の間の一致するアミノ酸残基の数) ÷ (N S  
 4ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

5 ÷ 10 = 50%

【 0 1 0 8 】

表 4

N S 4 - D N A                        NNNNNNNNNNNNNN                   (長さ = 14ヌクレオチド)  
 比較 D N A                            NNNNNLLLLLLLLLLLL               (長さ = 16ヌクレオチド)

%核酸配列同一性 =

(ALIGN-2で決定される2つの核酸配列の間の一致するヌクレオチドの数) ÷ (N S 4 - D N  
 A核酸配列のヌクレオチドの総数) =

6 ÷ 14 = 42.9%

【 0 1 0 9 】

表 5

N S 4 - D N A                        NNNNNNNNNNNN                   (長さ = 12ヌクレオチド)  
 比較 D N A                            NNNNLLLVV                       (長さ = 9ヌクレオチド)

%核酸配列同一性 =

(ALIGN-2で決定される2つの核酸配列の間の一致するヌクレオチドの数) ÷ (N S 4 - D N  
 A核酸配列のヌクレオチドの総数) =

4 ÷ 12 = 33.3%

## 【0110】

## I I . 本発明の組成物と方法

## A . 完全長NS4ポリペプチド

本発明は、本出願でNS4（又はUNQ5830、UNQ5924、UNQ5830、とも）と呼ばれるポリペプチドをコードする新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に説明するように、NS4ポリペプチドをコードするcDNAが同定され単離された。別々の発現ラウンドで生成されたタンパク質には異なるPRO番号が与えられるが、UNQ番号は全ての与えられたDNA及びコード化タンパク質に独特であり、変わることはないことを記しておく。しかしながら、単純化のために、本明細書において、DNA 146649-1789R1、DNA 149986-2883又はDNA 149995-2871によってコードされるタンパク質並びに上記のNS4の定義に含まれるさらなる天然相同体及び変異体（時に、PRO19652、PRO19816およびPRO19650とも称される）は、それらの起源又は調製形式に関わらず、「NS4」と称する。

10

## 【0111】

下記の実施例に開示するように、ここでDNA 146649-1789R1、DNA 149986-2883又はDNA 149995-2871と称されるcDNAクローンがATCCに寄託されている。該クローンの正確なヌクレオチド配列は、当業者によって当該分野の常套的な方法を用いて寄託されたクローンを配列決定することにより容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技術を用いて決定できる。ここに記載したNS4ポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

20

## 【0112】

## B . NS4変異体

ここに記載した完全長天然配列NS4ポリペプチドに加えて、NS4変異体も調製できると考えられる。NS4変異体は、NS4 DNAに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、及び/又は所望のNS4ポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者は、グリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などのアミノ酸変化がNS4の翻訳後プロセスを変えうることを理解するであろう。

## 【0113】

天然完全長配列NS4又はここに記載したNS4の種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列NS4と比較してNS4のアミノ酸配列が変化するNS4をコードする1つ又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも1つのアミノ酸のNS4の1つ又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、NS4の配列を相同な既知のタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、1つのアミノ酸の類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、全長又は成熟天然配列によって示される活性に関し、得られた変異体を試験することにより決定される。

30

40

## 【0114】

NS4ポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば、完全長天然タンパク質と比較した際に、N-末端又はC-末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。ある種の断片は、NS4ポリペプチドの所望の生物活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

## 【0115】

NS4断片は、多くの従来技術の任意のものによって調製してよい。所望のペプチド断片

50

は化学合成してもよい。代替的方法是、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、あるいは適当な制限酵素でDNAを消化して所望の断片を単離することによるNS4断片の生成を含む。さらに他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、所望のポリペプチド断片をコードするDNA断片を単離し増幅することを含む。DNA断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、NS4ポリペプチド断片は、図4(a)、図4(b)又は図4(c)(それぞれ配列番号:4-6)に示した天然NS4ポリペプチドと少なくとも1つの生物学的及び/又は免疫学的活性を共有する。

【0116】

特別の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換との見だしにて表6に示す。このような置換が生物活性の変化をもたらす場合、表6に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より置換的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

【0117】

表6

元の残基	例示的置換	好ましい置換	
Ala(A)	val; Leu; ile	val	
Arg(R)	lys; gln; asn	lys	
Asn(N)	gln; his; lys; arg	gln	
Asp(D)	glu	glu	
Cys(C)	ser	ser	
Gln(Q)	asn	asn	10
Gln(E)	asp	asp	
Gly(G)	pro; ala	ala	
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg	
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu	
Leu(L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile	20
Lys(K)	arg; gln; asn	arg	
Met(M)	leu; phe; ile	leu	
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu	
Pro(P)	ala	ala	
Ser(S)	thr	thr	
Thr(T)	ser	ser	
Trp(W)	tyr; phe	tyr	30
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe	
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu	

## 【 0 1 1 8 】

NS4ポリペプチドの機能及び免疫学的同一性の置換的修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の嵩の維持に対する効果が有意に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

40

- (1) 疎水性：ノルロイシン, met, ala, val, leu, ile;
- (2) 中性の親水性：cys, ser, thr;
- (3) 酸性：asp, glu;
- (4) 塩基性：asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 鎖配向に影響する残基：gly, pro; 及び
- (6) 芳香族：trp, tyr, phe。

## 【 0 1 1 9 】

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、より好ましくは残された(非保存)部位に導入されうる。

50

## 【0120】

変異は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発などの当該技術分野において公知の方法を用いて実施することができる。部位特異的突然変異誘発 [Carterら, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zollerら, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wellsら, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発 [Wellsら, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)]又は他の既知の技術をクローニングしたDNAに実施してNS4変異体DNAを作成することもできる。

## 【0121】

また、隣接配列に沿って1つ又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1(1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

## 【0122】

C・NS4の修飾

NS4の共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の1つの型は、NS4ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、NS4の選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることである。二官能性試薬での誘導体化が、例えばNS4を水不溶性支持体マトリクスあるいは抗NS4抗体の精製方法又はその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1, 1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、3, 3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬を含む。

## 【0123】

他の修飾は、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の -アミノ基のメチル化 [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

## 【0124】

本発明の範囲内に含まれるNS4ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、ここで意図されるのは、天然配列NS4に見られる1又は複数の炭水化物部分の欠失（存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び/又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる）、及び/又は天然配列NS4に存在しない1又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この文節は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含む。

## 【0125】

NS4ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、1又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列NS4（O-結合グリコシル化部位）への付加、又は置換によってなされてもよい。NS4アミノ酸配列

10

20

30

40

50

は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、NS4ポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生産させることを通して変更されてもよい。

【0126】

NS4ポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に発行されたW087/05330、及びAplin及びWriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【0127】

NS4ポリペプチド上に存在する糖鎖部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddinら, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987)により、及びEdgeら, *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraら, *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

【0128】

NS4の共有結合的修飾の他の型は、NS4ポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

【0129】

また、本発明のNS4は、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したNS4を含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

【0130】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとNS4との融合を含む。エピトープタグは、一般的にはNS4のアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなNS4のエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってNS4を容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(ポリ-his)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Fieldら, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evanら, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616(1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体 [Paborskyら, *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、Flagペプチド [Hoppら, *BioTechnology*, 6:1204-1210(1988)]；KT3エピトープペプチド [Martinら, *Science*, 255:192-194 (1992)]；-チューブリンエピトープペプチド [Skinnerら, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuthら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397(1990)]を含む。

【0131】

それに換わる実施態様では、キメラ分子はNS4の免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘシン」とも呼ばれる)については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。免疫グロブリン融合体は、好ましくは免疫グロブリン分子内の少なくとも1つの可変領域に換えてNS4ポリペプチドの可溶化(膜貫通ドメイン欠失又は不活性化)形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG1分子のヒンジ、CH2及びCH3、又はヒンジ、CH1、CH2及びCH3領域を含む。免疫グロブリン融合体の生成については、1995年6月27日発

行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

【0132】

D.NS4の調製

以下の説明は、主として、NS4核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりNS4を生成する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いてNS4を調製することができると考えられる。例えば、NS4配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生成してもよい [例えば、Stewartら、Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., サンフランシスコ、カリフォルニア(1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照]。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機(フォスター シティ、カリフォルニア)を用いて、製造者の指示により実施してもよい。NS4の種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的な方法を用いて結合させて完全長NS4を生成してもよい。

10

【0133】

1.NS4をコードするDNAの単離

NS4をコードするDNAは、NS4 mRNAを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリーから得ることができる。従って、ヒトNS4 DNAは、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製されたcDNAライブラリーから簡便に得ることができる。またNS4-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリーから又は公知の合成方法(例えば、自動化核酸合成)により得ることもできる。

20

【0134】

ライブラリーは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ(NS4に対する抗体又は少なくとも約20-80塩基のオリゴヌクレオチド等)によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるcDNA又はゲノムライブラリーのスクリーニングは、例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。NS4をコードする遺伝子を単離する他の方法はPCR法を使用するものである [Sambrookら、上掲; Dieffenbachら、PCR Primer: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

30

【0135】

下記の実施例には、cDNAライブラリーのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さで、疑陽性が最小化されるよう十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリー内のDNAとのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、<sup>32</sup>P標識されたATPのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の厳密性及び高度の厳密性を含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrookらに示されている。

40

【0136】

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、GenBankらの公共データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の限定された領域内又は全長に渡っての(アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの)配列同一性は、当該分野で知られた、及びここに記載した方法を用いて決定することができる。

【0137】

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、cDNAに逆転写されていないmRNAの生成中間体及び先駆物質を検出する上掲のSambrookらに記載されているような従来のプライマー伸展法を使用して

50

選択されたcDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。

【0138】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したNS4生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された従来の栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991)及び Sambrookら, 上掲に見出すことができる。

10

【0139】

真核生物細胞形質移入及び原核生物細胞形質移入の方法、例えば、CaCl<sub>2</sub>、CaPO<sub>4</sub>、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者にとって公知のものである。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrookらに記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shawら, Gene, 23:315(1983)及び1989年6月29日公開のW089/05859に記載されているように、ある種の植物細胞の形質転換に用いられる。そのような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingenら, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiaoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞との細菌プロトプラスト融合、又はポリブレン、ポリオルニチンなどのポリカチオンなどを使用してもよい。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keownら, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及び Mansourら, Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

20

【0140】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公的に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294(ATCC31,446);大腸菌X1776(ATCC31,537);大腸菌株W3110(ATCC27,325)及びK5772(ATCC53,635)である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、E. coli、エンテロバクター、エルビニア(Erwinia)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチア・マルセサンス(Serratia marcescans)、及び赤痢菌などの腸内細菌科、並びに桿菌、例えばバチルス・サブチリス(B. subtilis)及びバチルス・リチェニフォルミス(B. licheniformis)(例えば、1989年4月12日発行のDD266,710に記載されたバチルス・リチェニフォルミス41P)、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスを含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生産物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110は、細胞に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型tonAを有する大腸菌W3110株1A2;完全な遺伝子型tonA ptr3を有する大腸菌W3110株9E4;完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT kan<sup>r</sup>を有する大腸菌W3110株27C7(ATCC 55,244);完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>を有する大腸菌W3110株37D6;非カナマイシン耐性degP欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3

30

40

50

110株40B4;及び1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

#### 【0141】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、NS4コード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシヤは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ポンベ(Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日発行の欧州特許第139,383号);クルベロミセス宿主(Kluyveromyces hosts)(米国特許第4,943,529号; Fleerら, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばクルベロミセスラクチス(K. lactis)(MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourtら, J. Bacteriol.154(2): 737-742 [1983])、クルベロミセス・フラギリス(K. fragilis)(ATCC 12,424)、クルベロミセス・ブルガリクス(K. bulgaricus)(ATCC 16,045)、クルベロミセス・ウイケラミイ(K. wickeramii)(ATCC 24,178)、クルベロミセス・ワルチイ(K. waltii)(ATCC 56,500)、クルベロミセス・ドロソフィラルム(K. drosophilum)(ATCC 36,906; Van den Bergら, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、クルベロミセス・サーモトレランス(K. thermotolerans)及びクルベロミセス・マルキシアナス(K. marxianus);ヤロウイア(yarrowia)(欧州特許第402,226号);ピチア・パストリス(Pichia pastoris)(欧州特許第183,070号; Sreekrishnaら, J. Basic Microbiol, 28: 265-278 [1988]);カンジダ;トリコデルマ・レーシア(Trichoderma reesia)(欧州特許第244,234号);アカパンカビ(Caseら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]);シュワニオマイセス(Schwanniomyces)、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス(Schwanniomyces occidentalis)(1990年10月31日発行の欧州特許第394,538号);及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(Tolypocladium)(1991年1月10日発行の国際公開91/00357);及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルスニダランス(Ballanceら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburnら, Gene, 26: 205-221 [1983]; Yeltonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984])及びアスペルギルスニガー(Kelly及びHynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985])が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(Methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(Hansenula)、カンジダ、クロエケラ(Kloeckera)、ピチア(Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス(Torulopsis)、及びロドトルラ(Rhodotorula)からなる属から選択されたメタノールで増殖可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)に記載されている。

#### 【0142】

グリコシル化NS4の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドプテラSf9等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)及びCOS細胞を含む。より詳細な例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651);ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Grahamら, J. Gen Virol., 36:59 (1977));チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHFR(CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980))ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75);ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065);及びマウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術内にある。

#### 【0143】

### 3. 複製可能なベクターの選択及び使用

NS4をコードする核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部

位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、1つ又は複数のシグナル配列、複製開始点、1つ又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の1つ又は複数を含む適当なベクターの構築には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

#### 【0144】

NS4は直接的に組換え手法によって生成されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても生成される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるNS4-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択された原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(サッカロミセス(*Saccharomyces*)及びクイベロマイシス(*Kluyveromyces*) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(*C.albicans*)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行の欧州特許第362179号)、又は1990年11月15日に公開されたW090/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

10

#### 【0145】

発現及びクローニングベクターは共に1つ又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 $\mu$ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

20

#### 【0146】

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばバシリのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子のような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

30

#### 【0147】

哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのようにNS4-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaubらにより Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたDHFR活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である[Stinchcombら, Nature, 282:39(1979);Kingsmanら, Gene, 7:141(1979);Tschemperら, Gene, 10:157(1980)]。trp1遺伝子は、例えば、ATCC番号4407 6あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で増殖する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

40

#### 【0148】

発現及びクローニングベクターは、通常、NS4-コード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識される好適なプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは -ラクターゼ及びラクトースプロモーター系[Changら, Nature, 275:615 (1978); Goeddelら, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系[Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776]、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター[deBoerら, Proc. Natl. Acad. Sci. US

50

A, 80:21-25 (1983)] を含む。細菌系で使用するプロモーターもまた NS 4 をコードする DNA と作用可能に結合したシャイン-ダルガーノ (S.D.) 配列を有する。

【0149】

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman ら, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hess ら, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセラートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

10

【0150】

他の酵母プロモーターとしては、増殖条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチトクロム C、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第 73,657号に更に記載されている。

【0151】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの NS 4 転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス (1989年7月5日公開の UK2,211,504)、アデノウイルス (例えばアデノウイルス 2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス 40 (SV40) のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

20

【0152】

より高等の真核生物による NS 4 をコードする DNA の転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約 10 から 300 塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強する DNA のシス作用要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている (グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側の SV40 エンハンサー (100-270 塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、NS 4 コード化配列の 5' 又は 3' 位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから 5' 位に位置している。

30

【0153】

また真核生物宿主細胞 (酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞) に用いられる発現ベクターは、転写の終結及び mRNA の安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウイルスの DNA 又は cDNA の通常は 5'、時には 3' の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、NS 4 をコードする mRNA の非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

40

【0154】

組換え脊椎動物細胞培養での NS 4 の合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething ら, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei ら, Nature, 281:40-46 (1979); 欧州特許第 117,060号; 及び欧州特許第 117,058号に記載されている。

【0155】

4. 遺伝子増幅 / 発現の検出

遺伝子の増幅及び / 又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、mRNA の転写を定量化するノーザ

50

ンプロット法 [ Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980) ]、ドットプロット法 (DNA 分析)、又はインサイツハイブリダイゼーション法によって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。次いで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

#### 【0156】

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び/又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列NS4ポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はNS4 DNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

10

#### 【0157】

##### 5. ポリペプチドの精製

NS4の形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン(登録商標)-X100)又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。NS4の発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

20

#### 【0158】

NS4を、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような夾雑物を除くプロテインAセファロースカラム；及びNS4のエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182(1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選択される精製過程は、例えば、用いられる生成方法及び特に生成される特定のNS4の性質に依存する。

30

#### 【0159】

##### E. NS4の用途

NS4をコードするヌクレオチド配列(又はそれらの補体鎖)は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピングにおいて、及びアンチセンスRNA及びDNAの生成において種々の用途を有している。また、NS4核酸も、ここに記載される組換え技術によるNS4ポリペプチドの調製に有用である。

40

#### 【0160】

完全長天然配列NS4 DNA(配列番号：1)又はその一部は、完全長NS4 cDNAの単離又は図1(配列番号：1)、図2(配列番号：2)又は図3(配列番号：3)に開示した天然NS4配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他のcDNA(例えば、NS4の自然発生変異体又は他の種からのNS4をコードするもの)の単離のためのcDNAライブラリー用のハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約20~約50塩基である。ハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的には、配列番号：1-3のヌクレオチド配列の新規な領域から誘導してもよく、それらの領域は、過度の実験をすることなく、天然配列NS4のプロモーター、エンハンサー成分及びイントロンを含むゲノム配列から決定され得る。例えば、スクリーニング法

50

は、NS4 遺伝子のコード化領域を周知のDNA配列を用いて単離して約40塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、<sup>32</sup>P又は<sup>35</sup>S等の放射性ヌクレオチド、又はアビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識されうる。本発明のNS4 遺伝子に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒトcDNA、ゲノムDNA又はmRNAのライブラリーをスクリーニングし、そのライブラリーの何れのメンバーがプローブにハイブリッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリダイゼーション技術は、以下の実施例において更に詳細に記載する。

**【0161】**

本出願で開示する任意のEST配列は、プローブと同様に、ここに記載した方法で用いることができる。

10

**【0162】**

NS4 核酸の他の有用な断片は、標的NS4 mRNA (センス) 又はNS4 DNA (アンチセンス) 配列に結合できる一本鎖核酸配列 (RNA 又はDNA のいずれか) を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを含む。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、本発明によると、NS4 DNA のコード化領域の断片を含む。このような断片は、一般的には少なくとも約14ヌクレオチド、好ましくは約14から30ヌクレオチドを含む。与えられたタンパク質をコードするcDNA配列に基づく、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを制御する能力は、例えば、Stein及びCohen (Cancer Res. 48: 2659: 1988) 及び van der Krolら, (BioTechniques 6: 958, 1988) に記載されている。

20

**【0163】**

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらし、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の中途での停止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、NS4 タンパク質の発現を阻止するのに用いられる。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖 - ホスホジエステル骨格 (又は他の糖結合、W091/06629に記載のもの等) を有するオリゴヌクレオチドをさらに含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インビボで安定であるが (即ち、酵素分解に耐えうるが)、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

30

**【0164】**

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、W090/10048に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ-(L-リジン)に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等のインターカレート剤、アルキル化剤又は金属錯体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的ヌクレオチド配列への結合特異性を改変してもよい。

**【0165】**

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO<sub>4</sub>-媒介DNA形質移入、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン-バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM-MuLVから誘導されるもの、N2 (M-MuLVから誘導されたレトロウイルス)、又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと命名されたダブルコピーベクター (W090/13641参照) を含む。

40

**【0166】**

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、W091/04753に記載されているように、リガンド結合分子との結合体の形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入し

50

てもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表面レセプター、増殖因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の結合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

【0167】

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、W090/10448に記載されたように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド-脂質複合体は、好ましくは内因性リパーゼにより細胞内で分解される。

10

【0168】

また、プローブは、PCR技術に用いて、密接に関連したNS4コード化配列の同定のための配列のプールを作成することができる。

【0169】

また、NS4をコードするヌクレオチド配列は、NS4をコードする遺伝子のマッピングのため、及び遺伝子障害を持つ個体の遺伝子分析のためのハイブリダイゼーションプローブの構築にも用いることができる。ここに提供されるヌクレオチド配列は、インサイツハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する結合分析、及びライブラリーでのハイブリダイゼーションスクリーニング等の周知の技術を用いて、染色体及び染色体の特定領域にマッピングすることができる。

20

【0170】

NS4のコード化配列が他のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合（例えば、NS4がレセプター又は共リガンドである場合）、NS4は、結合相互作用に参与している他のタンパク質又は分子を同定するためのアッセイに用いることができる。このような方法により、レセプター/リガンド結合性相互作用の阻害剤を同定することができる。このような結合性相互作用に含まれるタンパク質も、ペプチド又は小分子阻害剤又は結合性相互作用のアゴニストのスクリーニングに用いることができる。また、レセプターNS4は関連するリガンドの単離にも使用できる。スクリーニングアッセイは、天然NS4又はNS4のレセプターの生物活性に似たリード化合物の発見のために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリーのハイスループットスクリーニングにも使用可能なアッセイを含み、小分子候補薬剤の同定に特に適したものとする。考慮される小分子は、合成有機又は無機化合物を含む。アッセイは、この分野で良く知られ特徴付けられているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。

30

【0171】

また、NS4又はその修飾型をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物のいずれかを産生することに使用でき、また、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物（例えばマウス又はラット）とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施形態では、NS4をコードするcDNAは、NS4をコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、NS4をコードするゲノムDNAをクローン化するために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等の特定の動物を産生する方法は、当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4,736,866号や第4,870,009号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのNS4導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたNS4コード化導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物はNS4をコードするDNAの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる

40

50

試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療上の処置の可能性が示される。

#### 【0172】

あるいは、NS4の非ヒト相同体は、動物の胚幹細胞に導入されたNS4をコードする変更ゲノムDNAと、NS4をコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、欠損した又は変更されたNS4コード化遺伝子を有するNS4「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、NS4をコードするcDNAは、確立された技術に従い、NS4をコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。NS4をコードするゲノムDNAの一部は、組込みをモニターするために使用可能な選択マーカーをコード遺伝子のような他の遺伝子によって欠失させたり、置換させることが可能である。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数キロベース含む[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと]。ベクターは胚幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞が選択された[例えば、Liら, Cell, 69:915(1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照のこと]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間において「ノックアウト」動物を作り出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、NS4ポリペプチドの欠乏によるある種の病理学的状態及びその病理学的状態の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

10

20

#### 【0173】

また、NS4ポリペプチドをコードする核酸は遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的有効量の遺伝子産物のインビボ合成を達成するために遺伝子が導入される。「遺伝子治療」とは、1回の処理により継続的効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なDNA又はmRNAの1回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスRNA及びDNAは、ある種の遺伝子のインビボ発現を阻止する治療薬として用いることができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは既に示されている(Zamecnikら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4143-4146 [1986])。オリゴヌクレオチドは、それらの負に荷電したリン酸ジエステル基を非荷電基で置換することによって取り込みを促進するように修飾してもよい。

30

#### 【0174】

生存可能な細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボで移入されるかに応じて変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した方法は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス(典型的にはレトロウイルス)ベクターでの形質移入及びウイルス被覆タンパク質-リポソーム媒介形質移入である(Dzauら, Trends in Biotechnology 11, 205-210(1993))。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤とともに提供するのが望ましい。リポソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴う細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいて内部移行を受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び/又は取り込みの促進のた

40

50

めに用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシスは、例えば、Wuら, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 及びWagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)によって記述されている。遺伝子作成及び遺伝子治療のプロトコールの概説については、Andersonら, Science 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

【0175】

ここに記載したNS4ポリペプチドをタンパク質電気泳動目的の分子量マーカーとして用いてもよい。

【0176】

ここに記載したNS4ポリペプチド又はその断片をコードする核酸分子は、染色体の同定に有用である。この点において、実際の配列データに基づく染色体マーキング試薬は殆ど利用可能ではないため、新規な染色体マーカーの同定が必要である。本発明の各NS4核酸分子は染色体マーカーとして使用できる。

10

【0177】

また、本発明のNS4ポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングに使用でき、本発明のNS4ポリペプチドは、一方の組織において他方に比較して異なる発現をする。NS4核酸分子には、PCR、ノーザン分析、サザン分析及びウェスタン分析のプローブ生成のための用途が見出されるであろう。

【0178】

ここに記載したNS4ポリペプチドは治療薬として用いてもよい。本発明のNS4ポリペプチドは、薬学的に有用な組成物を調製するのに知られた方法に従って製剤され、これにより、このNS4生成物は薬学的に許容される担体媒体と混合される。治療用製剤は、凍結乾燥された製剤又は水性溶液の形態で、任意的な製薬上許容可能な担体、賦形剤又は安定剤と、所望の精製度を有する活性成分とを混合することにより(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed., [1980])、調製され保管される。許容される担体、賦形剤又は安定剤は、用いる投与量及び濃度ではレシピエントに対して無毒性であり、リン酸、クエン酸及び他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量(残基数10個未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性重合体；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストリン等の単糖類、二糖類又は他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及びノ又はTWEEN(登録商標)、PLURONICS(登録商標)又はPEG等の非イオン性界面活性剤を含む。

20

30

【0179】

インピボ投与に使用される製剤は滅菌されていなくてはならない。これは、凍結乾燥及び再構成の前又は後に、滅菌フィルター膜を通す濾過により容易に達成される。

【0180】

ここで、本発明の製薬組成物は一般に、無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、皮下注射針で貫通可能なストッパーを持つ静脈内バッグ又はバイアル内に配される。

【0181】

投与経路は周知の方法、例えば、静脈内、腹膜内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内又は病巣内経路での局所投与などの注射又は注入、又は徐放系による。

40

【0182】

本発明の製薬組成物の用量及び望ましい薬物濃度は、意図する特定の用途に応じて変化する。適切な用量又は投与経路の決定は、通常の内科医の技量の範囲内である。動物実験は、ヒト治療のための有効量の決定についての信頼できる指針を提供する。有効量の種間スケーリングは、Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobiら, 編, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96のMordenti, J. 及びChappell, W. 「The use of interspecies scaling in toxicokinetics」に記載された原理に従って実施できる。

【0183】

NS4ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストのインピボ投与が用いられる

50

場合、正常な投与量は、投与経路に応じて、哺乳動物の体重当たり1日に約10 ng/kgから100 mg/kgまで、好ましくは約1 µg/kg/日から10 mg/kg/日である。特定の用量及び輸送方法の指針は文献に与えられている；例えば、米国特許第4,657,760号、第5,206,344号、又は第5,225,212号参照。異なる製剤が異なる治療用化合物及び異なる疾患に有効であること、例えば一つの器官又は組織を標的とする投与には、他の器官又は組織とは異なる方式で輸送することが必要であることが予想される。

**【0184】**

NS4ポリペプチドの投与を必要とする任意の疾患又は疾病の治療に適した放出特性を持つ製剤でNS4ポリペプチドの持続放出が望まれる場合、NS4ポリペプチドのマイクロカプセル化が考えられる。持続放出のための組換えタンパク質のマイクロカプセル化は、ヒト成長ホルモン(rhGH)、インターフェロン-(rhIFN-)、インターロイキン-2、及びMN rgp120で成功裏に実施されている。Johnsonら, Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223 (1993); Horaら, Bio/Technology, 8: 755-758 (1990); Cleland, 「Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Poly(lactide Polyglycolide Microsphere Systems」 Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell 及び Newman編, (Plenum Press: New York, 1995), p.439-462; WO 97/03692, WO96/40072, WO96/07399; 及び米国特許第5,654,010号。

10

**【0185】**

これらのタンパク質の持続放出製剤は、ポリ-乳酸-グリコール酸(PLGA)コポリマーを用い、その生体適合性及び広範囲の生分解特性に基づいて開発された。PLGAの分解生成物である乳酸及びグリコール酸は、ヒト体内で即座にクリアされる。さらに、このポリマーの分解性は、分子量及び組成に依存して数ヶ月から数年まで調節できる。Lewis, 「Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer」: M. Chasin及び R. Langer (編), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41。

20

**【0186】**

ここに開示されるNS4を含む治療薬および組成物は、多くの用途に使用可能である。そのような用途には、肥満または肥満に関連する状態の治療を含む。一態様では、その必要がある患者に対し、そのような状態を治療するのに有効な量のNS4を投与する。好ましくは、そのような状態とは、代謝の上昇、体重の減少、体脂肪の減少、トリグリセリドの減少、遊離脂肪酸の減少、含脂肪細胞からのグルコース放出の増大、インシュリン感受性の上昇および/または含脂肪細胞からのレプチン放出の増大のうち少なくとも一つを必要とする治療が必要な状態である。これらの各パラメータは、標準的な方法によって、例えば酸素消費を測定して代謝率を測ることによって、重量測定の計器を用いて、並びに大きさを計って脂肪を測定することによって、測定することができる。さらに、トリグリセリド、遊離脂肪酸、グルコース及びレプチンの存在及び量は標準的な方法によって決定することができる。これらの各パラメータは、具体的な実施例で下記に例示する。

30

**【0187】**

NS4およびNS4を含む組成物は、好ましくはインビボで使用される。しかしながら、先述したようにインビトロでも投与は可能で、その例としてNS4のモジュレーターのスクリーニング方法を後述する。とはいえ、NS4のモジュレーターは、動物モデルおよび患者由来の試料を使用して同定することもできることに注意されたい。

40

**【0188】**

本発明は、NS4ポリペプチドに類似する又は増強するもの(アゴニスト)、又はNS4ポリペプチドの効果を阻害または抑制するもの(アンタゴニスト)を同定するための化合物のスクリーニング方法も包含する。アゴニストおよびあんたごにすとはここでモジュレーターと称される。アンタゴニスト候補薬のスクリーニングアッセイは、ここに同定した遺伝子にコードされるNS4ポリペプチドと結合又は複合体形成する化合物、又は他にコード化ポリペプチドの他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、それを特に小分子候補薬の同定

50

に適したものにす、化学的ライブラリーのハイスループットスクリーニングに適用可能なアッセイを含む。

【0189】

該アッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、及び細胞ベースのアッセイで、この分野で知られたものを含む種々の方式で実施される。

【0190】

アンタゴニストについての全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定された核酸にコードされるNS4ポリペプチドと、これら2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させることを必要とすることにおいて共通する。

10

【0191】

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるNS4ポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をNS4ポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化されるNS4ポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、それを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

20

【0192】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子にコードされる特定のNS4ポリペプチドに結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られている方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィーカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)] に開示されているように、Fields及び共同研究者ら [Fields及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chienら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)] に記載された酵母ベースの遺伝子系を用いることによってモニターすることができる。酵母GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュールドメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。前出の文献に記載された酵母発現系(一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる)は、この特性の長所を利用し、並びに2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、-ガラクトシダーゼに対する色素生産性基質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKER(商品名))は、Clontechから商業的に入手可能である。また、この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこれら相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定へ拡大適用することができる。

30

40

【0193】

ここで同定されたNS4ポリペプチドをコードする遺伝子と細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる:通常、反応混合物は、遺伝子産物と

50

細胞外又は細胞内成分を、これら2つの生成物の相互作用及び結合が可能な条件下及び時間に渡って含むように調製される。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第3の反応混合物に添加してポジティブコントロールを提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合(複合体形成)は上記のようにモニターされる。試験化合物を含有する反応混合物ではなく、コントロール反応における複合体の形成は、試験化合物が、遺伝子産物とその結合パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

**【0194】**

アンタゴニストをアッセイするためには、特定の活性についてスクリーニングされる化合物とともにNS4ポリペプチドを細胞へ添加してもよく、NS4ポリペプチド存在下における対象活性を阻害する化合物の能力は、化合物がNS4ポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、NS4ポリペプチドと膜結合NS4ポリペプチドレセプター又は組換えレセプターを有する潜在的アンタゴニストを競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることによって、アンタゴニストを検出してもよい。放射活性などでNS4ポリペプチドを標識することが可能であり、潜在的アンタゴニストの有効性を判断するためにレセプターに結合したNS4ポリペプチド分子の数を利用することができる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びFACSソートによって同定できる。Coliganら, Current Protocols in Immun., 1(2): 第5章(1991)。好ましくは、発現クローニングが用いられ、ポリアデニル化RNAがNS4ポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このRNAから生成されたcDNAライブラリーがプールに分配され、COS細胞又はNS4ポリペプチドに対して反応性ではない他の細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで増殖させた形質移入細胞を、標識したNS4ポリペプチドと接触させる。このNS4ポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の封入を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフィ分析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再形質移入し、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

10

20

**【0195】**

レセプター同定の代替的方法として、標識NS4ポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料をPAGEで分離し、X線フィルムへ暴露する。レセプターを含む標識複合体を切り出し、ペプチド断片へ分解し、タンパク質マイクロ配列決定を施すことができる。マイクロ配列決定から得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定するcDNAライブラリーをスクリーニングする縮重オリゴヌクレオチドプローブの一组の設計に用いられる。

30

**【0196】**

アンタゴニストの他のアッセイでは、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識NS4ポリペプチドとともにインキュベートする。次いで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

**【0197】**

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとNS4ポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限定しないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、従ってNS4ポリペプチドの作用を競合的に阻害するNS4ポリペプチドの変異形態であってもよい。

40

**【0198】**

競合的結合アッセイを行う本発明の一実施形態では、NS4レセプターまたはNS4に対する抗体を競合相手として使用することができる。

**【0199】**

50

他の潜在的なNS4ポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNA又はDNA構築物であり、例えば、アンチセンスRNA又はDNA分子は、標的mRNAにハイブリッド形成してタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟NS4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード化部分は、約10から40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され(トリプルヘリックス - Leeら, Nucl. Acid Res., 6: 3073 (1979); Cooneyら, Science, 241: 456 (1988); Dervanら, Science, 251: 1360 (1991)参照)、それによりNS4ポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインビボでmRNAにハイブリッド形成してmRNA分子のNS4ポリペプチドへの翻訳を阻止する(アンチセンス - Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988))。上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンスRNA又はDNAをインビボで発現させて、NS4ポリペプチドの生成を阻害することもできる。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

10

20

30

40

50

#### 【0200】

潜在的アンタゴニストは、NS4ポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりNS4ポリペプチドの正常な生物活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチジル有機又は無機化合物を含む。

#### 【0201】

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリッド形成、次いで内ヌクレオチド結合分解性切断により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、上掲のRossi, Current Biology 4:469-471 (1994)及びPCT公報番号、W097/33551(1997年9月18日公開)を参照。

#### 【0202】

転写阻害に用いられるトリプルヘリックス形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介するトリプルヘリックス形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンの相当量の伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、PCT公報番号、W097/33551、上掲を参照。

#### 【0203】

これらの小分子は、上記で検討したスクリーニングアッセイの1つ又は複数の任意のものにより及び/又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

#### 【0204】

ここで提供されているすべてのアッセイは、幅広い種々の候補生物活性剤をスクリーニングすることに用いることができる。ここで用いられている「候補生物活性剤」、「候補薬剤」又は「候補薬」、又はここで用いられている文法的に同等の用語は、例えば、タンパク質、オリゴペプチド、小有機分子、多糖類、ポリヌクレオチド、プリン類似体などの細胞活性表現型、又は核酸配列及びタンパク質配列の双方を含むNS4配列の発現の何れかを直接的又は間接的に変化させることができる生物活性剤のために試験されるすべての分子を表す。

#### 【0205】

候補薬剤は、主として有機分子であるが、多くの化学物質を包含し、好ましくは100を越え、約2,500ダルトン(d)より小さい分子量を有する小有機化合物である。小分子は、ここで更に、50dと2000dの間の分子量を有すると定義される。その他の実施態様では、小分子は1500より小さい、又は1200より小さい、又は1000より小さい、又は750より小さい、又は500dより小さい分子量を有する。一実施態様では、ここで用いられる小分子は、約100から200dの分子量を有する。候補薬剤は、タンパク質との構造的な相互作用に必要な官能基を含み、特に水素結合、そして主には、少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシ又はカルボキシ基、好ましくは少なくとも2つの官能基を含む。候補薬剤は、1つ又は複数の上記の官能基で置換された環状炭素又はヘテロ環状構造及び/又は芳香族又は多芳香族構造を頻繁に含む。また、候補薬剤は、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体又はその組み合わせの中に見出される。特に好まれるのはペプチドである。

10

**【0206】**

候補薬剤は、合成又は天然化合物のライブラリを含む幅広い種々のソースから得られる。例えば、ランダム化オリゴヌクレオチドの発現を含む、幅広い種々の化合物及び生物分子のランダム及び直接合成のための多くの手段を利用することができる。あるいは、細菌、糸状菌、植物及び動物抽出物のライブラリを利用することができるか、又は容易に作製することができる。更には、通常の化学的、物理的及び生化学的手段によって、天然又は合成的に作製されたライブラリ及び化合物を容易に修飾できる。構造類似体を作製するために、既知の薬理的な薬剤にアシル化、アルキル化、エステル化、アミド化などの直接又はランダム化学修飾を施してもよい。

20

**【0207】**

好ましい実施態様では、候補生物活性薬剤はタンパク質である。ここで「タンパク質」によってとは、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド及びペプチドを含む、少なくとも2つの共有結合的に結合しているアミノ酸を意味する。このタンパク質は、天然発生アミノ酸及びペプチド結合、又は合成ペプチド模倣構造で構成されうる。従って、ここで用いられる「アミノ酸」、又は「ペプチド残基」とは、天然発生及び合成アミノ酸の双方を意味する。例えば、ホモフェニルアラニン、シトルリン及びノルロイシンは、本発明の目的のアミノ酸であると考えられている。また、「アミノ酸」は、プロリン及びヒドロキシプロリンのようなイミノ酸残基を含む。その側鎖は、(R)又は(S)配置の何れかである。好ましい実施態様では、このアミノ酸は(S)又はL-配置である。非天然発生側鎖が用いられる場合には、非アミノ酸置換基が、例えばインビボでの分解を防いだり、遅くしたりすることに用いられてもよい。

30

**【0208】**

好ましい実施態様では、候補生物活性薬剤は、天然発生タンパク質又は天然発生タンパク質の断片である。従って、例えば、タンパク質を含む細胞抽出物、又はタンパク質性細胞抽出物のランダム又は直接消化物を用いてもよい。この方法では、原核生物及び真核生物タンパク質のライブラリは、本発明の方法でのスクリーニングのために作製される。特に、この実施態様で好まれるのは、細菌、糸状菌、ウイルス、及び哺乳動物タンパク質のライブラリであり、後者は好まれており、そしてヒトタンパク質が特に好まれている。

40

**【0209】**

好ましい実施態様では、候補生物活性剤は、約5から約30アミノ酸のペプチドで、約5から約20アミノ酸が好まれ、そして約7から約15が特に好まれる。このペプチドは、上記で概説したように、ランダムペプチド、又は「偏向」ランダムペプチドで、天然発生タンパク質の消化物でありうる。「ランダム化」又はここで文法的に同等な表現によって、各核酸及びペプチドは、基本的に、各々ランダムヌクレオチド及びアミノ酸で構成されていると言われている。一般的に、これらランダムペプチド(又は核酸、下記にて記載)は化学的に合成されることから、それらは、任意のヌクレオチド又はアミノ酸を任意の位置へ取り入れうる。この合成工程は、ランダム化タンパク質又は核酸を生成し、配列の長さによってすべて又は殆どの可能性ある組み合わせの形成を許容するために設計するこ

50

とができ、故にランダム化候補生物活性タンパク質性剤のライブラリを形成する。

【0210】

1つの実施態様では、すべての位置において配列優先又は一定さをともなわずに、ライブラリは完全にランダム化される。好ましい実施態様では、ライブラリは偏っている。すなわち、配列内のある位置は、一定に保たれているか、限られたメンバーの可能性から選択されるかの何れかである。例えば、好ましい実施態様では、例えば、疎水性アミノ酸、親水性残基、立体構造的に偏った（小さい又は大きいどちらか）残基の明確な種類において、核酸結合ドメインの作成、システインの作成、架橋結合のため、SH-3ドメインのプロリン、セリン、スレオニン、チロシン又はヒスチジンのリン酸化部位など、又はプリンに対するなどのために、ヌクレオチド又はアミノ酸残基はランダム化されている。

10

【0211】

好ましい実施態様では、候補生物活性剤は核酸である。「核酸」又は「オリゴヌクレオチド」又はここでの文法的に同等の表現によって、少なくとも2つのヌクレオチドが共有結合的にともに結合していると意味される。本発明の核酸は、概してリン酸ジエステル結合を含んでいるが、下記に概説するように、幾つかの場合は、代替バックボーンを有しうる核酸類似体が含まれ、この代替バックボーンは、例えば、ホスホルアミド (Beaucageら, *Tetrahedron* 49(10): 1925(1993)及びその参考文献; Letsinger, *J. Org. Chem.* 35:3800 (1970); Sprinzlら., *Eur. J. Biochem.* 81:579(1977); Letsingerら., *Nucl. Acids Res.* 14:3487(1986); Sawaiら, *Chem. Lett.* 805(1984), Letsingerら., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470(1988); 及びPauwelsら., *Chemica Scripta* 26:141 (1986))、ホスホロチオエート (Magら., *Nucleic Acids Res.* 19:1437(1991); 及び米国特許第5,644,048号)、ホスホロジチオアート (Briuら., *J. Am. Chem. Soc.* 111: 2321(1989))、O-メチルホスホロアミダイト結合 (Eckstein, *Oligonucleotide and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press参照のこと)、及びペプチド核酸バックボーン及び結合 (Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895(1992); Meierら., *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008(1992); Nielsen, *Nature*, 365:566(1993); Carlssonら., *Nature* 380:207(1996)、すべて参考文献によって取り入れている)を含んでなる。他の類似核酸は、ポジティブ(陽性)バックボーン (Denpcyら., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097(1995); 非イオンバックボーン(米国特許第5,386,023号、第5,637,684号、第5,602,240号、第5,216,141号及び第4,469,863号; Kiedrowskiら., *Angew. Chem. Intl. Ed. English* 30:423(1991); Letsingerら., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470(1988); Letsingerら., *Nucleoside & Nucleotide* 13: 1597(1994); 第2章及び3章、ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui 及びP. Dan Cook; Mesmaekerら., *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4:395(1994); Jeffsら., *J. Biomolecular NMR* 34:17(1994); *Tetrahedron Lett.* 37:743(1996))並びに非リボゾームバックボーンを含み、それらは米国特許第5,235,033号及び第5,034,506号、及び第6及び7章、ACS Symposium Series 580, "Carbohydrate Modification in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui及びP. Dan Cookに記載のものを含む。1つ又は複数の炭素環糖を含む核酸もまた、核酸の定義に含まれる (Jenkinsら., *Chem. Soc. Rev.*(1995)pp169-179)。幾つかの核酸類似体は、Rawls, *C & E News* June 2, 1997 35ページに記載されている。この結果、これら参考文献のすべてが、参考文献によって明らかに取り入れられている。リボース-リン酸バックボーンの修飾は、標識のような付加的物質の付加を容易にするためか、または生理的環境下におけるそのような分子の安定性と半減期を増すためにに施されるであろう。更には、天然発生核酸と類似体の混合物を作製することができる。あるいは、異なる核酸類似体の混合物、及び天然発生核酸と類似体の混合物を作製してもよい。この核酸は、仕様としては、一本鎖又は二本鎖でもよく、或いは二本鎖又は一本鎖配列の双方の部分を含んでもよい。この核酸が任意のデオキシリボ-及びリボ-ヌクレオチドの任意の組み合わせ、並びにウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシン、イソグアニンなどを含む任意の塩基の組み合わせを含む場合には、この

20

30

40

50

核酸は、DNA、ゲノム及びcDNAの双方、RNA又はハイブリッドでもよい。

【0212】

タンパク質に関する上記の一般的な記述のように、核酸候補生物活性剤は、天然発生核酸、ランダム核酸、又は「偏向」ランダム核酸でよい。例えば、タンパク質に関して上記にて概説しているように、原核生物又は真核生物ゲノムの消化物を用いてもよい。

【0213】

好ましい実施態様では、候補生物活性剤は、有機化学的物質であり、その幅広い多くのものを文献から得ることが可能である。

【0214】

上記にて概説した好ましい実施例では、個々の遺伝子と遺伝子の産物（タンパク質）についてスクリーニングを行ってもよい。好ましい実施態様では、遺伝子又はタンパク質は、特定の組織と関連した別々に発現した遺伝子であり、よって条件はこれら組織に関連しているとして、下記の実施例に記載されているように同定された。従って、一実施態様では、スクリーニングは、NS4へ結合することができる候補薬剤を最初に見出すように設計され、次いで、候補薬剤のNS4活性を調節する能力を評価するアッセイに、これら薬剤は用いられうる。従って、当該分野において認識されているように、実行しうる異なった数多くの方法がある。

【0215】

NS4の活性を調節する薬剤のスクリーニングも実行される。好ましい実施態様では、NS4の活性を調節することができる生物活性剤のスクリーニングの方法は、NS4の試料へ候補生物活性剤を添加し、NS4の生物学的活性の変化を測定する段階を含む。「NS4の活性を調節すること」は、活性の増加、活性の低下、又は存在する活性の型や種類の変化を含む。従って、この実施態様では、候補薬剤は、NS4へ結合するはずであるし（これは、必修でなくてもよいが）、そしてここで定義されるNS4の生物学的又は生化学的活性を変化するはずである。この方法は、上記にて全般的に概説したインビトロスクリーニング法、及びNS4の存在、発現、分布、活性、量での変化に関する細胞のインビボスクリーニング法の両方を含む。

【0216】

従って、この実施態様では、これらの方法は、試料と候補生物活性剤を組み合わせること、並びにNS4活性への効果を評価することを含む。「NS4タンパク質活性」又はここでの文法的に同等の用語によって、上記に記載した、少なくともNS4タンパク質の生物学的活性が表される。

【0217】

好ましい実施態様では、NS4タンパク質の活性が上昇する；その他の好ましい実施態様では、NS4タンパク質の活性が低下する。従って、アンタゴニストである生物活性剤は、ある実施態様で好まれ、アゴニストである生物活性剤は、他の実施態様で好まれうる。

【0218】

本発明の一態様では、NS4に対する薬剤候補物質の効果を評価することで、NS4配列を含む細胞は薬剤スクリーニングアッセイで用いられる。細胞型は、正常細胞、腫瘍細胞、及び脂肪細胞を含む。

【0219】

グルコース取り込み、レプチン放出、新陳代謝、トリグリセリド及び遊離脂肪酸レベル、体重及び体脂肪の変化ようなNS4活性を評価する方法は、当該分野で知られており、下記の実施例において例示されている。

【0220】

好ましい実施態様では、上記の定義のように、この方法は、NS4を含む細胞へ候補生物活性剤を添加することを含む。好ましい細胞型は、殆どすべての細胞を含む。これらの細胞は、好ましくは組み換え体であるが、NS4タンパク質をコードする核酸を含む。好ましい実施態様では、候補薬剤のライブラリは、多数の細胞で試験される。

【0221】

一態様では、このアッセイは、例えばホルモン、抗体、ペプチド、抗原、サイトカイン、成長因子、活動電位、化学療法剤を含む薬理学的薬剤、放射線、発癌物質、又は他の細胞（すなわち、細胞間接触）などの生理学的シグナルへの存在下又は非存在下での、又は先だつての又は後での曝露で評価される。その他の実施例では、測定は、細胞周期プロセスの異なった段階で確定される。

#### 【0222】

また、ここで提供されるNS4配列は、診断方法で用いることができる。NS4の過剰発現は異常に高い代謝速度を示し、発現抑制は肥満の傾向を示す。更には、変異又は機能失調のNS4に関して、患者からの試料を分析してもよい。一般的には、そのような方法は、患者からの試料を比較すること、及びNS4の発現をコントロールのそれと比較することを含む。

10

#### 【0223】

##### F. 抗NS4抗体

本発明は、さらに抗NS4抗体を提供するものである。抗体の例としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロコンジュゲート抗体が含まれる。

#### 【0224】

##### 1. ポリクローナル抗体

抗NS4抗体はポリクローナル抗体を含む。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫剤、及び所望するのであればアジュバントを、1つ又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫剤及び/又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫剤は、NS4ポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に抱合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びMP L-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート)が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

20

#### 【0225】

##### 2. モノクローナル抗体

あるいは、抗NS4抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫剤により免疫化することで、免疫剤に特異的に結合する抗体を生成するか或いは生成可能なリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

30

#### 【0226】

免疫剤は、典型的には対象とするNS4ポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBLs」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は増殖を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプテリン及びチミジンを含み(「HAT培地」)、この物質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。

40

50

## 【0227】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髄腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴの Salk Institute Cell Distribution Centerやヴァージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄腫株化細胞も開示されている [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

## 【0228】

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、NS4に対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(RIA)や酵素結合免疫測定法(ELISA)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキヤッチャード解析法によって測定することができる。

## 【0229】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法で増殖させることができる [Goding, 上掲]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及びRPMI-1640培地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として増殖させることもできる。

## 【0230】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離又は精製される。

## 【0231】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができる。これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髄腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [米国特許第4,816,567号; Morrisonら, 上掲]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

## 【0232】

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られている。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意の点で切断される。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。

## 【0233】

10

20

30

40

50

また、一価抗体の調製にはインビトロ法が適している。抗体の消化による、その断片、特にFab断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成できる。

#### 【0234】

### 3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗NS4抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの全てを実質的に含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる [ Jonesら, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmannら, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992) ]。

10

20

#### 【0235】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の1つ又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に、ウィンター(Winter)及び共同研究者 [ Jonesら, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmannら, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyenら, Science, 239:1534-1536 (1988) ] の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

30

#### 【0236】

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリー [ Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381(1991); Marksら, J. Mol. Biol., 222:581 (1991) ] を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。また、Coleら及びBoernerらの方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる [ Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. p.77(1985)及びBoernerら, J. Immunol., 147(1): 86-95(1991) ]。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生成が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号;同第5,545,806号;同第5,569,825号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,661,016号、及び次の科学文献: Marksら, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonbergら, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwildら, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)に記載されている。

40

#### 【0237】

### 4. 二重特異性抗体

50

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合においては、結合特異性の一方はNS4に対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

#### 【0238】

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく[Milstein及びCuello, Nature, 305:537-539 (1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内の一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のW093/08829、及びTrauneckerら, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

10

#### 【0239】

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH2及びCH3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSureshら, Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照されたい。

20

#### 【0240】

W096/27011に記載された他の方法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーの割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの1つ又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャピティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

30

#### 【0241】

二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、 $F(ab')_2$ 二重特異性抗体)として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, Science, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断して $F(ab')_2$ 断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生された $Fa b'$ 断片はついでチオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に転換される。次に、 $Fa b'$ -TNB誘導体の一つをメルカプトエチルアミンでの還元により $Fa b'$ -チオールに再転換し、他の $Fa b'$ -TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

40

#### 【0242】

大腸菌から $Fa b'$ 断片を直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalabyら, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体 $F(ab')_2$ 分子の製造を記述している。各 $Fa b'$ 断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞及びErbB2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

50

## 【0243】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生成されている。Kostelnyら, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なる抗体のFab'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生成に対して使用することができる。Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短かすぎるリンカーにより軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )に重鎖可変ドメイン( $V_H$ )を結合してなる。従って、一つの断片の $V_H$ 及び $V_L$ ドメインは他の断片の相補的 $V_L$ 及び $V_H$ ドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruberら, J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttら J. Immunol. 147:60(1991)。

10

## 【0244】

例示的な二重特異性抗体は、ここに与えられたNS4ポリペプチドの2つの異なるエピートープに結合しうる。あるいは、抗NS4ポリペプチドのアームは、特定のNS4ポリペプチド発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、T細胞レセプター分子(例えばCD2、CD3、CD28、又はB7)等の白血球上のトリガー分子又はFcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)等のIgG(FcR)に対するFcレセプターに結合するアームと組み合わせてもよい。また、二重特異性抗体は特定のNS4ポリペプチドを発現する細胞に細胞障害性薬を局在化させるためにも使用されうる。これらの抗体はNS4結合アーム及び細胞障害性薬又は放射性キレート化剤、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、又はTETAと結合するアームを有する。対象となる他の二重特異性抗体はNS4ポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子(TF)に結合する。

20

## 【0245】

## 5. ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4,676,980号]及びHIV感染の治療のために[W091/00360; W092/200373; EP03089]提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されたものが含まれる。

30

## 【0246】

## 6. エフェクター機能の加工

本発明の抗体を、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させるためにエフェクター機能について改変することが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞障害性(ADCC)を有する可能性がある。Caronら, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolffら, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevensonら, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照

40

50

。

## 【0247】

## 7. 免疫コンジュゲート

また、本発明は、化学治療薬、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片）などの細胞障害性薬、あるいは放射性同位体（即ち、放射性コンジュゲート）と抱合している抗体を含む免疫複合体に関する。

## 【0248】

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上述した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑膿菌からの）エキソトキシンA鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、  
-サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、ツルレイシインヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 及び $^{186}\text{Re}$ が含まれる。

10

## 【0249】

抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら, Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。W094/11026参照。

20

30

## 【0250】

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」(ストレプトアビジン等)に抱合されてもよく、抗体-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞障害性薬(例えば、放射性ヌクレオチド等)に抱合された「リガンド」(アビジン等)を投与する。

## 【0251】

## 8. 免疫リポソーム

また、ここに開示する抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号  
に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

40

## 【0252】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のFab'断片は、Martinら, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに抱合され得る。化学治療薬(ドキシソルピシン等)は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizonら, J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)参照。

50

## 【0253】

## 9. 抗体の製薬組成物

ここで同定される NS4 ポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイによって同定された他の分子は、種々の疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

## 【0254】

NS4 ポリペプチドが細胞内にあり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、取り込める抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に導入するために使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、及び/又は組換え DNA 技術によって生成できる。例えば、Marascoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に2つ以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、その機能を促進させる薬剤、例えば細胞障害性薬、サイトカイン、化学療法剤又は増殖阻害剤などを含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

10

## 【0255】

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 上掲に開示されている。

20

## 【0256】

インピボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

## 【0257】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール))、ポリルアクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸と-D-エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュプロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37%の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通した分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフィド残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

30

40

## 【0258】

## G. 抗NS4抗体の一般用途

本発明の抗NS4抗体は様々な有用性を有している。例えば、抗NS4抗体は、NS4の診断アッセイ、例えばその特定細胞、組織、滑液、血漿/血清又は尿における発現の検出に用いられる。競合的結合アッセイ、直接又は間接サンドウィッチアッセイ及び不均一又

50

は均一相で行われる免疫沈降アッセイ [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158] 等のこの分野で知られた種々の診断アッセイ技術が使用される。診断アッセイで用いられる抗体は、検出可能な部位で標識される。検出可能な部位は、直接又は間接に、検出可能なシグナルを発生しなければならない。例えば、検出可能な部位は、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 又は $^{125}\text{I}$ 等の放射性同位体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリン等の蛍光又は化学発光化合物、あるいはアルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ等の酵素であってよい。抗体に検出可能な部位を抱合させるためにこの分野で知られた任意の方法が用いられ、それにはHunterら, Nature 144:945 (1962); Davidら, Biochemistry, 13: 1014 (1974); Painら, J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); 及びNygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982)に記載された方法が含まれる。 10

【0259】

また、抗NS4抗体は、組換え細胞培地又は天然の供給源からのNS4の親和性精製に利用できる。この方法において、NS4に対する抗体を、当分野でよく知られた方法を用いてSephadex樹脂又は濾紙等の適した支持体に固定化する。次いで、固定化した抗体をNS4を含む試料と接触させて精製し、その後、固定化した抗体と結合したNS4以外の試料中の実質的には全ての物質を取り除きうる適した溶媒で、支持体を洗浄する。最後に、支持体を抗体からNS4を引き離しうる他の適した溶媒で洗浄する。

【0260】

後述の実施例は、例示のみを目的としており、いかなる意味でも本発明の範囲を限定するものではない。 20

【0261】

H. トランスジェニック動物

新規ヒトNS4又は他の供給源、例えばマウスからの類似NS4をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物のいずれかを産生することに使用でき、また、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えばマウス)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施形態では、NS4をコードするcDNAは、NS4をコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、NS4をコードするゲノムDNAをクローン化するために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等の特定の動物を産生する方法は、当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4,736,866号や第4,870,009号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのNS4導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたNS4コード化導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物はNS4をコードするDNAの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療上の処置の可能性が示される。 30 40

【0262】

あるいは、NS4の非ヒト相同体は、動物の胚幹細胞に導入されたNS4をコードする変更ゲノムDNAと、NS4をコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、欠損した又は変更されたNS4コード化遺伝子を有するNS4「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、NS4をコードするcDNAは、確立された技術に従い、コードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。NS4をコードするゲノムDNAの一部(例えば、エキソン)は、組込みをモニターするために使用可能な選択マーカーをコード遺伝子のような他の遺伝子によって欠失させたり、置換させたりすることが可能である。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数キ 50

ロベース含む [ 例えば、相長的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと ]。ベクターは胚幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相的に組換えられた細胞が選択された [ 例えば、Liら, Cell, 69:915(1992)参照 ]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する [ 例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照のこと ]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間を置いて「ノックアウト」動物を作り出す。胚細胞に相的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、移植を受け入れる能力、癌を拒絶する能力および感染症から防御する能力によって特徴付けられ、基礎免疫生物学の研究に利用することができる。

10

## 【0263】

トランスジェニック動物の創造に使用される特定の技術は、酵母人工染色体(YAC)を使用する。酵母人工染色体は、酵母染色体のエレメントから構築されたクローニングベクターであり、インピボでベクターを酵母細胞に複製および維持することを可能にする。酵母エレメントには、セントロメア、自律増殖配列、一対のテロメア、酵母選択可能マーカー、およびバクテリア中のYACベクターアームの選択と複製のための、通常バクテリア由来の複製および選択可能マーカーが含まれる。

## 【0264】

宿主動物のゲノムへの挿入のための内在遺伝子座の遺伝子ターゲティングと組み合わせてYACを使用することができる。YACを使用することの利点は、数百キロベースのDNAを宿主細胞に挿入できることである。したがって、YACクローニング媒体の使用により、かなり多くの導入遺伝子領域を含めることが可能になる。さらなる利点は、酵母において高頻度相同性組換えを利用することで、YAC上の配列を削除したり、YAC上に配列を挿入したりすることができることである。これにより、YAC導入遺伝子の設計が容易になる。

20

## 【0265】

ヒト抗体を創造する場合などに、ヒト核酸の大セグメントを動物へ組み込むという別の方法は、「小座位アプローチ」として知られている。「小座位アプローチ」は、遺伝子座を有する個々の遺伝子の導入による(免疫グロブリンなどの)対象遺伝子の遺伝子座の複製に関する。例えば、遺伝子座が免疫グロブリンである場合、構成遺伝子は、1または複数のVH遺伝子、1または複数のDH遺伝子、1または複数のJH遺伝子、mu定常領域、第2の定常領域であり得、それらは動物への挿入のために単一構造に形成させることができる。このアプローチの例は、Surani他による米国特許第5,545,807号、LonbergおよびKayによる米国特許第5,545,806号、同第5,625,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,661,016号、5,770,429号、同第5,789,650号および同第5,814,318号、KrimpenfortおよびBernsによる米国特許第5,591,669号、Berns他による米国特許第5,612,205号、同第5,721,367号、同第5,789,215号、ChoiおよびDunnによる米国特許第5,643,763号、欧州特許第0546073B1号、国際公開番号W092/3918、W092/22645、W092/22647、W092/22670、W093/12227、W094/00569、W094/25585、W096/14436、W097/13852、W098/24884に記載されている。他の例は、Taylor他、Nucleic Acids Res. 20: 6287-6295, 1992年; Chen他、Inter. Immunol. 5: 647-656, 1993年; Tuailon他、J. Immunol. 154: 6453-6465, 1995年; Choi他、Nature Genetics 4: 117-123, 1993年、Lonberg他、Nature 368:856-859, 1994年、Taylor他、Internat. Immunol. 6: 579-591, 1994年、Tuailon他、J. Immunol 154: 6453-6465, 1995年、およびFishwild他、Nature Biotech. 14: 845-851, 1996年に紹介されている。

30

40

## 【0266】

ヒト核酸を哺乳類細胞へ導入するためのさらに別の方法は、「微小核細胞融合」と称されている。微小核細胞融合では、欧州特許出願公開番号第0843961号に記載のように、ヒト

50

染色体の一部または全部をマウスに導入することができる。この方法により導入遺伝子が相当量の遺伝子材料を含むことになるので、特定の座位に多数の遺伝子が含まれる場合、特定の遺伝子それぞれの発現プロファイルに対して可能な制御は一般に大きくない。微小核細胞融合の別の問題点は、導入染色体の有糸分裂および減数分裂ともに不安定なことである。例えば、導入遺伝子が免疫グロブリン遺伝子座であったとき、ヒトIgH、IgKまたはその両方をコード化する導入染色体は80%に近い頻度で失われた。

【0267】

I. 体重関連の異常、治療および診断のためのNS4ポリヌクレオチドポリペプチドおよびそれによってコードされたポリペプチドの使用

本発明は、また、肥満、悪液質および摂食障害などの体重異常の診断および治療に関連した様々な特異的使用のためのNS4 DNA、それからコード化されたポリペプチド（そのペプチド断片およびそれに対する抗体を含む）、ならびにペプチド断片も目的としている。

10

【0268】

後述する使用の各々は主に体重異常に対するものであるが、後述の診断的および治療的処置はそのような体重異常に関連する他の欠陥、例えば多嚢胞卵巣、感染症、静脈瘤、黒色表皮腫、及び湿疹などの皮膚疾患、運動不耐性症、代謝異常、摂食亢進、糖尿病、インシュリン抵抗症、高血圧、高コレステロール血症、脳卒中、高脂血症、胆石症、骨関節炎、整形外科的傷害、血栓疾患、癌、及び心臓冠状動脈疾患に関して使用することもできる。

20

【0269】

そのような使用とは、例えば、(1) 体重異常の予防的および診断的評価およびそのような異常が進行する危険を有する個体の識別；(2) 体重異常の治療方法；(3) NS4 DNAの発現を調節する化合物の同定、(4) またはNS4ポリペプチドの活性を調節する化合物の同定である。さらに具体的には、個体に対するそのような使用には、NS4突然変異の存在の検知、あるいは、野生型発現レベル、病的状態と相関する遺伝子プロファイルを有する非病的生物、またはそのような体重異常の罹患率と比較したNS4ポリペプチドの発現過剰または発現不足の検知を含む。

【0270】

ここに開示する方法は、例えば、少なくとも1つのここに開示した特定のNS4核酸または抗NS4ポリペプチドを含む予めパッケージされた診断用キットを利用することにより実行することができ、それにより、体重異常を示す個体をスクリーニングおよび診断し、次いで体重異常を患う疾病素質を有する個体をスクリーニングすることもできる。

30

【0271】

NS4突然変異の検出において、問題の個体由来の有核細胞をゲノム核酸の供給源として使用することができる。NS4発現の検出において、NS4 DNAが発現される任意の細胞型または組織、例えば、NS4 DNAを発現することが本明細書で示されている組織または細胞を使用することができる。核酸に基づく検出技術およびタンパク質に基づく検出技術の両方について後述する。

【0272】

(1) NS4核酸の検出

NS4 DNA内部における突然変異または多型は、多数の技術により検出可能である。そのようなアッセイ技術の開始点として、任意の有核細胞由来の核酸を使用し、当技術分野で周知の標準的な核酸調製手順に従って単離することができる。

40

【0273】

生物学的試料のハイブリダイゼーションまたは増殖アッセイにゲノムDNAを使用して、点突然変異、挿入、欠失および染色体再配列を含め、NS4遺伝子構造に伴う異常性を検出することができる。このようなアッセイは、サザン分析、一本鎖高次構造多型(SSCP)分析、およびPCR分析を含み、またそれらに限定されない。

【0274】

50

NS4 遺伝子に特異的な突然変異の検出のための診断方法では、例えば、試料由来の（患者の試料、またはその他適切な細胞供給源から取得するなどした）核酸を、1または複数の標識された核酸試薬（組換えDNA分子、クローン化遺伝子、またはその縮重変異体を含む）に、これら試薬をNS4 遺伝子に隣接するまたはその内部の相補的配列に対して特異的にアニーリングするのに適した条件下で接触させてインキュベートすることを含みうる。好ましくは、そのような核酸試薬の長さは少なくとも15から30ヌクレオチドである。

**【0275】**

培養後、アニーリングされていない核酸を核酸から取り除く：NS4 分子ハイブリッド。次いでハイブリダイズした核酸の存在を（そのような核酸が存在する場合は）検出する。このような検出方式を使用することにより、対象とする細胞型または組織由来の核酸を、例えば、膜、あるいはマイクロタイタプレート又はポリスチレンビーズ上の可塑性表面などの固体の担体に固定化することができる。この場合、培養後、アニーリングされていない標識核酸試薬は容易に除去される。アニーリングされ、標識された残存するNS4 核酸試薬の検出は、当技術分野において周知の標準的な技術を使用して行う。核酸試薬をアニーリングしたNS4 DNA配列を正常NS4 DNA配列に予想されるアニーリングパターンと比較することにより、NS4 DNA突然変異が存在するかどうかを決定することができる。

10

**【0276】**

好ましい実施形態では、基質または「遺伝子チップ」に固定されたNS4 核酸配列のマイクロアッセイを使用することにより、NS4 遺伝子突然変異または多型性を検出することができる（Cronin,他、Human Mutation 7: 244-255, 1996年参照）。

20

**【0277】**

患者の試料またはその他適切な細胞供給源におけるNS4 遺伝子に特異的な核酸分子の検出のための別の診断方法は、例えばPCR（米国特許第4,683,202号に開示された実験形態）によりそれらを増幅し、それに続いて、たとえば上記に列挙した当技術分野で周知の技術を使用して増幅分子を分析することを含む。その結果得られる増幅配列を、増幅された核酸がNS4 遺伝子の正常なコピーのみを含む場合に予想されるものと比較することにより、NS4 遺伝子突然変異が存在するかどうかを決定することができる。

30

**【0278】**

そのような増幅に関連する診断的スクリーニング分析に好ましいそれらNS4 核酸配列は、NS4 エクソン配列を増幅するオリゴヌクレオチドプライマーである。したがって、このようなオリゴヌクレオチドプライマーの配列は、後述するようなエクソン全体またはコード化領域の分析を可能にするために、NS4 イントロン配列から取得するのが好ましい。NS4 エクソンの増幅に有用なプライマーの対は、好ましくは、隣接するイントロンから取得する。25個のNS4 エクソンの各々を増幅することにより適切なプライマーの対を選択することができる。

**【0279】**

NS4 エクソンを増幅するためのプライマーは、図1、2、および3に示すNS4 のコーディングおよび非翻訳配列を使用することにより、当技術分野の従来技術の1つにより常套的に設計することができる。このような増幅に関連する分析に好ましい付加的なNS4 核酸配列は、NS4 多型性の存在を検出する配列である。このような多型性には、肥満、悪液質、または摂食障害などの体重異常に関連する突然変異を示すものを含む。

40

**【0280】**

さらに、肥満、悪液質、または摂食障害などの体重異常に関連する突然変異を含め、NS4 遺伝子自体の突然変異に非常に近似する多型性に対し、周知の遺伝子型特定技術を実施してもよい。NS4 遺伝子の突然変異を保持していると思われる系統の固体を特定するために、そのような多型性を使用することができる。多型性がNS4 遺伝子の突然変異との連鎖不平衡を示す場合、多型性を使用してそのような突然変異を保持していると思われる個体を集団全体から識別することができる。

50

## 【0281】

この方法に使用できる多型性は、一塩基多型性、および単純配列長多型 (SSLP) 制限酵素標的配列、に配列変化を伴う制限断片長多型 (RFLP) を含む。例えば、米国特許第5,075,217号には、 $(dC - dA)_n - (dG - dT)_n$  短縦列反復のブロックの長さ多型性に基づくDNAマーカーが開示されている。 $(dC - dA)_n - (dG - dT)_n$  ブロックの平均分離は、30,000 - 60,000 bpと推定されている。接近して配置されたマーカーは高頻度の共通遺伝を示し、NS4遺伝子の突然変異などの遺伝子突然変異の同定、およびNS4遺伝子の突然変異に関連する疾病および障害の診断に極度に有益である。

## 【0282】

また、米国特許第5,364,759号には、短いトリおよびテトラヌクレオチド反復配列を検出するためのDNAプロファイリングアッセイが開示されている。この方法は、NS4遺伝子などの目的のDNAを抽出すること、抽出したDNAを増幅すること、および反復配列に標識して患者のDNAの遺伝子型地図を形成することを含む。

## 【0283】

加えて、NS4プローブを使用して直接RFLPを同定することができる。さらに、NS4配列から獲得したNS4プローブまたはプライマーを使用して、YAC、BAC、PAC、コスミド、ファージ、またはプラスミドなどの遺伝子クローンを単離することができる。

## 【0284】

標準的ハイブリダイゼーションまたは配列決定法を使用して、これらのクローンに含まれるDNAを一塩基多型性についてスクリーニングすることができる。NS4遺伝子発現のレベルもアッセイすることができる。例えば、NS4遺伝子を発現していることが分かっているか、疑われている細胞型または組織、例えば筋肉、脳、腎臓、精巣、心臓、肝臓、肺、皮膚、視床下部、脾臓、および脂肪性組織由来のRNAを単離し、上述のハイブリダイゼーション、またはPCR技術を使用して試験してもよい。単離される細胞は細胞培地または患者から得てもよい。培地から取得した細胞の分析は、細胞ベース遺伝子治療技術の一部として使用されるか、あるいは、NS4遺伝子の発現に対する化合物の効果を試験するための、細胞の評価において必要な過程でありうる。このような分析により、NS4遺伝子発現の活性または非活性を含め、NS4遺伝子の発現パターンの量的および質的な面の両方を明らかにすることができる。

## 【0285】

このような検出体系の一実施形態では、(例えば、RNA分子をcDNAに逆転写することにより) 目的のRNA分子からcDNA分子を合成する。次いで、その結果得られるDNAの全てまたは一部を、PCR増幅反応などの核酸増幅反応の鋳型として使用する。本方法の逆転写および核酸増幅の過程において合成開始試薬(例えば、プライマー)として使用される核酸試薬は、ここに開示するNS4遺伝子核酸試薬から選択される。

## 【0286】

このような核酸試薬に好ましい長さは、少なくとも9 - 30ヌクレオチドである。増幅産物の検出のために、放射性的にまたは非放射性的に標識したヌクレオチドを使用して核酸増幅を実行してもよい。あるいは、標準的な臭化エチジウム染色によるか、またはその他任意の適切な核酸染色法を使用することにより産物を可視化するのに十分な増幅産物を作成してもよい。

## 【0287】

適切な細胞の十分量を取得できるのであれば、増幅技術の代替法として、標準的なノーザン分析法を実行することにより、NS4遺伝子のmRNA発現レベルを決定することができる。加えて、そのようなNS4遺伝子発現アッセイを「インサイツ」で、つまり、細胞診または切除術によって取得した患者組織の組織分画(固定および/または凍結)で直接的に実行することが可能であり、よって核酸の精製が不要である。ここに開示するような核酸試薬を、そのようなインサイツ処理においてプローブおよび/またはプライマーとし

10

20

30

40

50

て使用してもよい（例えば、Nuovo, G.J., 1992年、" PCR In Situ Hybridization: Protocols and Applications ", Raven Press, NY参照）。

【0288】

(2) NS4 遺伝子産物の検出

天然配列、変異体、およびそのポリペプチド断片を含むNS4 遺伝子産物の検出に、そのようなNS4 遺伝子産物に対する抗体を使用してもよい。このような抗NS4 抗体は、体重異常の診断および予後に使用してもよい。NS4 遺伝子発現、またはNS4 遺伝子産物合成のレベルにおける異常、またはNS4 遺伝子産物の構造、一時的発現、および/または物理的位置の異常を発見するために、このような方法を使用できる。ここに開示する抗体およびイムノアッセイ方法は、例えば、肥満、悪液質、および摂食障害などの体重異常の治療の効果を評価する際に重要なインビトロでの用途を有する。抗体、または抗体の断片（例えば以下に記すもの）を使用して、インビトロで潜在的治療化合物をスクリーニングし、NS4 遺伝子発現およびNS4 遺伝子産物生成に対するその効果を決定することができる。肥満、悪液質、摂食障害などの体重異常に有利な効果を有する化合物を同定し、治療的有効量を決定することができる。

10

【0289】

また、インビトロのイムノアッセイを使用して、例えば、肥満、悪液質、および摂食障害を含む体重異常に対する細胞ベース遺伝子療法の効果の評価してもよい。NS4 遺伝子産物に対する抗体をインビトロで使用して、例えば、NS4 遺伝子産物を生成するように遺伝子設計されている細胞におけるNS4 遺伝子発現レベルを決定してもよい。細胞内NS4 遺伝子産物の場合、そのような評価は、好ましくは細胞ライセートをまたは抽出物を使用して行う。この分析により、インビボでの治療効果、ならびに遺伝子置換プロトコルの最適化を達成するのに必要な形質転換した細胞の数を決定することができる。

20

【0290】

分析対象の組織または細胞型は通常NS4 遺伝子を発現していることが分かっているか、または疑われているものを含む。ここで使用するタンパク質単離方法は、例えば、Harlow および Lane により開示されたもの（1988年、" Antibodies: A Laboratory Manual ", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York）などでよい。単離された細胞は、細胞培地または患者から採取することができる。培地から取得した細胞の分析は、細胞ベース遺伝子治療技術の一部として使用されるか、あるいは、NS4 遺伝子の発現に対する化合物の効果を試験するための、細胞の評価において必要な過程である。

30

【0291】

NS4 遺伝子産物、保存変異体、またはそのペプチド断片の好ましい診断法には、例えば、NS4 遺伝子産物または保存的な変異体またはペプチド断片を、抗NS4 遺伝子産物に特異的な抗体とそれらとの相互作用により検出する、イムノアッセイを使用できる。

【0292】

例えば、上述のような抗体、または抗体の断片を使用して、NS4 遺伝子産物または保存的な変異体またはそのペプチド断片の存在を量的または質的に検出してもよい。これは、例えば、蛍光標識した抗体を光学顕微鏡、フローサイトメトリー、または蛍光定量的検出と組み合わせて使用する免疫蛍光技術により行うことができる。この技術は細胞表面に発現したNS4 遺伝子産物のために特に好ましい。

40

【0293】

加えて、NS4 遺伝子産物、保存的な変異体またはそれらのペプチド断片をインサイツで検出するために、本発明において有用な抗体（またはその断片）を、免疫蛍光法または免疫電子顕微鏡法において組織学的に使用してもよい。インサイツでの検出は、患者から組織学的標本を取り出し、それに対してNS4 ポリペプチドに結合する標識した抗体を加えることより達成できる。抗体（又は断片）の添加は、生物学的試料に標識した抗体（または断片）をオーバーレイすることにより行うのが好ましい。本方法の使用により、NS4 遺伝子産物、保存的な変異体またはペプチド断片の存在だけでなく、試験された組織内におけるその分布も決定することが可能である。本発明の使用により、多種多様な組織学的

50

方法（例えば染色法）を修正してNS4遺伝子産物のインサイトでの検出を達成することが可能であることが、当業者には容易に理解できるであろう。

【0294】

NS4遺伝子産物、保存的な変異体またはそのペプチド断片のイムノアッセイは、一般に、（1）生体液、組織抽出物、収集直後の細胞、または細胞のライセートなどの試料を、NS4遺伝子産物、保存的な変異体またはそのペプチド断片を同定することのできる、検出可能に標識された抗体の存在下で培養すること、および（2）当技術分野で周知の多数の技術のうちのいずれか1つにより結合した抗体を検出すること、を含む。

【0295】

細胞、細胞片又は可溶性蛋白質を固定化することができるニトロセルロースなどの固相支持体または担体に、生物学的試料を接触させて固定する。次いで支持体を適切な緩衝液で洗浄し、その後検出可能に標識したNS4遺伝子産物に特異的な抗体で処理する。緩衝液で固相支持体の2度目の洗浄を行い、非結合抗体を除去する。その後、固相支持体上の結合標識の量を、従来からある手段により検出する。

【0296】

「固体相支持体または担体」とは、抗原または抗体に結合可能な任意の支持体を意味する。周知の支持体または担体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および加工セルロース、ポリアクリルアミド、斑レイ岩、および磁鉄鉱が含まれる。本発明の目的のために、担体の性質は、ある程度可溶性でもよく、または非可溶でもよい。支持体の材料は、結合分子が抗原または抗体に結合できる限り、可能な構造的構成のいずれかを有するものでもよい。したがって、支持体の構造は、ビーズのような球状、または試験管の内部表面やロッドの外部表面のような円柱状でよい。あるいは、表面はシート、試験用ストリップなどのように平坦でもよい。好ましい支持体にはポリスチレンのビーズが含まれる。抗体または抗原の結合に使用できるその他多数の適切な担体が当業者に既知であり、当業者は常套的実験の使用によりそのような担体を確認することができる。

【0297】

NS4遺伝子産物に特異的な抗体を検出可能に標識する方法は、酵素イムノアッセイ（EIA）などの検出が容易な酵素の使用である（Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) II, Diagnostic Horizons 2: 1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD, 1978年; Voller, A.他、J. Clin. Pathol. 31, 507-520, 1978年; Butler, J.E., Meth. Enzymol. 73: 482-523, 1981年; Maggio, E. (編)、Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL, 1980年; Ishikawa, E.他 (編)、Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokyo, 1981年)。抗体に結合する酵素は好適な基質、好ましくは色素産生基質に反応し、分光光度手段、蛍光手段、視覚的手段などにより検出可能な化学成分を生じる。抗体を検出可能に標識する酵素は、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌のヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、-グリセロリン酸、脱水素酵素、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリリン酸、アスパラギナーゼ、グルコース酸化酵素、-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、グルコアミラーゼおよびアセチルコリネステラーゼを含み、またそれらに限定されない。検出は、酵素に色素産生基質を使用する比色分析方法により実行可能である。基質の酵素反応範囲を、同様に調製した基準と比較する視覚的比較により検出を行ってもよい。

【0298】

様々な他のイムノアッセイのいずれかを使用して検出を行うこともできる。例えば、抗体または抗体断片を放射標識することにより、ラジオイムノアッセイ（RIA）を使用してNS4遺伝子産物を検出することが可能である（例えば、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, 1986年3月）。そのような手段をガンマカウンターまたはシンチレ

ーションカウンターとして使用するか、またはオートラジオグラフィにより、放射活性同位元素を検出することができる。

【0299】

抗体を蛍光性化合物で標識することも可能である。蛍光標識した抗体を適切な波長の光に曝すと、蛍光によりその存在を検出することができる。最も広く使用されている蛍光標識用化合物は、フルオレセインイソチオシアン酸塩、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、0-フタルアルデヒドおよびフルオレサミンである。

【0300】

<sup>152</sup>Euなどのフルオレセイン放出金属、またはランタニド系のその他金属を使用して、抗体を検出可能に標識することができる。これら金属は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などの金属キレート群を使用して、抗体に添付することができる。

10

【0301】

抗体は、化学発光化合物に結合させることにより検出可能に標識することができる。この時、化学発光タグの付いた抗体の存在は、化学反応の過程で生じるルミネセンスの存在を検出することにより決定される。特に有益な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、theromaticアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸塩エステルを含む。

【0302】

同様に、生物発光化合物を使用して本発明の抗体を標識してもよい。生物発光とは、触媒タンパク質により化学発光反応の効率が上昇する、生物学系に見られる化学発光の一つの型である。生物発光タンパク質の存在は、ルミネセンスの存在を検出することで決定することができる。標識のために重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。

20

【0303】

(3) NS4核酸または遺伝子産物と相互作用する化合物のスクリーニングアッセイ  
以下のアッセイは、NS4遺伝子産物、NS4遺伝子産物と相互作用するタンパク質、またはタンパク質の一部に結合する化合物、NS4遺伝子産物とタンパク質との相互作用を阻害する化合物、およびNS4遺伝子の活性を調節する(すなわち、NS4遺伝子の発現レベルを調節する、および/またはNS4遺伝子産物の活性を調節する)化合物を同定するように設計されている。本アッセイはまた、NS4遺伝子制御配列(例えば、プロモーター配列;例えば、Platt, J. Biol. Chem. 269: 28558-28562, 1994年参照。参照により本文献全体を本発明に包含する)に結合し、NS4遺伝子発現のレベルを調節できる化合物を同定するために使用できる。このような化合物は、血液脳関門を通過でき、適切な細胞内へ達し及び/又は進入し、NS4遺伝子または体重制御経路に関わるその他複数の遺伝子の発現、または細胞内タンパク質に影響できるような小有機分子を含むことができ、またそれに限定されない。

30

【0304】

このようなタンパク質の同定方法について以下に説明する。本タンパク質は体重の管理および/または制御に関与できる。さらに、これら化合物の中には、NS4遺伝子発現レベルおよび/またはNS4遺伝子の生産活動に影響を与え、肥満、悪液質、および摂食障害を含む体重異常の治療に使用できる化合物がある。

40

【0305】

化合物は、例えば、Ig-端融合ペプチドおよびランダムなペプチドライブラリ(例えば、Lam他、Nature 354: 82-84, 1991年; Houghten他、Nature 354: 84-86, 1991年)、およびD-構造および/またはL-構造のアミノ酸からなる化学的に得られた組み合わせの分子ライブラリのメンバーを非限定的に含む可溶ペプチドなどのペプチド、(ランダムなまたは一部縮小した、特定のリンタンパク質ライブラリを非限定的に含む)リン酸ペプチド(例えば、Songyang他、Cell 72: 767-778, 1993年)、(多クローン性、単クローン性、ヒト化、抗イデオタイプ、キメラまたは一本鎖抗体、およびFAb、F(ab'))

50

、および F A b 発現ライブラリ断片、およびそのエピトープ結合断片を非限定的に含む)抗体、および小有機または無機分子を含み、またそれらに限定されない。

【0306】

ここに開示するようなアッセイにより同定された化合物は、例えば、NS4 遺伝子産物の生物学的機能を確定するのに、および肥満、悪液質、または摂食障害などの体重異常を改善するのに有用である。

【0307】

(a) NS4 遺伝子産物に結合する化合物のインビトロスクリーニングアッセイ  
本発明の NS4 遺伝子産物に結合できる化合物を同定するためのインビトロシステムを設計することができる。同定された化合物は、例えば、無傷の、および/または突然変異の NS4 遺伝子産物の活性を調節する際、NS4 遺伝子産物の生物学的機能を確定する際、正常 NS4 遺伝子産物の相互作用を妨害する化合物を同定するスクリーニングにおいて、有用であるか、あるいはそれ自体そのような相互作用を妨害することができる。

10

【0308】

NS4 遺伝子産物に結合する化合物を同定するために使用されるアッセイの基本方式は、NS4 遺伝子産物と試験化合物の反応混合物を、それら 2 要素が相互作用して結合するのに十分な時間と条件の下で調整し、それにより、反応混合物中で除去および/または検出できる複合体を形成することを含む。これらのアッセイは、様々な方法で実施することができる。例えば、このようなアッセイを行う方法は、NS4 遺伝子産物または試験物質を固体の支持体上に係留し、反応の終わりに、固体の支持体上に形成された NS4 遺伝子産物/試験化合物複合体を検出することを含む。このような方法の一実施形態では、NS4 遺伝子産物を固体の支持体上に係留することができ、係留されない試験化合物を直接的にまたは間接的に標識することができる。

20

【0309】

実際には、マイクロタイプレートを固体の支持体として利用する。係留した成分は、非共有または共有接着により固定化できる。非共有接着は、単に固体表面をタンパク質の溶液で被覆し、乾燥させることにより行うことができる。あるいは、タンパク質の固定化に特異的な、固定化された抗体、好適にはモノクローナル抗体を、タンパク質を固体表面上に係留するために使用できる。表面を事前に準備し、保存しておくことも可能である。

【0310】

アッセイを実行するために、係留された成分を含む被覆表面に非固定化成分を加える。反応完了後、形成された複合体が固体表面に固定化されて残るようにして、反応しなかった成分を(例えば洗浄により)除去する。表面上に係留された複合体の検出は、多くの方法で行うことができる。予め固定化されていない成分に事前に標識している場合、表面上に固定化されていない標識が検出されるということは、複合体が形成されたことを示す。予め固定化されていない成分に事前に標識しない場合、表面上に係留した複合体を検出するために間接的標識を使用することができる;例えば、予め固定化されていない成分に特異的な標識抗体を使用する(抗体を、標識抗 I g 抗体で直接的または間接的に標識できる)。

30

【0311】

あるいは、液体相で反応を行い、無反応成分から反応産物を分離し、複合体を検出する;例えば、NS4 遺伝子産物または試験化合物に特異的な固定化抗体を使用することにより溶液中に形成された複合体、及び可能な複合体のその他の成分に特異的な標識抗体を係留し、係留された複合体を検出する。

40

【0312】

(b) NS4 遺伝子産物と相互作用するタンパク質のアッセイ  
タンパク質-タンパク質相互作用の検出に適した任意の方法を使用して、NS4 遺伝子産物-タンパク質相互作用を同定することができる。使用可能な伝統的な方法としては、勾配またはクロマトグラフのカラムによる共精製、架橋および共免疫沈降を挙げることができる。このような方法を利用することで、NS4 遺伝子産物と相互作用するタンパク質を

50

同定することができる。これに限定されないが、このようなタンパク質はNS4遺伝子産物を含みうる。単離後、そのようなタンパク質を同定し、標準的技術と共に使用することにより、それが相互作用するタンパク質を同定することができる。例えば、NS4遺伝子産物と相互作用するタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも一部は、エドマン分解法といった当技術分野で周知の技術を使用して確認することができる（例えば、Creighton, "Proteins: Structures and Molecular Principle", W.H. Freeman & Co., N.Y., 34-49頁、1983年参照）。このようなタンパク質をコード化する遺伝子配列のスクリーニングに使用できるオリゴヌクレオチドの混合物の生成のためのガイドとして、取得したアミノ酸配列を使用してもよい。スクリーニングは、例えば、標準的なハイブリダイゼーションまたはPCR技術により行うことができる。オリゴヌクレオチド混合物の生成およびスクリーニングの方法は周知である（例えば、Ausubel, 上掲、および1990年、"PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis他、編 Academic Press, Inc., New Yorkを参照）。

10

20

30

40

50

### 【0313】

加えて、NS4遺伝子産物と相互作用するタンパク質をコード化する遺伝子の同時同定を行う方法を採用することも可能である。これらの方法には、例えば、Xgt11ライブラリの抗体プローブの周知の技術と同様にしてNS4遺伝子産物を使用し、標識されたNS4遺伝子産物での発現ライブラリをプローブすることが含まれる。インビボでのタンパク質の相互作用を検出する一方法であるハイブリッドシステムについて、限定的にでなく、例示のみを目的に説明する。このシステムの一バージョンは公開されており（Chien, 他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9582, 1991年）、クローンテック社（米国カリフォルニア州パロアルト）から市販されている。簡潔に説明すると、このシステムの使用により、2つのハイブリッドタンパク質をコード化するプラスミドが構築される。その一方はNS4遺伝子産物に融合する転写活性タンパク質のDNA結合ドメインから構成されており、他方は、未知のタンパク質に融合する転写活性タンパク質の活性ドメインから構成されている。このとき、未知のタンパク質は、DNAライブラリの一部としてこのプラスミドに組換えされたcDNAによりコード化されている。DNA結合ドメイン融合プラスミドおよびcDNAライブラリは、転写活性対結合際とをその制御領域に含むリポーター遺伝子を有する酵母*Saccharomyces cerevisiae*種に形質転換される。いずれのハイブリッドタンパク質も単独でリポーター遺伝子の転写を活性化することはできない（DNA結合ドメインハイブリッドは活性機能を提供しないため。また、活性ドメインハイブリッドは活性因子の結合部位を局在化しないため）。2つのハイブリッドタンパク質が相互作用することにより、機能活性タンパク質が再構成され、リポーター遺伝子が発現するので、リポーター遺伝子をリポーター遺伝子産物のアッセイにより検出する。

### 【0314】

2 ハイブリッドシステムまたはそれに関連する方法論を使用して、「ベイト」遺伝子産物と相互作用するタンパク質について活性ドメインライブラリをスクリーニングしてもよい。限定的にではなく例示的に、NS4遺伝子産物をベイト遺伝子産物として使用することができる。ゲノムまたはcDNA配列の合計を活性ドメインをコード化するDNAに融合する。

### 【0315】

DNA結合ドメインに融合させたベイトNS4遺伝子産物のハイブリッドをコード化するプラスミドおよびこのライブラリを、酵母リポーター種に形質転換し、結果として得られた形質転換体をリポーター遺伝子を発現するものについてスクリーニングする。例えば、ベイトNS4遺伝子配列、例えばNS4遺伝子のオープンリーディングフレームをベクターにクローン化し、よってGAL4タンパク質のDNA結合ドメインをコード化するDNAにそのまま融合させることができる。これらコロニーを精製し、リポーター遺伝子発現を引き起こすライブラリプラスミドを単離する。次いでDNA配列を使用してライブラリプラスミドによりコード化されたタンパク質を同定する。

### 【0316】

ベイトNS4遺伝子産物と相互作用するタンパク質が検出される細胞系のcDNAライブラリは、当技術分野で常套的に実施される方法を使用して作成することができる。ここに開示する特定のシステムに従って、例えばcDNA断片をベクターに挿入し、よってGAL4の転写活性化ドメインにそのまま融合することができる。GAL4活性配列を含むプロモーターにより、このようなライブラリを、LacZ遺伝子を含む酵母種に、ベイトNS4遺伝子-GAL4融合プラスミドに沿って共形質変換することができる。

【0317】

cDNAコード化タンパク質は、ベイトNS4遺伝子産物と相互作用するGAL4転写活性化ドメインに融合されており、活性GAL4タンパク質を再構築し、それによりHIS3遺伝子の発現を得る。ヒスチジンを有さない半固体の寒天ベースの媒体を含むペトリ皿で成長させることにより、HIS3を発現するコロニーを検出することができる。

10

【0318】

次いで、このような種からcDNAを精製し、当技術分野の常套的技術を使用してベイトNS4遺伝子産物と相互作用するタンパク質を生成および単離する。

【0319】

(c) NS4遺伝子産物の巨大分子を阻害する化合物のアッセイ  
NS4遺伝子産物は、タンパク質などの巨大分子の1つまたは複数とインビボで相互作用することができる。例えば、NS4遺伝子産物は、NS4遺伝子産物とインビボで相互作用できる。NS4遺伝子産物と相互作用するその他の巨大分子は、核酸分子およびここに開示するような方法により同定されるタンパク質を含み、またそれらに限定されない。本明細書での説明において、巨大分子を「結合パートナー」と称する。結合パートナーに結合するNS4遺伝子産物を阻害する化合物は、NS4遺伝子産物、特に突然変異NS4遺伝子産物の活性を調節するのに有用な場合がある。このような化合物は、タンパク質などの分子を含み、またそれらに限定されない。

20

【0320】

NS4遺伝子産物と(1または複数の)結合パートナーとの相互作用を妨害する化合物の同定に使用されるアッセイシステムの基本方式は、NS4遺伝子産物と結合パートナーの反応混合物を、それら2要素が相互作用して結合するのに十分な時間と条件の下で調整し、それにより複合体を形成することを含む。化合物の抑制的活性を試験するために、反応混合物を試験化合物が存在する状態および存在しない状態で調製する。試験化合物は反応混合物に最初から含んでもよく、またはNS4遺伝子産物と結合パートナー添加後のある時点で加えてもよい。試験化合物が無い状態と、複合体の形成をブロックすることが知られている化合物の存在下で、対照反応混合物を培養する。その後、NS4遺伝子産物と結合パートナーとの間に形成されたいかなる複合体も検出する。対照の反応物に複合体が形成されたのに試験化合物を含む反応混合物に複合体が形成されていないことは、化合物がNS4遺伝子産物と結合パートナーとの相互作用を妨害したことを示す。また、試験化合物と正常なNS4遺伝子産物を含む反応混合物中に複合体が形成されていれば、試験化合物と突然変異NS4遺伝子産物を含む対照混合物中の複合物形成と比較する。この比較作業は、突然変異NS4遺伝子産物の相互作用を阻害したいが正常なNS4遺伝子産物の相互作用は阻害したくない場合、重要である。

30

40

【0321】

NS4遺伝子産物と結合パートナーとの相互作用を妨害する化合物のアッセイは、異質様式でも相同様式でも実施できる。異質アッセイには、NS4遺伝子産物または結合パートナーを固体の支持体に係留することと、反応の最後に固体の支持体上に形成された複合体を検出することを含む。相同アッセイでは、反応全体を液体相で実施する。いずれの方法でも、試験している化合物に関する異なる情報を得るために、反応物質の添加順序を変えることができる。例えば、NS4遺伝子産物と結合パートナーとの相互作用を(例えば競合により)妨害する試験化合物を、試験物質の存在下で、つまり、NS4遺伝子産物および相互作用細胞内結合パートナーの添加の前またはそれらと同時に試験物質を反応混合物に加え、反応させることにより、同定することができる。あるいは、予め形成されてい

50

た複合体を阻害する試験化合物、例えば複合体の成分の1つを置き換える結合定数のより大きい化合物を、複合体の形成後に反応混合物に試験化合物を加えることにより試験することができる。様々な様式を以下に簡潔に記載する。

【0322】

相同アッセイシステムでは、NS4 遺伝子産物または相互作用的結合パートナーを固体表面に係留する一方、係留しない方に直接的または間接的に標識する。実際には、従来的にマイクロタイプレートを使用する。係留した方を非共有接着または共有接着により固定化する。非共有接着は、単純に、固体表面をNS4 遺伝子産物または結合パートナーの溶液で被覆し、乾燥させることにより実施することができる。あるいは、係留しようとするものに特異的な固定化した抗体を使用して固体表面に係留することができる。表面は事前に調製して保存してもよい。

10

【0323】

アッセイを行うために、試験化合物を持つか、または持たない被覆表面に固定化する種のパートナーを曝す。反応完了後、反応しなかった成分を（例えば洗浄により）除去し、形成された複合体は固体表面に固定化されて残る。固体表面上に係留された複合体の検出は多くの方法で行うことができる。固定化しない種に事前に標識してある場合、表面上に固定化された標識が検出されるということは、複合体が形成されたことを意味する。固定化しない種に事前に標識していない場合、表面上に係留する複合体を検出するために間接的標識、例えば最初に固定化しない種に特異的な標識した抗体（抗体は標識した抗-Ig抗体で直接的または間接的に標識できる）を使用できる。反応成分の添加順序によって、複

20

【0324】

あるいは、試験化合物の存在下、または試験化合物が存在しない状態で、反応を液体相において実施し、反応産物を無反応成分から分離し、例えば、結合成分の一方に特異的な固定化した抗体を使用することにより溶液中に形成されたいかなる複合体をも係留し、また他方に特異的な標識した抗体を使用することにより係留した複合体を検出することにより、複合体を検出することができる。ここでも、液体相に反応物質を添加する順序によって、複合体の形成を抑制する試験化合物、または予め形成されていた複合体を阻害する試験化合物を同定することができる。

30

【0325】

本発明の別の実施形態では、相同アッセイを使用できる。この方法では、事前に形成されていたNS4 遺伝子産物と相互作用的結合パートナーの複合体を調節する際に、NS4 遺伝子産物、またはその結合パートナーに標識するが、標識により生じる信号は複合体形成により抑えられる（例えば、この方法をイムノアッセイに使用したRubensteinによる米国特許第4,109,496号を参照）。予め形成されていた複合体の成分と競合し、置換する試験物質を添加することにより、先述の信号が生成される。このようにして、NS4 遺伝子産物/結合パートナー相互作用を阻害する試験物質が同定される。

【0326】

本発明の別の実施形態では、一方または両方の完全長タンパク質の代わりに、NS4 遺伝子産物および/または結合パートナー（結合パートナーがタンパク質である場合）の結合ドメインに相当するペプチド断片を使用して、これらと同じ技術を採用する。結合部位の同定には、当技術分野で常套的に使われるいかなる方法も使用できる。これらの方法は、タンパク質の1つをコード化する遺伝子の突然変異生成、および免疫沈降アッセイにおける結合阻害のスクリーニングを含み、またそれらに限定されない。次いで、複合体の第2の成分をコード化する遺伝子の相補的突然変異を選択することができる。各タンパク質をコード化する遺伝子の配列分析により、相互作用的結合に関与するタンパク質の領域に対応する突然変異が明らかになる。あるいは、前セクションに記載の方法を使用して固体表面に1つのタンパク質に係留し、トリプシンなどのタンパク質分解性酵素で処理しておいたその結合パートナーと相互作用させ、さらに結合させることが可能である。洗浄後、結合

40

50

ドメインを含む、標識した短ペプチドが固体材料に関連して残余する場合があります、アミノ酸配列によりそれを同定することができる。また、セグメントをコード化する遺伝子を加工してタンパク質のペプチド断片を発現したら、結合活性について試験し、精製するか、または合成することができる。

#### 【0327】

限定的な意味ではなく、例示として挙げると、本セクションでは、GST-1融合タンパク質を作成し、それをグルタチオンアガロースのビーズに結合させることにより、上述のようにNS4遺伝子産物を子滞在に係留することができる。結合パートナーは<sup>3</sup><sup>5</sup>Sなどの放射活性アイソトープで標識することができ、トリプシンなどのタンパク質分解性酵素で分解することができる。次いで、係留したGST-1融合タンパク質に分解産物を加え、結合させることができる。結合しないペプチドを洗浄後、結合パートナーの結合ドメインを表す標識した結合物質を、周知の方法によりアミノ酸配列について、抽出、精製、および分析することができる。このようにして同定されたペプチドは、人工的に製造可能であるか、組換えDNA技術を使用して製造可能である。

10

#### 【0328】

(d) 体重異常の治療に有用な化合物を同定するためのアッセイ

先述したようなアッセイ技術により同定される結合化合物を含む、またそれに限定されない化合物を、体重異常の症状を治療する能力について試験することができる。ここに開示するアッセイは、NS4遺伝子発現に作用することにより、またはNS4遺伝子産物活性のレベルに作用することにより、NS4活性に影響する化合物を同定することができる。例えば、NS4遺伝子および/またはNS4遺伝子産物が含まれる経路の別の段階、例えばNS4遺伝子が媒介する経路の段階の「上流」または「下流」において、化合物を同定してもよい。このような化合物は、これと同じ経路に作用することにより、体重異常の進行に対するNS4の効果調節できる。このような化合物を障害の治療法の一部として使用することが可能である。

20

#### 【0329】

以下に記載するのは、体重異常症状を改善する能力を示す化合物を同定するための細胞ベースアッセイおよび動物アッセイである。まず、細胞ベースシステムを使用して体重異常の症状を改善する作用を有する化合物を同定することができる。このような細胞システムは、例えば、組換えまたは非組換え細胞、例えばNS4遺伝子を発現する細胞系を含む。

30

#### 【0330】

このような細胞システムを利用する際は、体重異常の症状を改善する能力を示すと思われる化合物にNS4を接触させる。その際、接触させる細胞においてそのような症状の改善が明らかになるのに十分な濃度および十分な時間で接触させる。接触後、細胞をアッセイし、例えばNS4 mRNA転写のための細胞ライセートをアッセイ（例えばノーザン分析により）することによりNS4遺伝子の発現の変化を測定する、または細胞が発現するNS4遺伝子産物を得ることができる。NS4遺伝子の発現を調節する化合物は治療薬として好ましい候補である。

#### 【0331】

これに加えて、哺乳類の体重異常の動物モデル、例えばヒトNS4遺伝子またはNS4遺伝子の変調型を含むトランスジェニックマウス、または動物に基づくシステムを使用して、この異常の症状を改善できる能力を有する化合物を同定することができる。薬物、製薬、治療法、介入の同定のために、このような動物モデルを試験物質として使用できる。例えば、体重異常の症状を改善する能力を示すと思われる化合物に動物モデルを接触させる。その際、接そのような症状の改善が明らかになるのに十分な濃度および十分な時間で接触させる。障害の症状の後退を評価することにより、接触に対する動物の反応をモニターしてもよい。

40

#### 【0332】

本発明では、体重異常様の症状のいずれかの面を後退させる任意の治療が、そのような障害のヒトの治療的行為の候補として考慮される。

50

## 【0333】

## (4) 体重異常の治療のための化合物および方法

肥満、悪液質、および摂食障害を含む体重異常を治療できる方法と化合物について以下に述べる。そのような方法には、例えば、哺乳類NS4遺伝子および/または哺乳類NS4遺伝子産物の合成または活性の発現を調節する化合物を投与することにより体重異常の症状を改善することが含まれる。あるいは、哺乳類の体重異常がNS4遺伝子突然変異に起因している場合は、そのような方法は、哺乳類に無傷のNS4遺伝子産物をコード化する核酸分子を供給し、それにより無傷のNS4遺伝子産物を発現させ、異常症状を改善することを含むことができる。NS4遺伝子突然変異に起因する哺乳類の体重異常の治療法の別の実施形態では、当方法は、無傷のNS4遺伝子産物をコード化する核酸分子を含む細胞を哺乳類に供給することにより、細胞に無傷のNS4遺伝子産物を発現させ、異常症状を改善することを含むことができる。

10

## 【0334】

あるいは、特定の体重異常、例えば、正常体重より低い体重を発現型として伴う悪液質、摂食障害の症状は、NS4遺伝子発現および/またはNS4遺伝子産物の活性を増大させることにより改善することができる。

## 【0335】

## (a) 抑制的アンチセンス、リボザイムおよび三重らせん法

別の実施形態では、体重異常の症状は、NS4遺伝子配列を周知のアンチセンス、「ノックアウト」遺伝子、リボザイムおよび/または三重らせん方法と組み合わせて使用し、NS4遺伝子発現のレベルを下げることにより、NS4遺伝子発現レベルおよび/またはNS4遺伝子産物活性レベルを低下させて、改善することができる。哺乳類の体重異常の症状を改善する能力を含め、NS4遺伝子の活性、発現または合成を調節する能力を示す化合物として、アンチセンス、リボザイム、および三重らせん分子を挙げることができる。無傷の、または適切であれば突然変異の標的遺伝子活性を、低下させる、または抑制するように、そのような分子を設計してもよい。そのような分子の生成および使用のための技術は当技術分野において周知である。

20

## 【0336】

アンチセンスRNAおよびDNA分子は、標的のmRNAにハイブリダイゼーションすることにより、およびタンパク質の転換を防止することにより、mRNAの転写を直接的にブロックするように作用する。アンチセンス法には、標的遺伝子RNAに相補的なオリゴヌクレオチドの設計が含まれる。アンチセンスヌクレオチドは、相補的標的遺伝子mRNA転写に結合し、転換を防止する。絶対的相補性は好ましいが、必須ではない。

30

## 【0337】

本明細書で言うRNAの一部に「相補的」な配列とは、RNAとハイブリダイズするのに十分に相補的で、安定したデュプレックスを形成する配列を意味する。二重鎖アンチセンスの場合、デュプレックスDNAの一本鎖はこのようにして試験される。またはトリプレックス形成をアッセイしてもよい。ハイブリダイゼーションの能力は、相補性の度合いと、アンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般に、ハイブリダイズする核酸が長い程、それに含まれるRNAにベースの不一致が多く、依然として安定したデュプレックス(または場合に応じてトリプレックス)を形成する。当業者であれば、標準的方法を使用してハイブリダイズした複合体の融点を決定することにより、不一致の許容範囲を確定することができる。

40

## 【0338】

一実施形態では、NS4遺伝子の非コード化領域に相補的なオリゴヌクレオチドをアンチセンス法に使用して、内因性NS4 mRNAの転換を抑制することができた。アンチセンス核酸は少なくとも6ヌクレオチド長でなければならず、好ましくは6から50ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドである。特定の態様では、オリゴヌクレオチドは少なくともヌクレオチドであり、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、または少なくとも50ヌクレオチドである。

50

## 【0339】

標的配列の選択にかかわらず、インビトロでの研究を初めに行い、アンチセンスヌクレオチドの遺伝子発現抑制を定量化することが好ましい。好ましくは、この研究では、アンチセンスの遺伝子抑制とオリゴヌクレオチドの非特異的生物学的効果との差異化のために対照群を使用する。また、この研究では、標的RNAまたはタンパク質のレベルを内部の対照RNAまたはタンパク質と比較することが好ましい。加えて、アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して得られた結果を対照ヌクレオチドと比較することが考えられる。好ましくは、対照ヌクレオチドは試験するオリゴヌクレオチドと概ね同じ長さであり、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列とアンチセンス配列との差異は、標的配列への特異的なハイブリダイゼーションを防ぐのに必要量を超えない。

10

## 【0340】

オリゴヌクレオチドは、DNA又はRNA又はそのキメラ混合物又は誘導体又は修飾された種類、一本鎖又は二本鎖であってもよい。オリゴヌクレオチドは塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格において、例えば、分子、ハイブリダイゼーションなどの安定性を改善するために修飾してもよい。オリゴヌクレオチドは、ペプチド（例えば、インビボにおいて、宿主細胞のレセプターを標的化するための）、又は細胞膜（例えば、Letsinger等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaitre等, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:648-652; PCT公報、W088/09810, 1988年12月15日発行を参照のこと）又は血管-脳関門（例えば、PCT公報、W089/10134, 1988年4月25日発行を参照のこと）輸送を促進する薬剤、ハイブリダイゼーション-トリガー切断剤（例えば、Krol等, 1988, BioTechniques 6:958-976を参照のこと）又はインターカレーティング剤（Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549）などの付加的な他の集団を含んでもよい。このために、オリゴヌクレオチドは他の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション-トリガー架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション-トリガー切断剤、などと結合してもよい。

20

30

40

## 【0341】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定はしないが、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルクエオシン、イノシン、NG-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(V)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(V)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)<sub>w</sub>、及び2,6-ジアミノプリンを含む集団から選択される少なくとも一つの修飾された塩基部分を含んでもよい。

## 【0342】

また、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定はしないが、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシルロース、及びヘキソースを含む集団から選択される少なくとも一つの修飾された糖部分を含んでもよい。あるいは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホラミドチオエート、ホスホラミデート、ホスホルジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル及びホルムアセタール又はその類似体から成る集団から選択される少なくとも一つの修飾されたリン酸骨格を含む。あるいはまた、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、-アノメリックオリゴヌクレオチドである。-アノメリックオリゴヌクレオチドは、相補的なRNAと特

50

異的な二重鎖ハイブリッドを形成するが、通常の -ユニットとは反対に、鎖は互いに平行に並ぶ (Gautier等, Nucl. Acids. Res. 15:6625-6641, 1987年)。オリゴヌクレオチドは2'-0-メチルリボヌクレオチド (Inoue等, Nucl. Acids Res. 15:6131-6148, 1987年)、又はキメラRNA-DNA類似体である (Inoue等, Febs Lett. 215:327-330, 1987年)。

#### 【0343】

本発明のオリゴヌクレオチドは当該技術分野において既知の標準的な方法、例えば、自動DNA合成機 (Biosearch, Applied Biosystems, などから購入できるような) の使用により合成してもよい。例えば、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Stein等の方法 (1988, Nucl. Acids Res. 16:3209) によって合成されてもよく、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、調整された孔のガラスポリマー支持体などを用いて調製することができる (Sarin 等, 1988, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 85:7448-7451)。

10

#### 【0344】

標的遺伝子コーディング領域の配列に相補的なアンチセンスヌクレオチドを使用することが可能であるが、転写された非翻訳領域に相補的であるものが最も好ましい。

#### 【0345】

アンチセンス分子をインビボで標的遺伝子を発現する細胞に供給する必要がある。アンチセンスDNAまたはRNAを細胞に供給する多くの方法がある。例えば、アンチセンス分子を組織部位に直接注することができる。あるいは、所望の細胞を標的とするように修飾したアンチセンス分子 (例えば、標的細胞表面上に発現した受容体または抗原に特異的に結合するペプチドまたは抗体に結合するアンチセンス) を全身投与することができる。

20

#### 【0346】

しかしながら、アンチセンスの細胞内濃度を内因性mRNAの翻訳を抑制するのに十分にするのは困難な場合が多い。したがって、好ましい方法では、強力なPol IIIまたはPol Iプロモーターの制御下でアンチセンスオリゴヌクレオチドが配置される組換えDNA構成を利用する。そのような構成を使用して標的細胞を患者に形質移入することにより、内因性の標的遺伝子の転写物と相補的な塩基対を形成し、よって標的遺伝子のmRNAの翻訳を防止する一本鎖RNAが、十分な量で転写される。例えば、細胞に摂取されてアンチセンスRNAの転写を誘導するようにベクターを導入することができる。そのようなベクターは、所望のアンチセンスRNAを精製するように転写できるものである限り、エピソームとして残るか、または染色体性に統合することができる。このようなベクターは、当技術分野において常套的な組換えDNA技術方法により構築可能である。ベクターは、哺乳類細胞における複製および発現に使用される、プラスミド、ウイルス性、またはその他当技術分野において既知のものでよい。アンチセンスRNAをコード化する配列は、当技術分野で哺乳類、好ましくはヒトの細胞に作用するとして知られる任意のプロモーターによって発現させることができる。このようなプロモーターは、誘導性でも構成性でもよい。このようなプロモーターは、SV40早期プロモーター領域 (BerntおよびChambon, Nature 290: 304-310, 1981年)、ラウス肉腫ウイルスの3末端反復配列に含まれるプロモーター (Yamamoto, 他, Cell 22: 787-797, 1980年)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner, 他, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445, 1981年)、メタロチオネイン遺伝子の制御配列 (Brinster, 他, Nature 296: 39-42, 1982年) などを含み、またこれらに限定されない。いかなる種類のプラスミド、コスミド、YACまたはウイルスベクターも、組織サイトに直接導入可能な組換えDNA構成の調製に使用できる。あるいは、所望の組織に選択的に感染するウイルスベクターを使用することができ、この場合別の経路による投与 (例えば全身投与) を行う。標的遺伝子のmRNA転写物を触媒分割するように設計されたりボザイム分子も、標的遺伝子のmRNAの翻訳を防止し、よって標的遺伝子産物の発現を防止するために使用することができる (例えば、1990年10月4日公開のPCT国際出願公開W090/11364; Sarver, 他, Science 247: 1222-1225, 1990年参照)。

30

40

#### 【0347】

50

リボザイムはRNAの特異的な切断を触媒することができる酵素的RNA分子である。(Rossi, *Current Biology* 4: 469-471 (1994)参照。リボザイム活性のメカニズムは、相補的標的RNAに対するリボザイム分子の配列特異的ハイブリッド形成、次いでヌクレオチド鎖切断を含む。リボザイム分子の組成物は標的遺伝子mRNAに相補的な一以上の配列を含み、mRNA切断ぬ応答可能な既知の触媒配列を含むはずである。この様な配列については米国特許第5,093,246号を参照のこと。この文献は開示によってここにその全体を取り込むものとする。

**【0348】**

特異的な認識部位でmRNAを切断するリボザイムは標的遺伝子mRNAを破壊するために使用可能であるが、ハンマーヘッドリボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッドリボザイムは、標的mRNAと相補的な塩基対を形成する隣接領域によって決定される位置でmRNAを切断する。唯一の条件は、標的mRNAは以下の2塩基配列：5'-UG-3'を持つことである。ハンマーヘッドリボザイムの構築及び生産は当該技術分野においてよく知られており、その全体としてここに文献により取り込まれているMyers, 1995, *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, New York, (特に、833ページの図4を参照のこと(1995)、並びにHaseloff及びGerlach, 1988, *Nature*, 334:585-591 (1988)により詳細に記載されている。

10

**【0349】**

好ましくはリボザイムは、切断認識部位が標的遺伝子mRNAの5'末端近くに位置するように、即ち、効率を増大し、非機能的なmRNA転写の細胞内蓄積を最小にするために加工される。

20

**【0350】**

また、本発明のリボザイムは、テトラヒメナサーモフィラ(IVS、又はL-19 IVSRNAとして知られる)中で天然に産生され、Thomas Cech及び共同研究者(Zaug等, 1984, *Science*, 224:574-578; Zaug及びCech, 1986, *Science*, 231:470-475; Zaug等, 1986, *Nature*, 324:429-433; University Patents Inc.による、公開された国際特許出願番号W088/04300; Been及びCech, 1986, *Cell*, 47:207-216)により広範に記述されてきたRNAエンドリボヌクレアーゼ(「Cech-タイプリボザイム」と後述される)も含む。Cech-タイプリボザイムは、標的RNA配列とハイブリダイズした後、標的RNAの切断が生じる8塩基対の活性部位を持つ。本発明は標的遺伝子中に存在する8塩基対の活性配列を標的とするこれらCech-タイプリボザイムを包含する。

30

**【0351】**

アンチセンスのアプローチにおいて、リボザイムは、修飾されたオリゴヌクレオチド(例えば、改善された安定、標的化などのために)で構成され、インピボで標的遺伝子を発現する細胞へ送達される。送達の好ましい方法は、形質移入された細胞が、内在性の標的遺伝子メッセージを破壊し、翻訳を阻害するのに十分な量のリボザイムを生産するように、強力で構成的なpol III又はpol IIプロモーターのコントロール下において、リボザイムを「コードする」DNAコンストラクトを用いることを含む。アンチセンス分子とは異なり、リボザイムは触媒的であるため、低い細胞内濃度が効率化のために要求される。

**【0352】**

内因性標的遺伝子の発現は、標的とする相同性組換えを使用して、標的遺伝子、またはそのプロモーターを非活性化、または「ロックアウト」することによっても減少させることができる(例えば、Smithies他、*Nature* 317: 230-234, 1985年; ThomasおよびCapecchi, *Cell* 51: 503-512, 1987年; Thompson他、*Cell* 5: 313-321, 1989年参照)。例えば、内因性標的遺伝子に相同性のDNAによってはさまれた非機能的標的遺伝子(標的遺伝子のコード化領域または制御領域)である突然変異を、選択可能マーカーおよび/または非選択可能マーカーと共に、またはそれら無しで使用し、インピボで標的遺伝子を発現する細胞を形質移入することができる。標的とする相同性組換えによるDNA構成の挿入により、標的遺伝子は非活性化される。このようなアプローチは、ES(胚幹)細胞の修飾を使用することにより非活性標的遺伝子を持つ動物子孫を産むことが可能な農業の分野に特に

40

50

適している（例えば、ThomasおよびCapecchi, 1987年、およびThompson, 1989年、上掲を参照）。しかしながら、適切なウイルスベクターを使用して組換えDNA構成が所望のインビボサイトに直接投与されるか、または向けられるのであれば、このアプローチをヒトに使用することも可能である。

**【0353】**

あるいは、標的遺伝子の制御領域（つまり、標的遺伝子プロモーターおよび/またはエンハンサー）に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列を標的し、体内の標的細胞中の標的遺伝子の転写を防ぐ三重らせん構造を形成することによっても、内因性標的遺伝子の発現を減少させることができる（概論は、Helene, *Anticancer Drug Des.*, 6(6): 569-584, 1991年; Helene他, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:27-36, 1992年; およびMaher, *Bioassays* 14(12): 807-815, 1992年を参照）。

10

**【0354】**

転写防止のための三重らせん形成に使用される核酸分子は、一本鎖であり、且つデオキシヌクレオチドからなるものでなければならない。これらオリゴヌクレオチドの塩基組成は、H o o g s t e e n 塩基対合則により三重らせん形成を促進するように設計される必要がある。この対合則は、一般に、二重鎖のうち的一本に存在するために、プリンまたはピリミジンの大きな伸張を必要とする。ヌクレオチド配列は、結果として得られる三重らせんに関連する3つの鎖に亘りT A T およびC G C<sup>+</sup>を生じるピリミジン塩基でよい。高濃度のピリミジンを含む分子は、高プリン濃度を有する二重鎖のうち的一本鎖の領域に相補的な塩基を提供する。加えて、プリンの濃度が高い、例えばG残基の伸張を有する核酸分子を選択することができる。これら分子は、G C 対の豊富なDNAデュプレックスを有する三重らせんを形成する。このような三重らせんでは、プリン残基の多くは標的デュプレックスの一本鎖に位置し、よってトリプレックスの3つの鎖にG G Cトリプレットが生じる。

20

**【0355】**

あるいは、三重らせん形成のために標的とされる可能性のある配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を創造することにより増加させることができる。スイッチバック分子は、5' - 3'、3' - 5'を交互に行うことにより合成され、その結果、それらの塩基対は、最初はデュプレックスの一方を有し、次は他方を有することになり、デュプレックスの一本鎖に存在するためにプリンまたはピリミジンの伸張を必要とすることは無くなる。

30

**【0356】**

突然変異遺伝子発現を抑制するために、アンチセンス、リボザイム、および/または三重らせん分子を利用する技術は、正常な標的遺伝子の対立遺伝子により生成されるmRNAの転写（三重らせん）および/または翻訳（アンチセンス、リボザイム）を非常に効率よく低減または抑制できるので、存在する正常標的遺伝子産物の濃度を正常表現型に必要な量よりも低くできるという可能性が生じる。したがって、このような場合、遺伝子活性の正常レベルを確実に維持するために、以下に記載するような、使用されるアンチセンス、リボザイム、または三重らせんの影響を受ける配列を含まない遺伝子療法により、正常な標的遺伝子の活性を示す標的遺伝子のポリペプチドをコード化および発現する核酸分子を細胞に導入してもよい。あるいは、標的遺伝子が細胞外タンパク質をコード化する場合、標的遺伝子活性に必須のレベルを維持するために、正常標的遺伝子タンパク質を同時投与することが好ましい。

40

**【0357】**

本発明のアンチセンスRNAおよびDNA、リボザイム、および三重らせん分子は、上述のように、当技術分野で知られているいずれのDNAおよびRNA分子の合成方法によっても調製できる。これらには、当業界分野において周知の、オリゴデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオチドを化学的に合成するための技術、例えば固体相ホスホラミダイト化学合成などを含む。あるいは、アンチセンスRNA分子をコード化するDNA配列のインビトロおよびインビボ転写によりRNA分子を生成してもよい。そのようなDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適切なRNAポリメラ

50

ーゼプロモーターを含む多種多様なベクターに包含される。あるいは、使用するプロモーターに応じて、アンチセンスRNAを構成的または誘導的に合成するアンチセンスcDNA構成を細胞系に適切に導入することが可能である。

【0358】

(b) 遺伝子置換療法

ここに開示するNS4遺伝子核酸を、肥満、悪液質および摂食障害を含む哺乳類体重異常の治療に利用することができる。そのような治療は遺伝子置換療法の形態を取ることができる。特に、正常なNS4遺伝子機能を示すNS4遺伝子産物の生成を促す正常NS4遺伝子またはNS4遺伝子の一部の1以上の複写を、それらに限定されないが、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レトロウイルスベクター、ならびに細胞内へDNAを導入するリポゾームなどのその他分子を含むベクターを使用して、患者の適切な細胞に挿入することができる。

10

【0359】

NS4遺伝子は脳内に発現するので、このような遺伝子置換療法技術は、患者のこのような種類の細胞にNS4遺伝子配列を供給することができる。このように、一実施形態では、当技術分野において周知の技術(例えば、1988年4月25日公開のPCT出願公開W089/10134を参照)を使用して、NS4遺伝子配列が血液脳関門を通過し、配列を脳内細胞に供給することができる。血液脳関門を通過することができる供給に関しては、例えば上述のようなウイルスベクターが好ましい。

【0360】

別の実施形態では、供給のための技術は、NS4遺伝子配列が発現する細胞のサイトにこのようなNS4遺伝子配列を直接投与することを伴う。

20

【0361】

NS4遺伝子発現および/またはNS4遺伝子産物活性の全体的レベルを上昇させるために使用できるその他の方法には、異質DNA制御エレメントを挿入し、挿入した制御エレメントが問題の内因性NS4遺伝子と作用的にリンクすることにより、細胞または微生物内の内因性NS4遺伝子の発現の特徴を修正するため、標的相同性組換え方法を使用することを含む。このように、標的とする相同組換えは、「転写的に沈黙の」(つまり、通常は発現しない)内因性NS4遺伝子の転写を活性化するため、または通常発現する内因性NS4遺伝子の発現を亢進するために使用される。

30

【0362】

さらに、適切なNS4発現細胞、好ましくは自己細胞を、体重異常の症状を改善するのに十分な位置および数で、患者に導入することにより、NS4遺伝子発現および/またはNS4遺伝子産物活性の全体的なレベルを上昇させることができる。このような細胞は組換え細胞でもそうでなくともよい。

【0363】

患者のNS4遺伝子発現の全体的なレベルを上昇させるために投与できる細胞には、NS4遺伝子が発現する正常細胞、好ましくは脳細胞がある。あるいは、細胞、好ましくは自己細胞をNS4遺伝子配列を発現するように加工し、それを体重異常の症状の改善に好ましい位置で患者に導入することができる。あるいは、無傷のNS4遺伝子が発現するMHC一致個体由来の細胞を利用することができ、それは例えば脳細胞を含む。NS4遺伝子配列の発現は、適切な遺伝子の制御配列によって管理することにより、必要な細胞型で発現させることができる。このような遺伝子制御配列は当業者に周知である。このような細胞ベース遺伝子療法技術は当技術分野で周知である(例えば米国特許第5,399,349号参照)。非自己細胞に細胞を投与するとき、投与には、導入する細胞に対する宿主の免疫反応を防ぐ周知の技術を使用することができる。例えば、細胞外環境との直接的な成分交換が可能である一方、導入細胞が宿主の免疫系に認識されることのない密封形式で細胞を導入することができる。

40

【0364】

加えて、本明細書に開示する技術により同定されるような、NS4遺伝子産物の活性を変

50

調させることができる化合物は、当技術分野において周知の標準的技術を使用して投与することもできる。投与される化合物が脳細胞との相互作用を伴う場合には、投与技術は、血液脳関門を通過させる周知の技術を含む。

【0365】

本明細書中で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

【0366】

実施例で言及されている全ての市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニアである。

10

【実施例1】

【0367】

ヒトNS4をコードするcDNAクローンの単離(DNA149986-2883およびDNA1449995-2871)(シグナル配列を持たない)OPGリガンドをコードする配列(アミノ酸69-317; Anderson他、Nature, 390: 175, 1997年)を、配列データベースの検索に使用した。データベースは、公的データベース(例えば、GenBank)含んでいた。検索は、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2[Altschul他、Methods in Enzymology, 266: 460-480, 1996年]を使用して行われ、その結果ゲノム配列(AC010969)が同定された。このゲノムDNA配列を、スタンフォード大学からライセンスされた遺伝子予測プログラムGENSCANを用いて分析した。GENSCAN分析は、潜在的なオープンリーディングフレームを持つDNA配列を作成する遺伝子のコーディング領域を予測する。ゲノムDNA配列AC010969のヌクレオチド64070-64243に対する一致を示すコンセンサスDNA配列を構築した(DNA143746)。翻訳されたリーディングフレームにおいて、DNA143746は、OPGリガンドに対して約60%のアミノ酸配列の同一性を示す57の接在残基の領域を含む。

20

【0368】

コンセンサス配列に基づき、1)PCRにより対象とする配列を含むcDNAライブラリを同定するため、及び2)PROの全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして用いるためにオリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000 bp長のPCR産物を与えるために設計される。プローブ配列は、典型的に40-55bp長である。幾つかの場合には、コンセンサス配列が約1-1.5kbpより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology, 上掲のように、PCRプライマー対でのPCR増幅によりスクリーニングした。ポジティブライブラリを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象とする遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

30

【0369】

PCRプライマー(正方向と逆方向)を合成した:

正方向PCRプライマー 5'-GATTGGGCAAACGTCTCCAACATGACT-3' (配列番号: 7)

逆方向PCRプライマー 5'-TTGGTCATGTTTCCAAGAAGAAAGACTCGT-3' (配列番号: 8)。

40

【0370】

更に、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを次のヌクレオチド配列を有するコンセンサスDNA144306配列から構築した:

ハイブリダイゼーションプローブ 5'-CAGCAACGGAAAACCTAAGAGTCAAAGGCATTTATTACCGGAATGCCGACATTTGCTCTCGA-3' (配列番号: 9)。

【0371】

DNA149986-2883 (配列番号2) およびDNA149995 (配列番号3)

50

の単離に用いた cDNA ライブラリの構築のための RNA をヒト致死組織から単離した。50 の異なるヒト cDNA ライブラリーをプールし、DNA 146649 - 1789R1 のクローニングに使用した。cDNA クローンの単離に用いた cDNA ライブラリは、Invitrogen, San Diego, CA からのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって構築した。cDNA は、NotI 部位を含むオリゴdT でプライムし、平滑末端で SalI ヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotI で切断し、ゲル電気泳動で適切にサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター (pRK5B 又は pRK5D 等; pRK5B は SfiI 部位を含まない pRK5D の前駆体である; Holmes 等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照) に、独特の XhoI 及び NotI 部位において、所定の方向でクローニングした。

**【0372】**

10

上記のようにして単離されたクローンの DNA 配列決定は、完全長ポリペプチド PRO19652、PRO19816 および PRO19650 をそれぞれコード化する、完全長 DNA 配列 DNA 146649 - 1789R1 (配列番号 1)、DNA 149986 - 2883 (配列番号 2) および DNA 149995 - 2871 (配列番号 3) を提供する。

**【0373】**

こうして同定された全長クローンは、ヌクレオチド位置 486 - 488 に明確な翻訳開始部位を有する一つのオープンリーディングフレームを、および、ヌクレオチド位置 747 - 749 に停止シグナルを含んでいた (図 1、配列番号: 1)。予想されるポリペプチド前駆体は、87 アミノ酸長であり、およそ 9958 ダルトンの算定分子量及びおよそ 9.70 の推定 pI を有する。クローン DNA 149986 - 2883 は、ヌクレオチド位置 1784 - 1786 に明らかな翻訳開始部位を有する一つのオープンリーディングフレームを、およびヌクレオチド位置 2069 - 2071 に停止シグナルを含んでいた (図 2; 配列番号: 2)。予想されるポリペプチド前駆体は 95 アミノ酸長であり、およそ 10734 ダルトンの算定分子量およびおよそ 10.00 の推定 pI を有する。クローン DNA 149995 - 2871 は、ヌクレオチド位置 447 - 449 に明らかな翻訳開始部位を有する一つのオープンリーディングフレームを、およびヌクレオチド位置 732 - 734 に停止シグナルを含んでいた (図 3; 配列番号: 3)。予想されるポリペプチド前駆体は 95 アミノ酸長であり、およそ 10704 ダルトンの算定分子量およびおよそ 10.00 の推定 pI を有する。

20

**【0374】**

30

図 4 (a)、4 (b) および 4 (c) それぞれ配列番号 4、5 および 6) に示される完全長ポリペプチド配列の分析により、様々な重要ポリペプチドドメインの存在が図 4 (a)、4 (b) および 4 (c) に示すように明らかであり、それら重要ポリペプチド領域の位置は概ね上述の通りである。

**【0375】**

PRO19650 ポリペプチドと PRO19816 ポリペプチドのアミノ酸配列は、アミノ酸位 5 を除いて同一であり、PRO19650 のアミノ酸位 5 はスレオニンが、PRO19816 の同アミノ酸位はメチオニンが、それぞれ占めている。アミノ酸配列 PRO19652 は、PRO19650 の短縮型変異体として現われ、該変異体は C 末端が短く、残余する 3 C 末端残基が異なっている。ポリペプチドの比較を図 6 に示す。

40

**【0376】**

クローン DNA 146649 - 1789R1、DNA 149995 - 2871 および DNA 149986 - 2883 は、2001 年 5 月 15 日、2000 年 5 月 31 日、および 2000 年 4 月 4 日にそれぞれ ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 PTA3376、PTA1971 および PTA1627 をそれぞれ割り振られている。

**【実施例 2】****【0377】**

ハイブリダーゼーションプローブとしての NS4 の使用

以下の方法は、ハイブリダイゼーションプローブとしての SRT をコードするヌクレオチド配列の使用について記述する。

50

## 【0378】

完全長又は成熟SRTのコード化配列を含むDNAは、ヒト組織cDNAライブラリー又はヒト組織ゲノムライブラリー中において相同なDNA（SRTの天然に生じる変異体をコードするものなど）に関しスクリーニングするためのプローブとして用いられる。

## 【0379】

いずれかのライブラリーDNAを含むフィルターのハイブリダイゼーション及び洗浄は、以下の高い緊縮性の条件下にて実施される。放射性標識化SRT由来のプローブのフィルターに対するハイブリダイゼーションは、50%ホルムアミド、5x SSC、0.1% SDS、0.1% ピロリン酸ナトリウム、50mM リン酸ナトリウム、pH 6.8、2x デンハード溶液及び10% 硫酸デキストランの溶液中、42℃で20時間実施される。フィルターの洗浄は0.1x SSC及び0.1% SDSの水溶液中にて42℃で実施される。

## 【0380】

全長天然配列SRTをコードするDNAと望ましい配列同一性を有するDNAは、その後、当該分野で既知の標準的な技術を用いて同定された。

## 【0381】

標準的ノーザンブロッティング技術（クローンテック社）を使用して、DNA 146649-1789R1（配列番号1）が図7（a）、7（b）および7（c）に報告されているような様々な組織、および図7（d）に報告されているような様々な腫瘍細胞系に、発現を示すことが分かった。

## 【実施例3】

## 【0382】

大腸菌におけるNS4の発現

この実施例は、大腸菌中における組み換え発現によるNS4の非グリコシル化型の調製を例証する。

## 【0383】

NS4をコードするDNA配列は選択されたPCRプライマーを利用して最初に増幅される。このプライマーは、選択された発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含まなければならない。様々な発現ベクターを使用することができる。適したベクターの例としては、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性に対する遺伝子を含むpBR322（大腸菌由来；Bolivarら，Gene，2:95（1977）を参照のこと）がある。ベクターは制限酵素によって消化され、脱リン酸化される。次いで、PCR増幅配列がベクターにライゲーションされる。ベクターは好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、ポリhisリーダー（最初の6つのSTIIコドン、ポリhis配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、NS4コード化領域、ラムダ転写集結因子及びargU遺伝子をコードする配列を含む。

## 【0384】

次いで、Sambrookら，上掲に記載されている方法を用いて選択された大腸菌株を形質転換するために、このライゲーション混合物を利用した。形質転換体をLBプレート上でのその増殖能力によって同定し、次いで抗生物質耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを単離し、それを制限酵素分析及びDNA配列決定によって確認することができる。

## 【0385】

選択されたクローンを、抗生物質が補填されたLBブロスのような液体培地で一晩かけて増殖させることができる。この一晩の培養を、引き続きより大きなスケールでの培養を播種するために使用してもよい。細胞を所望の光学密度になるまで増殖させると、その間に発現プロモーターが作用し始める。

## 【0386】

更に数時間、細胞を培養した後に、遠心分離によって細胞を収集することが可能である。遠心分離によって得られた細胞ペレットは、当該分野で公知の様々な薬剤を使用して可溶化でき、次いで、この溶解したNS4タンパク質を、タンパク質の堅固な結合を可能にする条件下において金属キレート化カラムを用いて精製すること可能である。

## 【0387】

10

20

30

40

50

以下の手法を用いて、ポリ-Hisタグ形態でNS4を大腸菌で発現させてもよい。NS4をコードするDNAを選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅した。このプライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いで、PCR増幅されたポリ-Hisタグ配列を発現ベクターへ結合させ、これを株52(W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq))に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。形質転換体を、最初に50mg/mlのカルベニシリンを含有するLB中で、30 で振盪しながら3-5のO.D.600に達するまで増殖させた。ついで培養液をCRAP培地(3.57gの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H<sub>2</sub>O、1.07gのKCl、5.36gのDifco酵母抽出物、500mL水中の5.36gのSheffield hycase SF、並びに110mMのMPOS、pH7.3、0.55%(w/v)のグルコース及び7mMのMgSO<sub>4</sub>の混合で調製)中にて50-100倍希釈し、30 で振盪によって約20-30時間増殖させた。SDS-PAGE分析により発現を確認するために試料を取り出し、細胞がペレットとなるようにバルク培地を遠心分離した。精製及びリフォールディングまで、細胞ペレットを凍結させた。

10

20

40

#### 【0388】

0.5から1Lの発酵(6-10gペレット)からの大腸菌ペーストを、7Mのグアニジン、20mMのトリス、pH8バッファー中で10容量(w/v)で再懸濁させた。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々0.1M及び0.02Mとし、溶液を4 で終夜攪拌した。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸によりブロックされた変性タンパク質が生じる。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で40,000rpmで30分間濃縮した。上清を金属キレートカラムバッファー(6Mのグアニジン、20mMのトリス、pH7.4)の3-5容量で希釈し、透明にするために0.22ミクロンフィルターを通して濾過した。透明抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた5mlのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに充填した。カラムを50mMのイミダゾール(Calbiochem, Utrol grade)を含む更なるバッファー、pH7.4で洗浄した。タンパク質を250mMのイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、4 で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて280nmにおけるその吸収により見積もった。

#### 【0389】

試料を20mMのトリス、pH8.6、0.3MのNaCl、2.5Mの尿素、5mMのシステイン、20mMのグリシン及び1mMのEDTAからなる新たに調製した再生バッファー中で徐々に希釈することによって、タンパク質を再生させた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50から100マイクログラム/mlとなるように選択した。リフォールディング溶液を4 で12-36時間ゆっくり攪拌した。リフォールディング反応はTFAを最終濃度0.4%(約3のpH)で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度2-10%で添加した。再生したタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、0.1%TFAの移動バッファーと10から80%のアセトニトリル勾配での溶離を行うことでクロマトグラフにかけた。A280吸収を持つ画分のアリコートをしてSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再生タンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どの正しく再生したタンパク質形態は、これらの形態が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って折り畳まれたタンパク質を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドキシンも除去する。

#### 【0390】

所望する折り畳みのNS4ポリペプチドを含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去した。タンパク質を、透析又は調製バッファーで平衡化したG25 Superfine(Pharmacia)樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、0.14Mの塩化ナトリウム及び4%のマンニトールを含む20mMのHepes、pH6.8に調製した。

#### 【実施例4】

50

## 【0391】

哺乳動物細胞におけるNS4の発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組み換え発現による潜在的にグリコシル化した形態のNS4の調製を例証する。

## 【0392】

発現ベクターとしてベクターpRK5(1989年3月15日公開のEP307,247参照)を用いた。場合によっては、NS4 DNAを選択した制限酵素を持つpRK5に結合させ、上記のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてNS4 DNAを挿入させる。得られたベクターは、pRK5-NS4と呼ばれる。

## 【0393】

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞でもよい。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び/又は抗生物質を添加したDMEMなどの培地中で組織培養プレートにおいて増殖させて集密化した。約10 $\mu$ gのpRK5-NS4 DNAを約1 $\mu$ gのVARNA遺伝子コード化DNA[Thimmappayaら, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500 $\mu$ lの1mM トリス-HCl、0.1mM EDTA、0.227M CaCl<sub>2</sub>に溶解させた。この混合物に、500 $\mu$ lの50mM HEPES(pH7.35)、280mM NaCl、1.5mM NaPO<sub>4</sub>を一滴ずつ添加し、25 $^{\circ}$ Cで10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、293細胞に加えて37 $^{\circ}$ Cで約4時間定着させた。培地を吸引し、2mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加した。293細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。

## 【0394】

形質移入の約24時間後、培地を除去し、培地(のみ)又は200 $\mu$ Ci/ml<sup>35</sup>S-システイン及び200 $\mu$ Ci/ml<sup>35</sup>S-メチオニンを含む培地で置換した。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15%SDSゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、NS4ポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地に、更なるインキュベーションを施し(無血清培地で)、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

## 【0395】

これに代わる技術において、NS4は、Sompanyracら, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞に一過的に導入される。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで増殖させ、700 $\mu$ gのpRK5-NS4 DNAを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄した。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培地で洗浄し、組織培地、5 $\mu$ g/mlウシインシュリン及び0.1 $\mu$ g/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現されたNS4を含む試料を濃縮し、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。

## 【0396】

他の実施態様では、NS4をCHO細胞で発現させることができる。pRK5-NS4は、CaPO<sub>4</sub>又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地(のみ)又は<sup>35</sup>S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。NS4ポリペプチドの存在を同定した後、培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現されたNS4を含む培地を濃縮して、任意の選択した方法によって精製することができる。

## 【0397】

また、エピトープタグNS4は、宿主CHO細胞において発現させてもよい。NS4はpRK5ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローン挿入物は、PCRを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-hisタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-hisタグNS4挿入物は、次いで、安定なクローンの選択のためのDHFR等の

10

20

30

40

50

選択マーカーを含むSV40誘導ベクターにサブクロニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで(上記のように)形質移入できる。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-hisタグNS4を含む培地は、次いで濃縮し、 $Ni^{2+}$ -キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

**【0398】**

またNS4は、一過性発現法によりCHO及び/又はCOS細胞で、あるいは他の安定な発現方法によりCHO細胞で発現させてもよい。

**【0399】**

CHO細胞における安定な発現は以下の方法を用いて実施された。タンパク質は、それぞれのタンパク質の可溶化形態のコーディング配列(例えば、細胞外ドメイン)がIgG1のヒンジ、CH2及びCH2ドメインを含む定常領域配列に融合した、及び/又はポリ-Hisタグ形態である、IgG構築物(イムノアドヘシン)として発現された。

10

**【0400】**

PCR増幅に続いて、各DNAを、Ausubelら, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてCHO発現ベクターにサブクロニングした。CHO発現ベクターは、対象とするDNAの5'及び3'に適合する制限部位を有し、cDNAの便利なシャトル化ができるように構築される。ベクターは、Lucasら, Nucl. Acids Res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにCHO細胞での発現を用い、対象とするcDNA及びジヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)の発現の制御にSV40初期プロモーター/エンハンサーを用いる。DHFR発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

20

**【0401】**

所望のプラスミドDNAの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect(登録商標)(Qiagen), Dospoer(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim)約1千万のCHO細胞に導入する。細胞は、上記のLucas等に記載されているように増殖させた。約 $3 \times 10^7$ 細胞を、下記のような更なる増殖及び生産のためにアンプル中で凍結させた。

**【0402】**

プラスミドDNAを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合した。内容物を10mLの媒質を含む遠心管にピペットして、1000rpmで5分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を10mLの選択培地(0.2 $\mu$ m濾過PS20、5%の0.2 $\mu$ m透析濾過ウシ胎児血清を添加)中に懸濁させた。次いで細胞を90mLの選択培地を含む100mLスピナーに分ける。1-2日後、細胞を150mLの選択培地を満たした250mLスピナーに移し、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートする。さらに2-3日後、250mL、500mL及び2000mLのスピナーを $3 \times 10^5$ 細胞/mLで播種した。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させた。任意の適切なCHO培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5,122,469号に記載された生産培地を使用した。3Lの生産スピナーを $1.2 \times 10^6$ 細胞/mLで播種した。0日目に、細胞数とpHを測定した。1日目に、スピナーをサンプルし、濾過空気での散布を実施した。2日目に、スピナーをサンプルし、温度を33 $^{\circ}$ Cに変え、30mLの500g/Lのグルコース及び0.6mLの10%消泡剤(例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)をとった。生産を通して、pHは7.2近傍に調節し維持した。10日後、又は生存率が70%を下回るまで、細胞培地を遠心分離で回収して0.22 $\mu$ mフィルターを通して濾過した。濾過物は、4 $^{\circ}$ Cで貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

30

40

**【0403】**

ポリ-Hisタグ作成物について、タンパク質はNi-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes, pH7.4バッファーで平衡化した6mLのNi-NTAカラムへ4-5ml/分の流速によって4 $^{\circ}$ Cでポンプ供給した。充填後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのHepes、0.14MのNaCl及び4%のマンニトール、pH6.8を含む貯蔵バッファー中で25mLのG25 Superfine(Pharmacia)を用いて脱塩し、-

50

80 で貯蔵した。

【0404】

イムノアドヘシン (Fc含有) 作成物を、以下の通りに条件培地から精製した。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH6.8で平衡化した5mlのプロテインAカラム (Pharmacia) へポンプ注入した。充填後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100mMのクエン酸、pH3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1mlの画分を275 $\mu$ Lの1Mトリスバッファー、pH9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Hisタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。均一性はSDSポリアクリルアミドゲルとエドマン (Edman) 分解によるN-末端アミノ酸配列決定により評価した。

10

【実施例5】

【0405】

酵母菌でのNS4の発現

以下の方法は、酵母菌中でのNS4の組換え発現を記載する。

第1に、ADH2/GAPDHプロモーターからのNS4の細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。NS4をコードするDNA及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してNS4の細胞内発現を指示する。分泌のために、NS4をコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然NS4シグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌因子又はインペルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば)NS4の発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

20

【0406】

酵母菌株AB110などの酵母菌株は、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、10%トリクロロ酢酸での沈降及びSDS-PAGEによる分離で分析し、次いでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

【0407】

続いて組換えNS4は、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。NS4を含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

30

【実施例6】

【0408】

バキュロウイルス感染昆虫細胞でのNS4の発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるNS4の組換え発現を記載する。

【0409】

NS4をコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-hisタグ及び免疫グロブリンタグ (IgGのFc領域など) を含む。pVL1393 (Novagen) などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、NS4又はNS4コード配列の所定部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列などが、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅される。5'プライマーは、隣接する(選択された)制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

40

【0410】

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold(商品名)ウイルスDNA (Pharmlngen) を、Spodoptera frugiperda (「Sf9」) 細胞 (ATCC CRL 1711) 中にリポフェクチン (GIBCO-BRLから市販) を用いて同時形質移入することにより作成される。28

50

で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilleyら, *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

#### 【0411】

次に、発現されたポリ-hisタグNS4は、例えばNi<sup>2+</sup>-キレートアフィニティークロマトグラフィーにより次のように精製される。抽出物は、Rupertら, *Nature*, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えSf9細胞から調製した。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25mLのHepes, pH7.9; 12.5mMのMgCl<sub>2</sub>; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKCl)中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を充填バッファー(50mMリン酸塩、300mMのNaCl、10%グリセロール、pH7.8)で50倍希釈し、0.45μmフィルターで濾過した。Ni<sup>2+</sup>-NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)を5mLの総容積で調製し、25mLの水で洗浄し、25mLの充填バッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5mLでカラムに充填した。カラムを、分画回収が始まる点であるA<sub>280</sub>のベースラインまで充填バッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー(50mMリン酸塩; 300mMのNaCl、10%グリセロール、pH6.0)で洗浄した。A<sub>280</sub>のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500mMイミダゾール勾配で展開した。1mLの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)に複合したNi<sup>2+</sup>-NTAでのウェスタンブロットで分析した。溶離したHis<sub>10</sub>-タグNS4を含む画分をプールして充填バッファーで透析した。

10

20

#### 【0412】

あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)NS4の精製は、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

#### 【実施例7】

#### 【0413】

NS4に結合する抗体の調製

この実施例は、NS4に特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上記のGodingに記載されている。用いられ得る免疫原は、精製NS4、NS4を含む融合タンパク質、細胞表面に組換えNS4を発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくすることができる。

30

#### 【0414】

Balb/c等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムで注入したNS4免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, ハミルトン, モンタナ)に乳化し、動物の後フットパッドに注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで10から12日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗NS4抗体の検出のためのエライザアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

40

#### 【0415】

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ(陽性)」な動物に、NS4静脈内注射の最後の注入をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)、ATCCから番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU.1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

50

## 【0416】

ハイブリドーマ細胞は、NS4に対する反応性についてのエライザでスクリーニングされる。NS4に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ（陽性）」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

## 【0417】

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のBalb/cマウスに腹腔内注入し、抗NS4モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで増殖させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

10

## 【実施例8】

## 【0418】

特異的抗体を用いたNS4ポリペプチドの精製

天然又は組換えNS4ポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタンパク質精製方法によって精製できる。例えば、pro-NS4ポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はpre-NS4ポリペプチドは、対象とするNS4ポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗NS4ポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作成される。

## 【0419】

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテインA（Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.）での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテインAでのクロマトグラフィーによりマウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、CnBr-活性化セファロース（商品名）（Pharmacia LKB Biotechnology）等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合される。抗体が樹脂に結合され、樹脂がブロックされ、誘導体樹脂は製造者の指示に従って洗浄される。

20

## 【0420】

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のNS4ポリペプチドを含有する細胞からの画分を調製することによるNS4ポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、界面活性剤の添加又はこの分野で公知の方法により分画遠心法を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により得られる。あるいは、シグナル配列を含む可溶化NS4ポリペプチドは、細胞が増殖する培地中に有用な量で分泌される。

30

## 【0421】

可溶化NS4ポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、カラムはNS4ポリペプチドの好ましい吸着を可能ならしめる条件下（例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー）で洗浄される。次いで、カラムは、抗体/NS4ポリペプチド結合を分解する条件下（例えば、約2-3といった低pHバッファー、又は高濃度の尿素又はチオシアン酸イオン等のカオトロップ）で溶離され、NS4ポリペプチドが回収される。

## 【実施例9】

## 【0422】

薬物スクリーニング

本発明は、NS4ポリペプチド又はその結合断片を種々の薬物スクリーニング技術において使用することによる化合物のスクリーニングにとって特に有用である。そのような試験に用いられるNS4ポリペプチド又は断片は、溶液中に遊離した状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面に担持されていても、或いは細胞内に位置していてもよい。薬剤スクリーニングの1つの方法では、NS4ポリペプチド又は断片を発現する組換え核酸で安定に形質移入される真核生物又は原核生物宿主細胞を利用する。薬剤は、そのような形質移入細胞に対して、競合的結合アッセイによってスクリーニングされる。生存可能又は固定化形態のいずれかによって、このような細胞は標準的な結合アッセイで使用できる。

40

50

例えば、NS4ポリペプチド又は断片と試験される試薬の間での複合体の形成を測定してよい。あるいは、試験する試薬によって生ずるNS4ポリペプチドとその標的細胞又は標的レセプターとの間の複合体形成における減少を試験することもできる。

#### 【0423】

従って、本発明は、NS4ポリペプチド関連疾患又は障害に影響を与えうる薬剤又は任意の他の試薬のスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、当該分野で良く知られている手法により、その試薬をNS4ポリペプチド又は断片に接触させ、(i)試薬とNS4ポリペプチド又は断片との間の複合体の存在について、又は(ii)NS4ポリペプチド又は断片と細胞との間の複合体の存在について検定することを含む。これらの競合結合アッセイでは、NS4ポリペプチド又は断片が典型的には標識される。適切なインキュベーションの後、遊離なNS4ポリペプチド又は断片を結合形態のものから分離し、遊離又は未複合の標識の量が、特定の試薬がNS4ポリペプチドに結合する又はNS4ポリペプチド/細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

10

#### 【0424】

薬剤スクリーニングのための他の技術は、ポリペプチドに対して適当な結合親和性を持つ化合物についてのハイスループットスクリーニングを提供し、1984年9月13日に公開されたW084/03564に詳細に記載されている。簡単に述べれば、多数の異なる小型ペプチド試験化合物が、プラスチックピン等の固体支持体又は幾つかの他の表面上で合成される。NS4ポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物はNS4ポリペプチドと反応して洗浄される。結合したNS4ポリペプチドはこの分野で良く知られた方法により検出される。精製したNS4ポリペプチドは、上記の薬剤スクリーニング技術に使用するためにプレート上に直接被覆することもできる。さらに、非中和抗体は、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定化するのに使用できる。

20

#### 【0425】

また、本発明は、NS4ポリペプチドに結合可能な中和抗体がNS4ポリペプチド又はその断片について試験化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイも考慮する。この方法において、抗体は、NS4ポリペプチドで、1つ又は複数の抗原決定基を持つ任意のペプチドの存在を検出するのに使用できる。

#### 【実施例10】

#### 【0426】

合理的薬物設計

合理的薬物設計の目的は、対象とする生物活性ポリペプチド(例えば、NS4ポリペプチド)又はそれらが相互作用する小分子、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターの構造的類似物を製造することである。これらの例の任意のものが、NS4ポリペプチドのより活性で安定な形態又はインヒボでNS4ポリペプチドに機能を促進又は阻害する薬物の創作に使用できる(参考、Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991))。

30

#### 【0427】

1つの方法において、NS4ポリペプチド、又はNS4ポリペプチド-インヒビター複合体の三次元構造が、x-線結晶学により、コンピュータモデル化により、最も典型的には2つの方法の組み合わせにより決定される。分子の構造を解明し活性部位を決定するためには、NS4ポリペプチドの形状及び電荷の両方が確認されなければならない。数は少ないが、NS4ポリペプチドの構造に関する有用な情報が相同タンパク質の構造に基づいたモデル化によって得られることもある。両方の場合において、関連する構造情報は、類似NS4ポリペプチド様分子の設計又は効果的なインヒビターの同定に使用される。合理的な薬剤設計の有用な例は、Braxton及びWells, Biochemistry, 31: 7796-7801 (1992)に示されているような向上した活性又は安定性を持つ分子、又はAthaudaら, J. Biochem., 113: 742-746 (1993)に示されているような天然ペプチドのインヒビター、アゴニスト、又はアンタゴニストとして作用する分子を含む。

40

#### 【0428】

また、上記のような機能アッセイによって選択された標的的特異的な抗体を単離しその結晶

50

構造を解明することもできる。この方法は、原理的には、それに続く薬剤設計が基礎をおくことのできるファーマコア (pharmacore) を生成する。機能的な薬理的に活性な抗体に対する抗-イディオタイプ抗体 (抗-ids) を生成することにより、タンパク質結晶学をバイパスすることができる。鏡像の鏡像として、抗-idsの結合部位は最初のレセプターの類似物であると予測できる。抗-idは、次いで、化学的又は生物学的に製造したペプチドのバンクからペプチドを同定及び単離するのに使用できる。単離されたペプチドは、ファーマコアとして機能するであろう。

#### 【0429】

本発明によって、X線結晶学などの分析実験を実施するために十分な量のNS4ポリペプチドが入手可能である。さらに、ここに提供したNS4ポリペプチドアミノ酸配列の知識は、X線結晶学に代わる又はそれに加わるコンピュータモデル化技術で用いられるガイダンスを提供する。

10

#### 【実施例11】

#### 【0430】

NS4トランスジェニックマウスにおける体重、レプチンレベル、食物摂取、尿生産、酸素消費、ならびにトリグリセリドおよび遊離脂肪酸レベルの調査

NS4をコードする1つのオープンリーディングフレームを含むDNA断片をPCRを使用して増幅し、制限酵素XhoIおよびEcoRVを以てして切断した。次にDNAをゲル精製し、事前に同一酵素で消化した発現ベクターに結合した。

#### 【0431】

次に、ヒトNS4をコードするcDNAを、ミオシンL鎖(MLC)を含むプラスミドにクローン化した。このプロモーターの量は、導入遺伝子の筋肉に特異的な転写に十分であった。発現レベルを上げるため、スプライスアクセプターおよびスプライスドナーも5' NS4 cDNAに含めることができる。さらに、スプライスドナーおよびスプライスアクセプターはまた、発現レベルを増大させるために、5'末端でNS4 cDNAに結合できる。さらに、ポリA追加信号を有するスプライスドナーおよびスプライスアクセプターはまた、転写レベルを増大させ、且つ転写末端サイトを提供するために、3'末端でNS4 cDNAに結合できる。

20

#### 【0432】

MLCプロモーターを包含するDNA、5'末端スプライスアクセプターおよびドナー、NS4 cDNAおよび3'末端スプライスアクセプターおよびドナー、ならびに転写末端サイト(導入遺伝子)を、適切な制限酵素を使用して細菌ベクターから放出し、アガロースゲル上のサイズ分画に従って精製した。精製したDNAをマウスの受精卵の前核に注入し、先述のようにトランスジェニックマウスを産出し、精製した(Tim Stewart, "Genetic Modification of Animals", Exploring Genetic Mechanisms, 565-598頁、1997年、編集M SingerおよびP Berg; University Science Books; カリフォルニア州Sausalito)。特に断らない限り、マウスは温度と湿度が管理された環境において標準的な実験飼料で維持した。標準的な実験飼料は、Purina 5010 (Harlan Teklab, ウィスコンシン州マディソン)であった。後述の高脂肪(58% kJ脂肪)および低脂肪(10.5% kJ脂肪)の等カロリーの食餌は、Surwitらによる食餌(Surwit, R.S.他、Metabolism: Clinical & Experimental 44, 645-651, 1995年)に基づくもので、リサーチダイエット社(ニュージャージー州ニューブランズウィック)から購入した。12時間(午後6時/午前6時)の照明周期を使用した。NS4トランスジェニックマウスの歳が8ヶ月になった後、同齢の非トランスジェニックマウスと共にpDEXA Sabre X線骨密度計( Norland Medical Systems, Inc.)を使用して分析した。マウスは6-8分間麻酔した(anesthetize)。非トランスジェニック対照群と比較すると、NS4トランスジェニックマウスの総体重または脂肪含有量(体重に対する割合(%))における減少が明らかで、体重異常に対する有用性を示していた。

30

40

#### 【0433】

加えて、(酸素消費率によって証明される)食物摂取および代謝率を増加させた場合の影

50

響も測定した。体重減少と食物摂取増大が共に見られ、一般的に脂肪過多症レベルの低下が示された。さらに、食物摂取と尿生産が共に増大し、水の摂取量に増加が見られないことから、代謝の増大が示された。

【0434】

肥満、およびトリグリセリドと遊離脂肪酸の上昇は心臓血管系の疾病の危険因子である。NS4がトリグリセリドまたは遊離脂肪酸のレベルを低下させることができるかどうか調査した。

【0435】

次の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（アメリカ合衆国、20110-2209、バージニア州マナッサス、ユニバーシティ・ブルバード10801）（ATCC）へ寄託した：

材料	ATCC登録番号	寄託日
DNA 146649-1789R1	PTA-3376	2001年5月15日
DNA 149986-2883	PTA-1627	2000年4月4日
DNA 149995-2871	PTA-1971	2000年5月31日

【0436】

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則（ブダペスト条約）の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存培養物が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、何れが最初に来ようとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則（特に参照番号8860G638の37CFR第1.14条を含む）に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

【0437】

本出願の譲受人は、寄託した材料の培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死滅もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと速やかに取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

【0438】

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの材料の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

【0439】

【図1】図1は、天然配列NS4コード化ポリヌクレオチドを示し、本明細書で「DNA 146649-1789R1」と呼ぶ天然配列NS4のコード化配列（ヌクレオチド486-746）を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号1）を示す。

【図2】図2は、天然配列NS4コード化ポリヌクレオチドを示し、本明細書で「DNA 149986-2883」と呼ぶ天然配列NS4のコード化配列（ヌクレオチド1784-2068）を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号2）を示す。

【図3】図3は、天然配列NS4コード化ポリヌクレオチドを示し、本明細書で「DNA 149995-2871」と呼ぶ天然配列NS4のコード化配列（ヌクレオチド447-

731)を含むcDNAのヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。

【図4】図4(a)ないし(c)は、配列番号1、2および3からそれぞれ得られた天然配列NS4ポリペプチドの各アミノ酸配列(配列番号4、5および6)と、その他複数の重要ポリペプチドドメインの凡その位置を示す。

【図5】図5(a)はNS4(DNA146649-1789R1)トランスジェニックマウスの体重が非トランスジェニック同腹子より小さいことを、図5(b)はトランスジェニックマウスの総体重に占める脂肪の割合が非トランスジェニック同腹子より小さいことを、図5(c)はトランスジェニックマウスの総体重に占める除脂肪体重の割合が非トランスジェニック同腹子より大きいことを、それぞれ示している。

【図6】図6は、天然配列NS4ポリペプチドDNA146649-1789R1(配列番号1)、DNA149986-2883(配列番号2)およびDNA149995-2871(配列番号3)によりコード化されたポリペプチドの比較を示す。

【図7】図7は、複数種のヒト組織ライブラリへのハイブリダイゼーションを示すDNA146649-1789R1(配列番号1)のノーザンプロットであり、図7(a)、(b)および(c)は提示された複数種の組織中の発現レベルを示しており、図7(d)は腫瘍細胞系における発現を示している。左から右へ、HL-60(前骨髄球性白血病)、HeLa S3(子宮頸部上皮悪性腫瘍)、K562(慢性骨髄性白血病)、MOLT-4(リンパ芽球性白血病)、Raji(バーキットリンパ腫)、SW480(結腸直腸腺癌)、A549(肺悪性腫瘍)およびG361(黒色腫)。

【図1】

AAAAGAGGATAATCAAGAAGGGCTCTTTAAGGACTATTTCCCAAGATGGGAATGGAGGGAACT  
GCAGGCTAGTGTCTACCCCTCAGCAGGCAGCAGCTAATTCCTGAGGGGATAAGGACGTGGTTGCGA  
GGACATGGAGGAAAGTTCTACAGAGGAGGCAGCTGGGCTTCAGGAACCCCTGCTTGAGAGGCGCTG  
TGAGAGGTGGGAATCAATACCTGACCTCGCTCTCTCCATCTCTCCCAACCCACAGGGGTGGTG  
TGGCCCCACAGGCGAGCTTCCGGGGAGAGAGTGGAGAGGAGCCTGGAGGGCCAGTAGAAGTAT  
GCACACAAGTATCTACAAGCCACAGGCATTTTTTGAGCATTGGGATTTGTCAGCAACAAGTCAGA  
CAAAAACTTGTCTCTGGTGGAGGAAACATTTAGCAAAAGGAAGGCAAAATGACAAGCAGGAGAAGTAT  
TTGCTAAGAAATGGCAATCTGACGCTCAGCCTTCAACTCATCTTGTATTAAATACCATCAATATCCCA  
TGAGGCTCATAAAACGAGTCTTTCTTCTGGAAAACATGACCAAGATGGGCAAAAGCTTCCAACATGA  
CTTTCAGCAACGAAAACTAAGAGTCAAAGGCATTTATACCGGAATGCCGACATTTGCTCTGCACAT  
CGGTAACCTCAGCAGGCTAATCTGCGACCTTCAGCTATGGTGAATTTGAGAATCATTCACCTG  
AGCATCACTATGTAACAGCATTGGGTTGGGTGCCAGAGATCCAAAGCTAAGACACCAAAACCTGCT  
CTCCAGGAAACGAGAGGCTGAGAAGGGCCAGCAGTGTCTGTGACTTTGGAGCGTGGAGAGCAG  
GAGTGGGTGCTGGGCTGAGAACAGAGGTAATGGCCCTGGGAGCGCCGGGAGAGATGAGTTTG  
AGGCAAAAGGATTTGCATTTGATGAACTTGTGTGTTGAGTGAAGCTGAAGTTGAACTCTGAA  
CCACAGGACAAAGCATGATGATGATGTTCTCCCACTAAATGGCAATGCTCTTGAAGAAGCCCTGTCTT  
AATCATCTCTGTGTCTCACGCTGGCTCATACATATGCTTATCGCATGCTTTAATAAAAAGGAGGAA  
AATGC

【図2】

GGTGGAGCCAAATAAGGGAATGAAAGCAGGCCACCGGAGCCTCGGAGAGGCCAACCTTTGGGTACTC  
TTCACACTGTGGCAGCTTTGTCTTTTGTCTTTGTCAGTAAGTTTGTGCTGTGCTACTCTTTGGGT  
CTGCACCTGCTTTATGAAGTAACTGACACTGACCATGGAGGCTGCGAGCTTCACTCTCAAGCCAGCAG  
ACCAGGAGCCCACTGGGAGGAGGAATGAACAATCTGGACACGCCACCCTTAAGAGCTGAACACTCA  
CCGGAGGCTTGCAGCTTCACTCTGAAGTCAGCGAGACCACAAACCCACCAAGGAAGAAAATCC  
GGACACATCTGAACATCTGAGGGAATCCGCACACACCATCTTAAAGAACTGTAACACTCACCCAG  
GGCCCGTGGCTTCACTTGAAGTCAGCAAGACCAAGAACCCACCAATCTGGACACAACAGGACACA  
CACATGGAGGGGGAGGCCAGAGGGAAACCTAGCTGGCTGGGGTGGGAATTTGAATCCCTGAGCCCA  
TCTTCTTCTTCCACCACTTTGCGGTGACATTAGGACCAACCAACCAATGCCATATATTTCTTAGT  
TTACAAGAAAATGTTGAAGTTCATCCACAGAAATCACTTAGCTTCTGCTTTTACAAGTGGTGA  
TAGGAGATTTCAATACAGATTTTGTGTACTATATAACAGTTTACAGCATGGACTACTGGTGTCT  
CTTTACTAATCTGAAATGTTGTCATTAGCACTTTAAATCTAATCCATTTAGAGAGCCAGTTCGGAAA  
CCTCAGAACAGTTTGGAAAATCTCCGTCTCTGAGCCATTTTGGAAACCACTGTGTAGTGT  
CTCCAGGGAACAGAACCAATATGTTTATTTACTATGGGACTGGCTCATATGATTTGAGAGGCCCTA  
GAAGTCCCTCCCTCTCAAGATGTTGCTGTGACAGCTGCGAACCCAGGAAAGCTGGTGTGTCAGAGT  
CTGAAAGGCTGAGAACTGGGTGGGAGTGGGACAGACTAAGGGCCCTTAGTCTCTGGTGTGGTGG  
TCCCACAGGTGAGCCTTTCGTGGAGAGGGTGGAGGGGATCTGGAAGGGCCAAAGAGATACCTC  
AGCACTAAGAGACCTTTGGACTCAGACCAGACTTACCAATTCATTCATTCAGTCCGTGAAAATGTA  
TTGACCATGTATCAACAGGATTTGTGACACAAAACAGATGGCACACTCAAAGAGGATAATTCAG  
AAGGGCTTCTTTAAGGACTAATTTCCAGATGGGAATGGAGGGAACTGCAGGGCTAGTGTCTTACT  
CTACAGAGGAGGCACAGTGGGCTTCAAGAACACCCCTGCTTGGAGGCTGTGAGAGGATTTGTTTCT  
ACTGTTGACATTCAGTAACCTCTAAGCTGTCTGGGAGAGTGTACCCCTGCTCTCCCGTCT  
TTCTGCACTCTCAGCAATGGGATGGGCTGACTGATGCCCTGTGGGCTGGAAGCTGACCAAGTGTG  
TGCAGACCAGACCCCTCACATAGTGAAGTGTGGGCTGAGGAATCCAGGAGAGCCGAGGGGGACAC  
TGAAGTGTATCGTTGGCCCTGCCAGCTGCAAGTGAATGCTTCTGATGAATTTTAAAGGGAGAAAG  
AAGTATTTGCTAAGAAATGGCAATCTGATGCTCAGCCCTTCACTCATCTTGTATTAAATACCATCAAT  
ATCCCATGAGGCTCATAAAACGAGTCTTTCTTCTTGGAAACATGACCAAGATTTGGGCAAAAGCTCCA  
ACATGACTTTCAGCAACGAAAACTAAGAGTCAAAGGCATTTATACCGGAATCCGACATTTGCTCT  
CGACATCGGTAACCTCAGCAGGCTTAACTTGCAGGACCTTCACTATGTTGTAATTTGAGGTCAGT  
GGCCAGAGGACAGATCCCGTCTACATTTAGTGAAGCGGAGAGCTACTGCAGGTTCTGAGCAGAGT  
CCTAATTTATATTTTGAAGAATCATCATGGCTCCTAGATAGGAATAAAAAGGGGGCCCGGAT  
GGAAACGATGAGTCCAGTGGGTTACTGCAAGATCCAGGCCAGAAATCCAGGCACAGTGGCACACAC  
CTGAGTCCAGATAATCCCACTAGGCTCTGTGCTCTGTGGCTACTGCTCCGAGTCCAGCCCGGAT  
GATTTCTGGGCTGTAATGTCTAAAAACGCTCCCTGCTGATGTTTGAAGTGAAGTGTGTTACTTGAA  
GGCAGTCTCAGGATAAATAGTACTGCTTATC

10

【 図 3 】

```

AAAAATACAGCAGGTGAAGGAGTTGGAGAGTAGGGGTTGGAGGCCACGCAGCACTTGTCTTCA
CCCTGGAGGGGATCTGTTACATGCCCCAGATTGCTGGTCCCTTAGAAATGTTACTGAGGCAGCCTCTG
CATTTTGCAGGAGTTGTTTCTACTGTTGACATTCACGTAACCTCCTAACGCTGTCTGGGGAAGAT
GCTACCCCTCTGCTCTCCCGTCTTTCCTGCACTCTCAGCAATGGGATGGGCTGACTGATGCCTGTGG
GCTGGAAGCTGACCAAGTGTGCTGACAGCCAGCCCTCACATAGTGAGTGTGGGCTGAGGAATC
CAGGAGGCCGAGGGGGGACACTGAAGGTGATCGTTGGCCCTGCCAGCTGCAAGTGAATGCTTCT
GATGAATTTAATAGGGAGAAAGATATTGCTAAGAATGGCAATCCTGACGCTCAGCCTTCACTC
ATCTTGTATTATAACCATCAATATCCCATGAGGCTCATAAAACGAGTCTTCTTCTTGGAAACATGA
CCAAGATTGGCAACGCTCTCCAACATGACTTCAGCAACGGAAAATAAGAGTCAAAGGCATTTATT
ACCGAATGCCGACATTTGCTCTCGACATCGGGTAACCTCAGCAGGCTAACTCTGCAGGACCTTCAG
CTATGGTGAATTTGAGGTCAGTGGCCAGAGGACAGATCCCGTCTACATTATGAGTGAAGCGGAGGC
TACTGCAGGGTCTGAGCAGAGTCTAATTTATATTTAGAGAATCATCATGGCTCCTGATTAGGA
ATAAAACGAAGGGGCCAGGGATGGAACGATGAGTCCAGTGGGTTACTGCAAGATCCAGGCCAGA
AATCCAGGCACAGTGGCACACACCTGAGTCCAGATAATCCACCTACTGGTCTGCTCTGGCCTA
CTGGTCOGAGTCCAGCCCGACTGATTTCTGGGCTGTAATGTCTAAAACGCTCCCTGCTGATGTT
TGCAAGTACTGTTACTTGAAGCGAGTTCCTAGGATAAACTAGTCTGCTTTATCATTACAGAATCAT
TCACTGAGCATCAACTATGTAACAGCATTGGGTTGGGTGCCAGAGATCCAANGCTAAGACACCAAAA
CCTGCTCTCCAGGAACGAGAGGCTGAGAA

```

【 図 4 】

```

MAILTLSLQLILLIIPISISHEAHKTSLSWKHDQDWANVSNMTFNSGKLRVKGIYYRNAD
ICSRHRVTSAGLTLQDLQLWCNLRRIH

```

ドメインの情報

シグナルペプチド:  
1-19

N-グリコシル化部位  
38-42  
41-45

(a)

```

MAILMLSLQLILLIIPISISHEAHKTSLSWKHDQDWANVSNMTFNSGKLRVKGIYYRNAD
ICSRHRVTSAGLTLQDLQLWCNLRVARGQIPST

```

ドメインの情報

シグナルペプチド:  
1-19

N-グリコシル化部位  
38-42  
41-45

N-ミristol化部位  
89-95

(b)

```

MAILTLSLQLILLIIPISISHEAHKTSLSWKHDQDWANVSNMTFNSGKLRVKGIYYRNAD
ICSRHRVTSAGLTLQDLQLWCNLRVARGQIPSTL

```

ドメインの情報

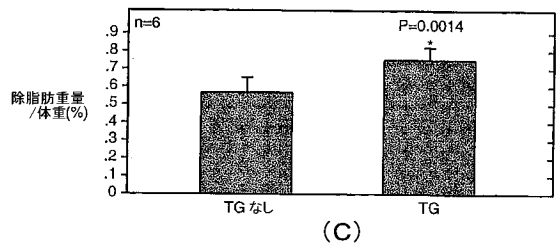
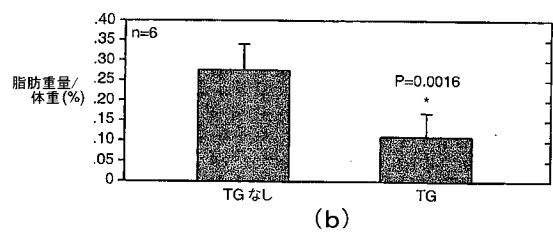
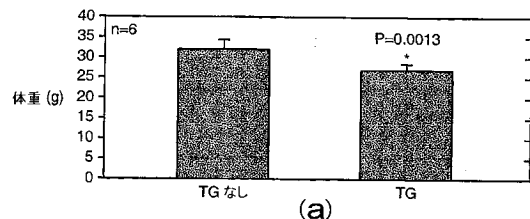
シグナルペプチド:  
1-19

N-グリコシル化部位  
38-42  
41-45

N-ミristol化部位  
89-95

(c)

【 図 5 】



【 図 6 】

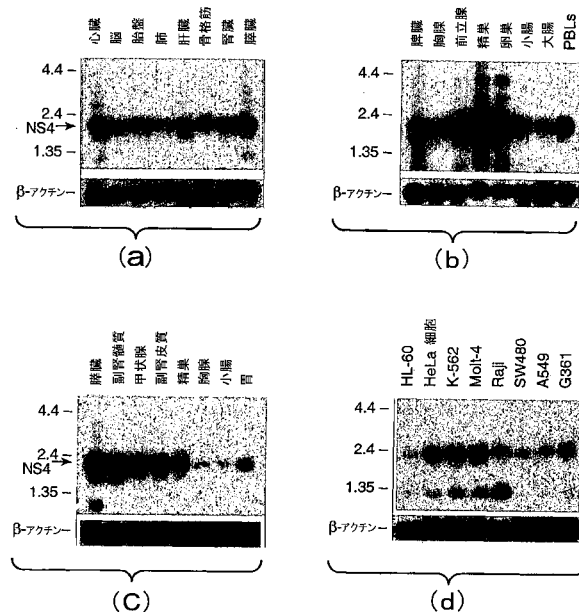
```

DNA146649 1 MAILTLSLQLILLIIPISISHEAHKTSLSWKHDQDWANVSNMTFNSGKLR
DNA149986 1 MAILMLSLQLILLIIPISISHEAHKTSLSWKHDQDWANVSNMTFNSGKLR
DNA149995 1 MAILTLSLQLILLIIPISISHEAHKTSLSWKHDQDWANVSNMTFNSGKLR

DNA146649 51 VKGIYYRNADICSRHRVTSAGLTLQDLQLWCNLRRIH-----
DNA149986 51 VKGIYYRNADICSRHRVTSAGLTLQDLQLWCNLRVARGQIPSTL
DNA149995 51 VKGIYYRNADICSRHRVTSAGLTLQDLQLWCNLRVARGQIPSTL

```

【 図 7 】



## 【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  
19 December 2002 (19.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/101069 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q
- (21) International Application Number: PCT/US02/10513
- (22) International Filing Date: 3 April 2002 (03.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/880,457 12 June 2001 (12.06.2001) US
- (71) Applicant: GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
- (72) Inventors: GODDARD, Audrey; 110 Congo Street, San Francisco, CA 94131 (US); PAN, James; 17 Tewsley Place, Etobicoke, Ontario M9P 1N7 (CA); WOOD, William, L.; 35 Southdown Court, Hillsborough, CA 94010 (US).
- (74) Agents: SVOBODA, Craig, G. et al.; c/o Genentech, Inc., MS49, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/101069 A2

(54) Title: NS4 NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES AND METHODS OF USE FOR THE TREATMENT OF BODY WEIGHT DISORDERS

(57) Abstract: The present invention is directed to novel polypeptides NS4 and to nucleic acid molecules encoding those polypeptides. Also provided herein are vectors and host cells comprising those nucleic acid sequences, chimeric polypeptide molecules comprising the polypeptides of the present invention fused to heterologous polypeptide sequences, antibodies which bind to the polypeptides of the present invention and to methods for producing the polypeptides of the present invention. Furthermore, methods of treating body weight disorders (e.g. obesity, cachexia or anorexia) are provided.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

5 **NS4 NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES AND METHODS OF USE FOR THE  
TREATMENT OF BODY WEIGHT DISORDERS**

10 FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to NS4 genes, including the human NS4 gene, which are novel genes involved in the control of mammalian body weight. The scope of the invention includes the identification and isolation of novel DNA encoding and to the recombinant production of novel polypeptides designated herein as NS4 polypeptides, and to methods, compositions and assays utilizing such polypeptides involved in the control of mammalian body weight. The invention encompasses nucleotide sequences of the NS4 nucleic acid, host cell expression systems and hosts which have been transformed by these expression systems, including transgenic animals. Further included are NS4 proteins, polypeptides and peptides containing NS4 amino acid sequences, fusion proteins of NS4 proteins, polypeptides and peptides, and antibodies specifically binding thereto.

20 The present invention also relates to methods and compositions for the diagnosis and treatment of mammalian body weight disorders, including obesity, cachexia, and anorexia, and for the identification of subjects susceptible to such disorders. Further, the invention relates to methods of using the NS4 polynucleotide of the invention for the identification of compounds which modulate the expression of the NS4 polynucleotide and/or the activity of the NS4 polynucleotide. Such compounds can be useful as therapeutic agents in the treatment of mammalian body weight disorders, including obesity, cachexia, and anorexia.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Obesity is a chronic disease that is highly prevalent in modern society (e.g., 30% to 50% of middle-aged population). Other body weight disorders, such as anorexia nervosa and bulimia nervosa, also pose serious health threats. Further, disorders as anorexia and cachexia (wasting) are also prominent features of other diseases such as cancer, cystic fibrosis, and AIDS. Obesity, or an excess of body fat relative to lean body mass, are associated not only with social stigma, but also with decreased life span and numerous medical problems, including adverse psychological development, reproductive disorders such as polycystic ovarian disease, dermatological disorders such as infections, varicose veins, Acanthosis nigricans, and eczema, exercise intolerance, abnormal metabolism, hyperphagia, diabetes mellitus, insulin resistance, hypertension, hypercholesterolemia, stroke, hyperlipidemia, cholelithiasis, osteoarthritis, orthopedic injury, thromboembolic disease, cancer, and coronary heart disease. Rissanen *et al.*, *British Medical Journal* 301: 835-837 (1990); Nishina, P.M. *et al.*, *Metab.* 43: 554-558 (1994); Grundy, S.M. & Barnett, J.P., *Dis. Mon.* 36: 641-731 (1990).

Obesity is not merely a behavioral problem, *i.e.*, the result of voluntary hyperphagia. Rather, the

WO 02/101069

PCT/US02/10513

differential body composition observed between obese and normal subjects results from differences in both metabolism and neurologic/metabolic interactions. These differences seem to be, to some extent, due to differences in gene expression, and/or level of gene products or activity (Friedman, J.M. *et al.*, *Mammalian Gene* 1: 130-144 (1991)).

5 The epidemiology of obesity strongly shows that the disorder exhibits inherited characteristics (Stunkard, *N. Eng. J. Med.* 322: 1438 (1990). Moll *et al.* have reported that, in many populations, obesity seems to be controlled by a few genetic loci (Moll *et al.*, *Am. J. Hum. Gen.* 49: 1243 (1991)). In addition, human twin studies strongly suggest a substantial genetic basis in the control of body weight, with estimates of heritability of 80-90% (Simopoulos, A.P. & Childs, B., Eds., 1989, in "Genetic Variation and Nutrition in Obesity", World Review of  
10 Nutrition and Diabetes 63, S. Karger, Basel, Switzerland; Borjeson, M., 1976, *Acta Paediatr. Scand.* 65: 279-287).

In other studies, non-obese persons who deliberately attempted to gain weight by systematically over-eating were found to be more resistant to such weight gain and able to maintain an elevated weight only by very high caloric intake. In contrast, spontaneously obese individuals are able to maintain their status with normal or  
15 only moderately elevated caloric intake. In addition, it is a commonplace experience in animal husbandry that different strains of swine, cattle, *etc.*, have different predispositions to obesity. Studies of the genetics of human obesity, and of animal models of obesity demonstrate that obesity results from complex defective regulation of both food intake, food induced energy expenditure, and of the balance between lipid and lean body anabolism.

There are a number of genetic diseases in man and other species which feature obesity among their more prominent symptoms, along with, frequently, dysmorphic features and mental retardation. For example, Prader-Willi syndrome (PWS; reviewed in Knoll, J.H. *et al.*, *Am. J. Med. Genet.* 46: 2-6 (1993)) affects approximately  
20 1 in 20,000 live births, and involves poor neonatal muscle tone, facial and genital deformities, and generally obesity.

In addition to PWS, many other pleiotropic syndromes have been characterized which include obesity as a symptom. These syndromes are genetically straightforward, and appear to involve autosomal recessive alleles. Such diseases include, among others, Ahlstrom, Carpenter, Bardet-Biedl, Cohen, Morgagni-Stewart and  
25 Morgagni-Morel Syndromes.

A number of models exists for the study of obesity (see, *e.g.*, Bray, G. A., *Prog. Brain Res.* 93: 333-341 (1992); and Bray, G.A., *Amer. J. Clin. Nutr.* 5: 891-902 (1989)). For example, animals having mutations which  
30 lead to syndromes that include obesity symptoms have also been identified. Attempts have been made to utilize such animals as models for the study of obesity, and the best studied animal models to date for genetic obesity are mice. For reviews, see, *e.g.*, Friedman, J.M. *et al.*, *Mamm. Gen.* 1: 130-144 (1991); Friedman, J.M. and Liebel, R.L., *Cell* 69: 217-220 (1992).

Studies utilizing mice have confirmed that obesity is a very complex trait with a high degree of  
35 heritability. Mutations at a number of loci have been identified which lead to obese phenotypes. These include the autosomal recessive mutations obese (*ob*), diabetes (*db*), fat (*fat*), and tubby (*tub*).

The dominant Yellow mutation (*Ay*) at the agouti locus is causes a pleiotropic syndrome which causes

WO 02/101069

PCT/US02/10513

moderate adult onset obesity, a yellow coat color, and a high incidence of tumor formation (Herberg, L. and Coleman, D.L., *Metabolism* 26:59 (1977)), and an abnormal anatomic distribution of body fat (Coleman, D. L., *Diabetologia* 14: 141-148 (1978)). The mutation causes the widespread expression of a protein which is normally seen only in neonatal skin (Michaud, E. J. et al., *Genes Devel.* 8:1463-1472 (1994)). The agouti protein has been reported to be a competitive antagonist of  $\alpha$ -MSH binding to the melanocortin receptors MC1-R and MC4-R *in vitro* (Lu et al., *Nature* 371:799-802 (1996)), and the authors speculated that de-regulated ubiquitous expression of agouti may lead to obesity by antagonism of melanocortin receptors expressed outside the hair follicles.

In summary, therefore, obesity, poses a major, worldwide health problem, and is a complex disease with a high degree of inheritance. Given the severity, prevalence, and potential heterogeneity of such disorders, there exists a great need for the identification of those genes that participate in the control of body weight.

Considering the high prevalence of obesity in our society and the serious consequences associated therewith as discussed above, any therapeutic drug potentially useful in reducing weight of obese persons could have a profound beneficial effect on their health. There is a need in the art for a drug that will reduce total body weight of obese subjects toward their ideal body weight without significant adverse side effects and that will help the obese subject maintain the reduced weight level.

Convention known therapies for obesity include standard diets and exercise, very low calorie diets, behavioral therapy, pharmacotherapy involving appetite suppressants, thermogenic drugs, food absorption inhibitors, mechanical devices such as jaw wiring, waist cords and balloons, and surgery. Jung and Chong, *Clinical Endocrinology* 35: 11-20 (1991); Bray, *Am. J. Clin. Nutr.* 55: 538S-544S (1992). Some success has been reported by protein-sparing modified fasting to achieve weight reduction in adolescents. Lee et al., *Clin. Pediatr.* 31: 234-236 (April 1992). However, caloric restriction as a treatment for obesity causes catabolism of body protein stores and produces negative nitrogen balance. As a result, protein-supplemented diets, therefore, have gained popularity as a means of lessening nitrogen loss during caloric restriction. Unfortunately, such diets produce only modest nitrogen sparing, a more effective way to preserve lean body mass and protein stores is needed. In addition, an ideal treatment of obesity would include an accelerated loss of body fat. Various approaches to such treatment include those discussed by Weintraub and Bray, *Med. Clinics N. Amer.* 73: 237 (1989); Bray, *Nutrition Reviews* 49: 33 (1991).

It is therefore desirable to provide a treatment regimen that is useful in returning the body weight of obese subjects toward a normal, ideal body weight.

It is further desirable to provide a therapy for obesity and other body weight disorders that results in maintenance of the lowered body weight for an extended period of time.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to the identification of nucleic acid that encode novel polypeptides that are involved in the control of body weight, and which are further associated with mammalian body weight disorders such as obesity, cachexia and anorexia. The nucleic acid molecules represent nucleotide sequences corresponding to the mammalian NS4 polynucleotides, including human NS4 polynucleotides. Particular examples of the

WO 02/101069

PCT/US02/10513

nucleic acids molecules of the present invention are designated herein as DNA146649-1789R1, DNA149986-2883 and DNA149995-2871.

In one embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes an NS4 polypeptide. Specifically, such NS4 polypeptides can be PRO19652, PRO19816, PRO19650 polypeptides.

In one aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule encoding a polypeptide having the sequence of amino acid residues from about: (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 to about 95 of Figure 2C (SEQ ID NO:6), or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In another aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises (a) a nucleotide sequence encoding a NS4 polypeptide having the sequence of amino acid residues from about: (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6); or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In yet another aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule having the sequence of nucleotides from about: (i) 486 or about 543 to about 746, inclusive, of Figure 1A (SEQ ID NO:1), (ii) 1784 or about 1841 to about 2068, inclusive, of Figure 1B (SEQ ID NO:2) or (iii) 447 or about 504 to about 731, inclusive, of Figure 1C (SEQ ID NO:3), or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In yet another aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises (a) the nucleotide sequence from about: (i) 486 or about 543 to about 746, inclusive, of Figure 1A (SEQ ID NO:1); (ii) 1784 or about 1841 to about 2068, inclusive, of Figure 1B (SEQ ID NO:2); or (iii) 447 or about 504 to about 731, inclusive, of Figure 1C (SEQ ID NO:3), or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In yet another aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% nucleic acid sequence identity to: (a) a DNA molecule that encodes the same mature polypeptide encoded by the human protein cDNA deposited with the ATCC on (i) May 15, 2001, under ATCC Deposit No. PTA-3376 (DNA146649-1789R1), (ii) April 4, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1627 (DNA149986-2883) or (iii) May 31, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1971 (DNA149995-2871); or (b) the complement of the nucleotide sequence of (a).

In yet another aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% nucleic acid sequence identity to: (a) the

WO 02/101069

PCT/US02/10513

full-length polypeptide coding sequence of the DNA deposited with the ATCC on (i) May 15, 2001, under ATCC Deposit No. PTA-3376 (DNA146649-1789R1), (ii) April 4, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1627 (DNA149986-2883) or (iii) May 31, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1971 (DNA149995-2871); or (b) the complement of the nucleotide sequence of (a). In a specific aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises:

5 (a) the full-length polypeptide coding sequence of the DNA deposited with the ATCC on (i) May 15, 2001, under ATCC Deposit No. PTA-3376 (DNA146649-1789R1), (ii) April 4, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1627 (DNA149986-2883) or (iii) May 31, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1971 (DNA149995-2871); or (b) the complement of the nucleotide sequence of (a).

In yet another aspect, the isolated nucleic acid molecule is a nucleotide sequence which encodes an active

10 NS4 polypeptide as defined below comprising a nucleotide sequence that hybridizes to the complement of (a) a nucleic acid sequence that encodes amino acid residues from about: (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6); or (b) the complement of the DNA molecule of (a). Preferably, hybridization occurs under stringent hybridization and wash conditions.

In yet another aspect, the isolated nucleic acid molecule is a nucleotide sequence which encodes an active

15 NS4 polypeptide as defined below comprising a nucleotide sequence that hybridizes to the complement of (a) the nucleic acid sequence between about nucleotides: (i) 486 or about 543 to about 746, inclusive, of Figure 1A (SEQ ID NO:1), (ii) 1784 or about 1841 to about 2068, inclusive, of Figure 1B (SEQ ID NO:2) or (iii) 447 or about 504 to about 731, inclusive, of Figure 1C (SEQ ID NO:3); or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

20 Preferably, hybridization occurs under stringent hybridization and wash conditions.

In yet another aspect, the isolated nucleic acid is a nucleotide sequence having at least about 22 nucleotide residues and which is produced by hybridizing a test DNA molecule under stringent conditions with

(a) a DNA molecule encoding an NS4 polypeptide having the sequence of amino acid residues from about: (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of

25 Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6); or (b) the complement of the DNA molecule of (a), and, if the test DNA molecule has at least about an 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% nucleic acid sequence identity to (a) or (b), and isolating the test DNA molecule.

In yet another aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises DNA encoding an NS4 polypeptide

30 without the N-terminal signal sequence and/or the initiating methionine, or is complementary to such encoding nucleic acid molecule. The signal peptide has been tentatively identified as extending from about amino acid position 1 to about amino acid position 19, inclusive, in the sequence of Figures 2A, 2B and 2C (SEQ ID NOS:4, 5 & 6), respectively. It is noted, however, that the C-terminal boundary of the signal peptide may vary, but most

35 likely by no more than about 5 amino acids on either side of the signal peptide C-terminal boundary as initially identified herein, wherein the C-terminal boundary of the signal peptide may be identified pursuant to criteria routinely employed in the art for identifying that type of amino acid sequence element (e.g., Nielsen *et al.*, *Prot.*

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Eng. 10:1-6 (1997) and von Heinje *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 14:4683-4690 (1986). Moreover, it is also recognized that, in some cases, cleavage of a signal sequence from a secreted polypeptide is not entirely uniform, resulting in more than one secreted species. These polypeptides, and the polynucleotides encoding them, are contemplated by the present invention. As such, for purposes of the present application, the signal peptide of the NS4 polypeptide shown in Figures 2A, 2B and 2C (SEQ ID NOS:4, 5 and 6), respectively, extend from amino acids 1 to X of Figures 2A, 2B and 2C (SEQ ID NOS:4, 5 and 6), respectively, wherein X is any amino acid from 14 to 24 of Figure 2A, 2B and 2C (SEQ ID NOS:4, 5 and 6), respectively. Therefore, mature forms of the NS4 polypeptide which are encompassed by the present invention include those comprising amino acid residues: (i) X to 87 of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) X to 95 of Figure 2B (SEQ ID NO:5) and (iii) X to 95 of Figure 2C (SEQ ID NO:6), wherein X is any amino acid from 14 to 24 of Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) and Figure 2C (SEQ ID NO:6) and variants thereof as described below. Isolated nucleic acid molecules encoding these polypeptides are also contemplated.

In yet another embodiment, the invention provides fragments of an NS4 polypeptide sequence which includes the coding sequence that may find use as, for example, hybridization probes or for encoding fragments of an NS4 polypeptide that may optionally encode a polypeptide comprising a binding site for an anti-NS4 antibody. Such nucleic acid fragments are usually at least about 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 or 1000 nucleotides in length, wherein in this context the term "about" means the referenced nucleotide sequence length plus or minus up to 10% of that referenced length. In a preferred embodiment, the nucleotide sequence fragment is derived from any coding region of the nucleotide sequence shown in Figure 1A (SEQ ID NO:1), Figure 1B (SEQ ID NO:2) or Figure 1C (SEQ ID NO:3). It is noted that novel fragments of an NS4 polypeptide-encoding nucleotide sequence may be determined in a routine manner by aligning the NS4 polypeptide-encoding nucleotide sequence with other known nucleotide sequences using any of a number of well known sequence alignment programs and determining which NS4 polypeptide-encoding nucleotide sequence fragment(s) are novel. All of such NS4 polypeptide-encoding nucleotide sequences are contemplated herein and can be determined without undue experimentation. Also contemplated are the NS4 polypeptide fragments encoded by these nucleotide molecule fragments, preferably those NS4 polypeptide fragments that comprise a binding site for an anti-NS4 antibody.

In yet another embodiment, the invention provides a vector (*e.g.*, expression vectors) comprising a nucleotide sequence encoding NS4 or its variants. The vector may comprise any of the isolated nucleic acid molecules hereinabove identified. A host cell comprising such a vector is also provided. By way of example, the host cells may be CHO cells, *E. coli*, baculovirus infected insect cells, or yeast. In one aspect, the invention comprises host organisms that have been transformed with NS4-encoding nucleotide sequence, including, for

WO 02/101069

PCT/US02/10513

example, transgenic animals.

In another aspect, the transgenic animals of the invention express an NS4 variant, in particular a variant that is associated with a weight disorder such as obesity, cachexia or anorexia. In particular, such transgenic animals comprise those that express an NS4 transgene at higher or lower levels than normal. In another particular aspect, the transgenic animals include those which express NS4 in all or some ("mosaic") of their cells. In yet a further particular aspect, such transgenic animals further includes those in which NS4 nucleic acid is introduced into and expressed in only specific cell types. In yet another particular aspect, the invention includes "knock-out" animals, or animals which have been modified to no longer express, or express in a lower quantity, NS4 polynucleotides.

In yet another embodiment, the invention provides isolated NS4 polypeptide encoded by any of the isolated nucleic acid sequences hereinabove identified. In one aspect, the invention provides isolated native sequence NS4 polypeptide, which in certain embodiments, includes an amino acid sequence comprising residues from about (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) 1 to about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6).

In another aspect, the invention provides an isolated NS4 polypeptide, comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% amino acid sequence identity to the sequence of amino acid residues from about (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6).

In yet another aspect, the isolated NS4 polypeptide comprises an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% amino acid sequence identity to an amino acid sequence encoded by the human protein cDNA deposited with the ATCC on (i) May 15, 2001, under ATCC Deposit No. PTA-3376 (DNA146649-1789R1); (ii) April 4, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1627 (DNA149986-2883) or (iii) May 31, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1971 (DNA149995-2871).

In yet another aspect, the isolated NS4 polypeptide comprises a polypeptide without the N-terminal signal sequence and/or the initiating methionine and is encoded by a nucleotide sequence that encodes such an amino acid sequence as hereinbefore described. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the NS4 polypeptide and recovering the NS4 polypeptide from the cell culture.

In yet another aspect, the isolated NS4 polypeptide is a polypeptide comprising the sequence of amino acid residues from about (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) 1 or about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6), or a fragment thereof which is biologically active or sufficient to provide a binding site for an anti-NS4 antibody, wherein the identification of NS4 polypeptide fragments that possess biological activity or provide a binding site

WO 02/101069

PCT/US02/10513

for an anti-NS4 antibody may be accomplished in a routine manner using techniques which are well known in the art. Preferably, the NS4 fragment retains a qualitative biological activity of a native NS4 polypeptide, including the ability to therapeutically treat obesity.

In yet another aspect, the isolated NS4 polypeptide is a polypeptide produced by (1) hybridizing a test DNA molecule under stringent conditions with (a) a DNA molecule encoding an NS4 polypeptide having the sequence of amino acid residues from about: (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) 1 or about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6), or (b) the complement of the DNA molecule of (a), and if the test DNA molecule has at least about an 80% sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% nucleic acid sequence identity to (a) or (b), (2) culturing a host cell comprising the test DNA molecule under conditions suitable for expression of the polypeptide, and (3) recovering the polypeptide from the cell culture.

In yet another embodiment, the invention provides chimeric molecules comprising an NS4 polypeptide fused to a heterologous polypeptide or amino acid sequence, wherein the NS4 polypeptide may comprise any NS4 polypeptide, variant or fragment thereof as hereinbefore described. An example of such a chimeric molecule comprises an NS4 polypeptide fused to an epitope tag sequence or an Fc region of an immunoglobulin.

In another embodiment, the invention provides an antibody as defined below which specifically binds to an NS4 polypeptide as hereinbefore described. Optionally, the antibody is a monoclonal antibody, an antibody fragment or a single chain antibody.

In yet another embodiment, the invention provides agonists and antagonists of a native NS4 polypeptide. In a particular embodiment, the agonist or antagonist is a small molecule, and antibody directed against amino acid sequence encoded by the NS4 polynucleotide, an antisense or ribozyme molecule or DNA or regulatory sequence replacement construct that can be used to inhibit or enhance expression of NS4 polynucleotide.

In yet another embodiment, the invention provides a method of identifying agonists or antagonists to an NS4 polypeptide which comprises contacting the NS4 polypeptide with a candidate molecule and monitoring a biological activity mediated by said NS4 polypeptide. In a particular aspect, the NS4 polypeptide is a native sequence NS4 polypeptide.

In yet another embodiment, the invention provides a composition of matter comprising an NS4 polypeptide, or an agonist or antagonist of an NS4 polypeptide as herein described, or an anti-NS4 antibody, in combination with a carrier. Optionally, the carrier is a pharmaceutically acceptable carrier. Such agonists or antagonists can include, for example, small molecules, antibodies directed against NS4 polypeptide, antisense and ribozyme molecules and DNA or regulatory sequence replacement constructs that can be used to inhibit or enhance expression of the NS4 polynucleotide.

In yet another embodiment, the invention provides a use of an NS4 polypeptide, or an agonist or antagonist thereof as herein described, or an anti-NS4 antibody, for the preparation of a medicament useful in the treatment of a condition which is responsive to the NS4 polypeptide, an agonist or antagonist thereof or an anti-NS4 antibody.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

In yet another embodiment, the invention provides a method of screening for a bioactive agent capable of binding to NS4. In one aspect, the method comprises adding a candidate bioactive agent to a sample of NS4 and determining the binding of said candidate agent to said NS4, wherein binding indicates a bioactive agent capable of binding to NS4.

5 In yet another embodiment, the invention provides a method of screening for a bioactive agent capable of modulating the activity of NS4. In one aspect, the method comprises the steps of adding a candidate bioactive agent to a sample of NS4 and determining an alteration in the biological activity of NS4, wherein an alteration indicates a bioactive agent capable of modulating the activity of NS4. In a particular aspect, NS4 activity is decreased uptake of glucose in cells. In another particular aspect, NS4 activity is increased leptin release from  
10 cells. In yet another particular aspect, NS4 activity is both decreased uptake of glucose and increased leptin release from cells. In yet another particular aspect, the cells are adipocytes. In another aspect, NS4 activity is increased oxidation of lipids and carbohydrates. In yet another particular aspect, the cells are liver or muscle cells.

In yet another embodiment, the invention provides a method of identifying a receptor for NS4. In one aspect, the method comprises combining NS4 with a composition comprising cell membrane material wherein  
15 said NS4 complexes with a receptor on said cell membrane material, and identifying said receptor as an NS4 receptor. In one aspect, the method includes a step of crosslinking said NS4 and receptor. The cell membrane can be from an intact cell or a cell membrane extract preparation.

In yet another embodiment, a method is provided for inducing leptin release from cells, preferably adipocytes. In one aspect, the method comprises administering NS4 to cells at least an amount effective to induce  
20 leptin release.

In yet another embodiment, a method is provided for inducing a decrease in glucose uptake in cells, preferably adipocyte cells. In one aspect, the method comprises administering NS4 to cells in at least an amount effective to induce a decrease in glucose uptake.

In yet another embodiment, the invention provides a method of treating an individual for a body weight  
25 disorder comprising administering to said individual a composition comprising at least a therapeutically effective amount of an NS4 polypeptide. In one aspect, the body weight disorder is obesity, cachexia or anorexia. In a further aspect, the body weight disorder is polycystic ovarian disease, skin infection, varicose veins, Acanthosis nigricans, and eczema, exercise intolerance, abnormal metabolism, hyperphagia, diabetes mellitus, insulin resistance, hypertension, hypercholesterolemia, stroke, hyperlipidemia, arteriosclerosis, cholelithiasis,  
30 osteoarthritis, orthopedic injury, thromboembolic disease, cancer, and coronary heart disease. In yet another aspect, the treated body weight disorder is associated with the disease cancer, cystic fibrosis or AIDS.

In yet another embodiment, the invention provides a method of treating an individual afflicted with a body weight disorder, comprising administering to said individual at least a therapeutically effective amount of  
35 an NS4 polypeptide, agonist or antagonist. In one aspect, the total body mass in an individual is reduced. In another aspect, adiposity (fat)/total body weight ratio is reduced. In yet another aspect, the lean body weight (non-adipose tissue)/total body weight is increased. In yet another aspect, the level of at least one triglyceride or free fatty acid in the serum of the individual is reduced. In yet another aspect, the metabolic rate of the individual is

WO 02/101069

PCT/US02/10513

increased or decreased.

In yet another embodiment, the invention provides methods for the diagnosis of mammalian body weight disorders, as well as for the identification of subjects susceptible to such disorders. In one aspect, the method comprises measuring the expression of NS4 in a patient sample suspected of exhibiting such a weight disorder and comparing the expression level to normal, in a way that if a difference is detected, a body weight disorder is detected. In another aspect, the method comprises detecting a mutation in an NS4 polynucleotide of a patient sample which correlates with the presence of a body weight disorder. In yet another aspect, the method comprises using the NS4 nucleic acid molecules as diagnostic hybridization probes, or as primers for diagnostic DNA amplification analysis to identify NS4 DNA mutations, allelic variations, or regulatory defects, such as defects in the expression of the NS4 polynucleotide. In yet another aspect, the invention relates to the use of DNA amplification analysis to identify individuals susceptible to such body weight disorders associated with a particular NS4 mutation, allelic variation or regulatory defect.

In yet another embodiment, the invention provides cellular and non-cellular assays to identify compounds that interact with NS4 polynucleotide and/or NS4 polypeptide. In a particular aspect, the cell-based assays of the invention utilize cells, cell lines, or engineered cells or cell lines that express the NS4 polypeptide.

In yet another embodiment, the invention provides a method for identifying a compound which modulates the expression of the mammalian NS4 polynucleotide and/or its level of biological activity. In one aspect, the method comprises:

- (a) contacting a compound to a cell that expresses an NS4 polynucleotide;
- (b) measuring the level of NS4 DNA expression in the cell; and
- (c) comparing the level obtained in (b) to NS4 expression level obtained in the absence of the compound;

such that if the level obtained in (b) differs from that obtained in the absence of the compound, a compound that modulates NS4 activity is identified.

In yet another embodiment, the invention provides a method for identifying compounds which modulates the biological activity of an NS4 polypeptide, comprising:

- (a) contacting a compound to a cell that contains an NS4 polypeptide;
- (b) measuring the level of NS4 polypeptide or activity in the cell; and
- (c) comparing the level obtained in (b) to the level of NS4 polypeptide or activity obtained in the absence of the compound;

such that if the level obtained in (b) differs from that obtained in the absence of the compound, a compound that modulates an NS4 activity is identified.

In yet another embodiment, the invention provides a method for identifying compounds which modulate the biological activity of an NS4 polypeptide, comprising:

- (a) administering a compound to a host (e.g., transgenic animal that expresses an NS4 transgene);
- (b) measuring the level of NS4 gene transcription, NS4 expression or activity of NS4 activity; and
- (c) comparing the level obtained in (b) to the level present in the absence of the compound;

WO 02/101069

PCT/US02/10513

such that if the level in (b) differs from that obtained in the absence of the compound, a compound that modulates an NS4 activity is identified.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

5 Figure 1A-1C show various native sequence NS4-encoding polynucleotides. Figure 1A (SEQ ID NO:1) shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) of a cDNA containing a coding sequence (*i.e.*, nucleotides 486-746) for a native sequence NS4, designated herein as "DNA146649-1789R1". Figure 1B (SEQ ID NO:2) shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:2) of a cDNA containing a coding sequence (*i.e.*, nucleotides 1784 to 2068) for a native sequence NS4, designated herein as "DNA149986-2883". Figure 1C (SEQ ID NO:3) shows the  
10 nucleotide sequence (SEQ ID NO:3) of a cDNA containing a coding sequence (*i.e.*, nucleotides 447 to 731) for a native sequence NS4, designated herein as "DNA149995-2871". Also presented in bold font and underline are the positions of the respective start and stop codons.

Figures 2A-2C show the amino acid sequence shows the amino acid sequences (SEQ ID NOS:4, 5 & 6), respectively, of native sequence NS4 polypeptides as derived from the coding sequences of SEQ ID NOS:1, 2 &  
15 3, respectively. Also shown are the approximate locations of various other important polypeptide domains.

Figures 3A, 3B and 3C are bar graphs demonstrating that NS4 (DNA146649-1789R1) transgenic mice weigh less than their non-transgenic littermates (Figure 3A), have a lower fat/total body weight ratio (Figure 3B) and have a greater lean muscle mass/total body weight ratio (Figure 3C).

Figure 4 shows a comparison between the polypeptides encoded by the native sequence NS4  
20 polynucleotides DNA146649-1789R1 (SEQ ID NO:1), DNA149986-2883 (SEQ ID NO:2) and DNA149995-2871 (SEQ ID NO:3).

Figure 5 is a Northern blot of DNA146649-1789R1 (SEQ ID NO:1) showing hybridization to various human tissue libraries. Figure 5A, 5B and 5C show expression levels in the various indicated tissues. Figure 5D  
25 shows expression in the tumor cell lines (from left to right): right: HL-60 (promyelocytic leukemia), HeLa S3 (cervical epitheloid carcinoma), K562 (chronic myelogenous leukemia), MOLT-4 (lymphoblastic leukemia), Raji (Burkitt's lymphoma), SW480 (colorectal adenocarcinoma), A549 (lung carcinoma) and G361 (melanoma).

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

##### I. Definitions

30 The terms "NS4 polypeptide", "NS4 protein" and "NS4" when used herein encompass native sequence NS4 and NS4 polypeptide variants (which are further defined herein). The NS4 polypeptide may be isolated from a variety of sources, such as from human tissue types or from another source, or prepared by recombinant and/or synthetic methods. The term "NS4 polynucleotide" includes nucleic acids which encode the polypeptides described in this paragraph.

35 A "native sequence NS4" comprises a polypeptide having the same amino acid sequence as an NS4 derived from nature. Such native sequence NS4 can be isolated from nature or can be produced by recombinant and/or synthetic means. The term "native sequence NS4" specifically encompasses naturally-occurring truncated

WO 02/101069

PCT/US02/10513

or secreted forms (*e.g.*, an extracellular domain sequence), naturally-occurring variant forms (*e.g.*, alternatively spliced forms) and naturally-occurring allelic variants of the NS4. In one embodiment of the invention, the native sequence NS4 is a mature or full-length native sequence NS4 comprising amino acids: (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6). Also, while the NS4 polypeptides disclosed in Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) and Figure 2C (SEQ ID NO:6) is shown to begin with the methionine residue designated herein as amino acid position 1, it is conceivable and possible that another methionine residue located either upstream or downstream from amino acid position 1 in Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) or Figure 2C (SEQ ID NO:6) may be employed as the starting amino acid residue for the respective NS4 polypeptide.

An NS4 polypeptide "extracellular domain" or "ECD" refers to a form of the NS4 polypeptide which is essentially free of the transmembrane and cytoplasmic domains. Ordinarily, an NS4 polypeptide ECD will have less than 1% of such transmembrane and/or cytoplasmic domains and preferably, will have less than 0.5% of such domains. It will be understood that any transmembrane domains identified for the NS4 polypeptides of the present invention are identified pursuant to criteria routinely employed in the art for identifying that type of hydrophobic domain. The exact boundaries of a transmembrane domain may vary but most likely by no more than about 5 amino acids at either end of the domain as initially identified herein. Optionally, therefore, an extracellular domain of an NS4 polypeptide may contain from about 5 or fewer amino acids on either side of the transmembrane domain/extracellular domain boundary as identified in the Examples or specification and such polypeptides, with or without the associated signal peptide, and nucleic acid encoding them, are contemplated by the present invention.

The approximate location of the "signal peptides" of the various NS4 polypeptides disclosed herein may be shown in the present specification and/or the accompanying figures. For example, for the proteins encoded by DNA146649-1789R1 (SEQ ID NO:1), DNA149986-2883 (SEQ ID NO:2) and DNA149995-2871 (SEQ ID NO:3), the signal sequences are identified in Figures 1A, 1B and 1C, respectively. It is noted, however, that the C-terminal boundary of a signal peptide may vary, but most likely by no more than about 5 amino acids on either side of the signal peptide C-terminal boundary as initially identified herein, wherein the C-terminal boundary of the signal peptide may be identified pursuant to criteria routinely employed in the art for identifying that type of amino acid sequence element (*e.g.*, Nielsen *et al.*, *Prot. Eng.* 10:1-6 (1997) and von Heinje *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 14:4683-4690 (1986)). Moreover, it is also recognized that, in some cases, cleavage of a signal sequence from a secreted polypeptide is not entirely uniform, resulting in more than one secreted species. These mature polypeptides, where the signal peptide is cleaved within no more than about 5 amino acids on either side of the C-terminal boundary of the signal peptide as identified herein, and the polynucleotides encoding them, are contemplated by the present invention.

"NS4 variant polypeptide" (including "NS4 mutant" or "NS4 polymorphism") means an active NS4 polypeptide as defined below having at least about 80% amino acid sequence identity with the amino acid sequence of (a) (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) 1 or about 20 to about

WO 02/101069

PCT/US02/10513

95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6); (b) (i) X to 87 of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) X to 95 of Figure 2B (SEQ ID NO:5) and (iii) X to 95 of Figure 2C (SEQ ID NO:6), wherein X is any amino acid from 14 to 24 of Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) and Figure 2C (SEQ ID NO:6); or (c) another specifically derived fragment of the amino acid sequence shown in Figures 2A, 2B and 2C (SEQ ID NOS:4, 5, 6), respectively. Such NS4 variant polypeptides include, for instance, NS4 polypeptides wherein one or more amino acid residues are added, or deleted, at the N- and/or C-terminus, as well as within one or more internal domains, of the sequence of Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) and Figure 2C (SEQ ID NO:6). Ordinarily, an NS4 variant polypeptide will have at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98% or 99% amino acid sequence identity with (a) (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6); (b) (i) X to 87 of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) X to 95 of Figure 2B (SEQ ID NO:5) and (iii) X to 95 of Figure 2C (SEQ ID NO:6), wherein X is any amino acid from 14 to 24 of Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) and Figure 2C (SEQ ID NO:6); or (c) another specifically derived fragment of the amino acid sequence shown in Figures 2A, 2B and 2C (SEQ ID NOS:4, 5, 6), respectively. NS4 variant polypeptides explicitly do not encompass the native NS4 polypeptide sequence. Ordinarily, NS4 variant polypeptides are at least about 10 amino acids in length, alternatively at least about 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 amino acids in length, or more.

"Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to the NS4 polypeptide sequences identified herein is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in an NS4 sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full-length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are obtained as described below by using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1 below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table 1 has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

For purposes herein, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A. As examples of % amino acid sequence identity calculations, Tables 2 and 3 demonstrate how to calculate the % amino acid sequence identity of the amino acid sequence designated "Comparison Protein" to the amino acid sequence designated "NS4". Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described above using the ALIGN-2 sequence comparison computer program.

"NS4 variant polynucleotide" or "NS4 variant nucleic acid sequence" means a nucleic acid molecule which encodes an active NS4 polypeptide as defined below and which has at least about 80% nucleic acid sequence identity with the nucleic acid sequence encoding amino acid residues: (a) (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6); (b) (i) X to 87 of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) X to 95 of Figure 2B (SEQ ID NO:5) and (iii) X to 95 of Figure 2C (SEQ ID NO:6), wherein X is any amino acid from 14 to 24 of Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) and Figure 2C (SEQ ID NO:6); or (c) another specifically derived fragment of the amino acid sequence shown in Figures 2A, Figure 2B or Figure 2C (SEQ ID NO:4, 5, 6), respectively. Ordinarily, an NS4 variant polynucleotide will have at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% nucleic acid sequence identity with: (a) a nucleic acid sequence which encodes residues (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6); (b) a nucleic acid sequence which encodes amino acids (i) X to 87 of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) X to 95 of Figure 2B (SEQ ID NO:5) and (iii) X to 95 of Figure 2C (SEQ ID NO:6), wherein X is any amino acid from 14 to 24 of Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) and Figure 2C (SEQ ID NO:6); or (c) a nucleic acid sequence which encodes another specifically derived fragment of the amino acid sequence shown in Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) or Figure 2C (SEQ ID NO:6). NS4 polynucleotide variants do not encompass the native NS4 nucleotide sequence.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Ordinarily, NS4 variant polynucleotides are at least about 5 nucleotides in length, alternatively at least about 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, or 1000 nucleotides in length, wherein in this context the term "about" means the referenced nucleotide sequence length plus or minus 10% of that referenced length.

10 "Percent (%) nucleic acid sequence identity" with respect to the NS4 polypeptide-encoding nucleic acid sequences identified herein is defined as the percentage of nucleotides in a candidate sequence that are identical with the nucleotides in a NS4 polypeptide-encoding nucleic acid sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Alignment for purposes of determining percent nucleic acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full-length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % nucleic acid sequence identity values are obtained as described below by using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the

20 ALIGN-2 program is provided in Table 1 below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table 1 has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXUS10087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1. The ALIGN-2 program should be

25 compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

For purposes herein, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

30

$$100 \text{ times the fraction } W/Z$$

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C.

35

WO 02/101069

PCT/US02/10513

As examples of % nucleic acid sequence identity calculations, Tables 4 and 5 demonstrate how to calculate the % nucleic acid sequence identity of the nucleic acid sequence designated "Comparison DNA" to the nucleic acid sequence designated "NS4-DNA". Unless specifically stated otherwise, all % nucleic acid sequence identity values used herein are obtained as described above using the ALIGN-2 sequence comparison computer program.

5 In other embodiments, NS4 variant polynucleotides are nucleic acid molecules that encode an active NS4 polypeptide and which are capable of hybridizing, preferably under stringent hybridization and wash conditions, to nucleotide sequences encoding the full-length NS4 polypeptide shown in Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) or Figure 2C (SEQ ID NO:6). NS4 variant polypeptides may be those that are encoded by an NS4 variant polynucleotide.

10 "Isolated," when used to describe the various polypeptides disclosed herein, means polypeptide that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Preferably, the isolated polypeptide is free of association with all components with which it is naturally associated. Contaminant components of its natural environment are materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the polypeptide will be purified (1) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (2) to homogeneity by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated polypeptide includes polypeptide *in situ* within recombinant cells, since at least one component of the NS4 natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated polypeptide will be prepared by at least one purification step.

20 An "isolated" nucleic acid molecule encoding a NS4 polypeptide is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the NS4-encoding nucleic acid. Preferably, the isolated nucleic acid is free of association with all components with which it is naturally associated. An isolated NS4-encoding nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated nucleic acid molecules therefore are distinguished from the NS4-encoding nucleic acid molecule as it exists in natural cells. However, an isolated nucleic acid molecule encoding an NS4 polypeptide includes NS4-encoding nucleic acid molecules contained in cells that ordinarily express NS4 where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

30 The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

35 Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome

WO 02/101069

PCT/US02/10513

binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers, for example, single anti-NS4 monoclonal antibodies (including agonist, antagonist, and neutralizing antibodies), anti-NS4 antibody compositions with polypeptidic specificity, single chain anti-NS4 antibodies, and fragments of anti-NS4 antibodies (see below). The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts.

"Stringency" of hybridization reactions is readily determinable by one of ordinary skill in the art, and generally is an empirical calculation dependent upon probe length, washing temperature, and salt concentration. In general, longer probes require higher temperatures for proper annealing, while shorter probes need lower temperatures. Hybridization generally depends on the ability of denatured DNA to reanneal when complementary strands are present in an environment below their melting temperature. The higher the degree of desired homology between the probe and hybridizable sequence, the higher the relative temperature which can be used. As a result, it follows that higher relative temperatures would tend to make the reaction conditions more stringent, while lower temperatures less so. For additional details and explanation of stringency of hybridization reactions, see Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Stringent conditions" or "high stringency conditions", as defined herein, may be identified by those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C.

"Moderately stringent conditions" may be identified as described by Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, and include the use of washing solution and hybridization conditions (*e.g.*, temperature, ionic strength and %SDS) less stringent than those described above. An example of moderately stringent conditions is overnight incubation at 37°C in a solution comprising: 20% formamide, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5 x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 mg/ml denatured sheared salmon sperm DNA, followed

WO 02/101069

PCT/US02/10513

by washing the filters in 1 x SSC at about 37-50°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

The term "epitope tagged" when used herein refers to a chimeric polypeptide comprising an NS4 polypeptide fused to a "tag polypeptide". The tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the polypeptide to which it is fused. The tag polypeptide preferably also is fairly unique so that the antibody does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally have at least six amino acid residues and usually between about 8 and 50 amino acid residues (preferably, between about 10 and 20 amino acid residues).

As used herein, the term "immunoadhesin" designates antibody-like molecules which combine the binding specificity of a heterologous protein (an "adhesin") with the effector functions of immunoglobulin constant domains. Structurally, the immunoadhesins comprise a fusion of an amino acid sequence with the desired binding specificity which is other than the antigen recognition and binding site of an antibody (*i.e.*, is "heterologous"), and an immunoglobulin constant domain sequence. The adhesin part of an immunoadhesin molecule typically is a contiguous amino acid sequence comprising at least the binding site of a receptor or a ligand. The immunoglobulin constant domain sequence in the immunoadhesin may be obtained from any immunoglobulin, such as IgG-1, IgG-2, IgG-3, or IgG-4 subtypes, IgA (including IgA-1 and IgA-2), IgE, IgD or IgM.

"Active" or "activity" for the purposes herein refers to form(s) of NS4 which retain a biological and/or an immunological activity of native or naturally-occurring NS4, wherein "biological" activity refers to a biological function (either inhibitory or stimulatory) caused by a native or naturally-occurring NS4 other than the ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by a native or naturally-occurring NS4 and an "immunological" activity refers to the ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by a native or naturally-occurring NS4. A preferred biological activity includes any one or more of the following activities: decreased body weight, decreased adiposity (*e.g.*, fat/body weight ratio), increased lean muscle mass. Alternative definitions of biological activity include: increased metabolism (or metabolic rate), decreased glucose uptake into adipocytes, increased leptin release from adipocytes, decreased triglycerides, decreased free fatty acids in an individual. It is understood that some of the activities of NS4 are directly induced by NS4 and some are indirectly induced, however, each are the result of the presence of NS4 and would not otherwise have the result in the absence of NS4.

"Treatment" is an intervention performed with the intention of preventing the development or altering the pathology of a disorder. Accordingly, "treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) the targeted pathological condition or disorder. Individuals in need of treatment include those already with the disorder as well as those in which the disorder is to be prevented. In treatment of a body weight disorder, a therapeutic agent may directly decrease or increase the magnitude of response of a pathological component of the disorder (*e.g.*, decreased total body weight, decrease fat/body weight ratio, increased lean muscle mass/body weight ratio), or render the disease more susceptible to treatment by other therapeutic agents or methods. Alternative metrics for determining the

WO 02/101069

PCT/US02/10513

effectiveness of treatment include: decreased glucose uptake into adipocytes, increased leptin release from adipocytes, decreased levels of serum triglycerides or fatty acids, increased metabolic rate, *etc.*

The term "effective amount" is at least the minimum concentration of NS4 which causes, induces or results in either a detectable improvement in an *in vitro* cell-based model of a body weight disorder. For example, decreased glucose uptake into adipocytes, increased leptin release from adipocytes, *etc.* Furthermore, a "therapeutically effective amount" is at least the minimum concentration (amount) of NS4 administered to a mammal which would be effective in at least attenuating or improving a pathological symptom associated with a body weight disorder. For example, decreased body weight, decreased fat/body weight ratio, increase lean muscle mass/body weight ratio, increased metabolic rate, decreased serum triglycerides or fatty acids, *etc.*

"Treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) the targeted pathological condition or disorder. Those in need of treatment

include those already with the disorder as well as those prone to have the disorder or those in whom the disorder is to be prevented.

"Chronic" administration refers to administration of the agent(s) in a continuous mode as opposed to an acute mode, so as to maintain the initial therapeutic effect (activity) for an extended period of time. "Intermittent" administration is treatment that is not consecutively done without interruption, but rather is cyclic in nature.

"Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, cats, cattle, horses, sheep, pigs, goats, rabbits, ferrets, *etc.* Preferably, the mammal is human.

"Individual" is any subject patient, preferably a mammal, more preferably a human.

"Body weight disorder" refers to disorders which are characterized by an abnormal (*e.g.*, either higher or lower than normal) body weight. For example, individuals having a Body Mass Index (BMI) of less than 19.9 or 25.9 or greater have an abnormal body weight. Examples of body weight disorders includes obesity, cachexia, anorexia, bulimia, polycystic ovarian disease, craniopharyngioma, the Prader-Willi Syndrome, Frohlich's syndrome, Type II diabetes, GH-deficient subjects, normal variant short stature, Turner's syndrome.

"Obesity" refers to a condition whereby a mammal has a Body Mass Index (BMI), which is calculated as weight (kg) per height<sup>2</sup> (meters), of at least 25.9. Conventionally, those persons with normal weight have a BMI of 19.9 to less than 25.9. The obesity herein may be due to any cause, whether genetic or environmental.

Examples of disorders that may result in obesity or be the cause of obesity include overeating and bulimia, polycystic ovarian disease, craniopharyngioma, the Prader-Willi Syndrome, Frohlich's syndrome, Type II diabetes, GH-deficient subjects, normal variant short stature, Turner's syndrome, and other pathological conditions showing reduced metabolic activity or a decrease in resting energy expenditure as a percentage of total fat-free mass, *e.g.*, children with acute lymphoblastic leukemia.

"Conditions associated with obesity" refer to conditions which are the result of or which are exasperated by obesity, such as, but not limited to dermatological disorders such as infections, varicose veins, Acanthosis nigricans, and eczema, exercise intolerance, abnormal metabolism, diabetes mellitus, insulin resistance,

WO 02/101069

PCT/US02/10513

hyperphagia, hypertension, hypercholesterolemia, hyperlipidemia, cholelithiasis, osteoarthritis, orthopedic injury, thromboembolic disease, cancer, and coronary (or cardiovascular) heart disease, particular those cardiovascular conditions associated with high triglycerides and free fatty acids in an individual.

5 Administration "in combination with" one or more further therapeutic agents includes simultaneous (concurrent) and consecutive administration in any order.

The term "antagonist" is used in the broadest sense, and includes any molecule that partially or fully blocks, inhibits, or neutralizes a biological activity of a native NS4 polypeptide disclosed herein. In a similar manner, the term "agonist" is used in the broadest sense and includes any molecule that mimics a biological activity of a native NS4 polypeptide disclosed herein. Suitable agonist or antagonist molecules specifically  
10 include agonist or antagonist antibodies or antibody fragments, fragments or amino acid sequence variants of native NS4 polypeptides, peptides, small organic molecules, etc. Methods for identifying agonists or antagonists of an NS4 polypeptide may comprise contacting an NS4 polypeptide with a candidate agonist or antagonist molecule and measuring a detectable change in one or more biological activities normally associated with the NS4 polypeptide.

15 "Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptide; proteins, such as serum albumin, gelatin, or  
20 immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN<sup>®</sup>, polyethylene glycol (PEG), and PLURONICS<sup>®</sup>.

25 "Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies (Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments,  
30 each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, a designation reflecting the ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an F(ab')<sub>2</sub> fragment that has two antigen-combining sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and -binding site. This region consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent  
35 association. It is in this configuration that the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the VH-VL dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific

WO 02/101069

PCT/US02/10513

for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. Fab fragments differ from Fab' fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. F(ab)', antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The "light chains" of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa and lambda, based on the amino acid sequences of their constant domains.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA<sub>1</sub>, and IgA<sub>2</sub>.

"Single-chain Fv" or "sFv" antibody fragments comprise the VH and VL domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the VH and VL domains which enables the sFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of sFv, see Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy-chain variable domain (VH) connected to a light-chain variable domain (VL) in the same polypeptide chain (VH - VL). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993).

An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

An antibody that "specifically binds to" or is "specific for" a particular polypeptide or an epitope on a particular polypeptide is one that binds to that particular polypeptide or epitope on a particular polypeptide without substantially binding to any other polypeptide or polypeptide epitope.

5 The word "label" when used herein refers to a detectable compound or composition which is conjugated directly or indirectly to the antibody so as to generate a "labeled" antibody. The label may be detectable by itself (e.g. radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition which is detectable.

10 By "solid phase" is meant a non-aqueous matrix to which the antibody of the present invention can adhere. Examples of solid phases encompassed herein include those formed partially or entirely of glass (e.g., controlled pore glass), polysaccharides (e.g., agarose), polyacrylamides, polystyrene, polyvinyl alcohol and silicones. In certain embodiments, depending on the context, the solid phase can comprise the well of an assay plate; in others it is a purification column (e.g., an affinity chromatography column). This term also includes a discontinuous solid phase of discrete particles, such as those described in U.S. Patent No. 4,275,149.

15 A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant which is useful for delivery of a drug (such as an NS4 polypeptide or antibody thereto) to a mammal. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

A "small molecule" is defined herein to have a molecular weight below about 500 Daltons.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1

```

5 /*
  *
  * C-C increased from 12 to 15
  * Z is average of EQ
  * B is average of ND
  * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
10 #define _M -8 /* value of a match with a stop */
  */
int day[26][26] = {
15 /* A */ { 2, 0, 2, 0, 0, -4, 1, -1, 1, 0, -1, 2, -1, 0, M, 1, 0, 2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
  /* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
  /* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -3, -6, -3, -4, M, -3, -3, -4, 0, 2, 0, 2, -8, 0, 0, 5},
  /* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
  /* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
20 /* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
  /* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
  /* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
  /* I */ {-1, -2, -2, -2, -1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, 2, M, -2, -2, 2, 1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, 2},
  /* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
25 /* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
  /* L */ {-2, 3, 6, 4, -3, 2, -4, 2, 2, 0, -3, 6, 4, 3, M, -3, -2, 3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
  /* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, M, -2, -1, 0, -2, 1, 0, 2, -4, 0, -2, 1},
  /* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, 2, 1},
  /* O */ { M, M, M, M, M, M, M, M, M, M, M, M, M, M, M, 0, M, M, M, M, M, M, M, M, M},
30 /* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, 5, 0},
  /* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
  /* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, -2, 2, 0, 3, -3, 0, 0, M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
  /* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
  /* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
35 /* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
  /* V */ { 0, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, 2, M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, 2},
  /* W */ {-6, -5, -8, -7, 7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, M, -6, -3, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
  /* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
  /* Y */ {-3, -3, 0, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, M, -3, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 10, 4},
40 /* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

45

50

55

60

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1 (cont. 1)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
5 #include <ctype.h>

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
10 #define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0 8 /* penalty for a gap */
15 #define DINS1 1 /* penalty per base */
#define PINS0 8 /* penalty for a gap */
#define PINS1 4 /* penalty per residue */

struct jmp {
20     short n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
     unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq */
}; /* limits seq to 2^16-1 */

struct diag {
25     int score; /* score at last jmp */
     long offset; /* offset of prev block */
     short jmp; /* current jmp index */
     struct jmp *jp; /* list of jmps */
};

30 struct path {
     int spc; /* number of leading spaces */
     short n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
35     int x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char *ofile; /* output file name */
char *namex[2]; /* seq names: getseqs() */
40 char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqx[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: nw() */
int dmax0; /* final diag */
int dnt; /* set if dnt: main() */
45 int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int len0, len1; /* seq lens */
int ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max scores: nw() */
int *xbm; /* bitmap for matching */
50 long offset; /* current offset in jmp file */
struct diag *dx; /* holds diagonals */
struct path *pp[2]; /* holds path for seqs */

55 char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *g_alloc();

```

60

Page 1 of nw.h

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1 (cont. 2)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
5  * usage: prog file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ;, > or < are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
10 * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
15 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

20 static _dbval[26] = {
    1,14,2,15,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

25 static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A')),|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

30 main(ac, av)                                main
{
    int ac;
    char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
35         fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ; or < are ignored\n");
40         fprintf(stderr, "Output is in the file 'align.out'\n");
        exit(1);
    }
    names[0] = av[1];
    names[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(names[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(names[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

50     endgaps = 0;                                /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";                          /* output file */

    nw();                                /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();                            /* get the actual jmps */
    print();                                /* print stats, alignment */
55     cleanup();                            /* unlink any tmp files */
}

```

Page 1 of nw.c

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1 (cont. 3)

```

/* do the alignment, return best score: msin()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM-250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
10 nw()                               nw
{
    char      *px, *py;           /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;      /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;        /* keep track of delx */
    int       *tmp;               /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;                /* score for each type */
    int       ins0, ins1;         /* insertion penalties */
    register  id;                 /* diagonal index */
    register  ij;                 /* jmp index */
    register  *col0, *col1;       /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;             /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

25    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
35         for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
             col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
             ndely[yy] = yy;
         }
         col0[0] = 0;           /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
40         for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
             dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
50         if (endgaps) {
             if (xx == 1)
                 col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
             else
                 col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
             ndelx = xx;
        }
        else {
55             col1[0] = 0;
             delx = -ins0;
             ndelx = 0;
        }
60     }

```

page 2 of nw.c

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1 (cont. 4)

...nw

```

5   for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
6       mis = col0[yy-1];
7       if (dna)
8           mis += (xbm["px-'A']&xbm["py-'A'])? DMAT : DMIS;
9       else
10          mis += _day["px-'A']["py-'A'];
11
12          /* update penalty for del in x seq;
13             * favor new del over ongong del
14             * ignore MAXGAP if weighting endgaps
15             */
16          if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
17              if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
18                  dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
19                  ndely[yy] = 1;
20              } else {
21                  dely[yy] -= ins1;
22                  ndely[yy]++;
23              }
24          } else {
25              if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
26                  dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
27                  ndely[yy] = 1;
28              } else
29                  ndely[yy]++;
30          }
31
32          /* update penalty for del in y seq;
33             * favor new del over ongong del
34             */
35          if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
36              if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
37                  delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
38                  ndelx = 1;
39              } else {
40                  delx -= ins1;
41                  ndelx++;
42              }
43          } else {
44              if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
45                  delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
46                  ndelx = 1;
47              } else
48                  ndelx++;
49          }
50
51          /* pick the maximum score; we're favoring
52             * mis over any del and delx over dely
53             */

```

55

60

Page 3 of nw.c

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1 (cont. 5)

...nw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
5   coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijump;
10   if (dx[id].jp.n[0] && (dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijump++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
15             writejumps(id);
            ij = dx[id].ijump = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
20   } else {
        coll[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijump;
25   if (dx[id].jp.n[0] && (dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijump++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
30             writejumps(id);
            ij = dx[id].ijump = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
35   }
    if (xx == len0 && yy < len1) {
        /* last col
        */
        if (endgaps)
45         coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
        if (coll[yy] > smax) {
            smax = coll[yy];
            dmax = id;
        }
    }
50   }
    if (endgaps && xx < len0)
        coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
    if (coll[yy-1] > smax) {
55         smax = coll[yy-1];
        dmax = id;
    }
    tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
60   }
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)coll);
}

```

Page 4 of nw.c

WO 02/101069

PCT/US02/10513

**Table 1 (cont. 6)**

```

/*
*
5 * print() -- only routine visible outside this module
*
* static:
* getmat() -- trace back best path, count matches: print()
* pr_align() -- print alignment of described in array pl: print()
10 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
* nums() -- put out a number line: dumpblock()
* putline() -- put out a line (name, [num], seq, [mm]): dumpblock()
* stars() -- put a line of stars: dumpblock()
* stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
15 */

#include "nw.h"

#define SPC 3
20 #define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
25 FILE *fx; /* output file */

print()
{
30 int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
cleanup(1);
}
35 fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", name[0], len0);
fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", name[1], len1);
olen = 60;
lx = len0;
40 ly = len1;
firstgap = lastgap = 0;
if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
ly -= pp[0].spc;
}
45 else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
lx -= pp[1].spc;
}
50 if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
lastgap = len0 - dmax0 - 1;
lx -= lastgap;
}
55 else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
ly -= lastgap;
}
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
pr_align();
60 }

```

print

Page 1 of nwprint.c

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1 (cont. 7)

```

5  /* trace back the best path, count matches
   */
   static
   getmat(kx, ly, firstgap, lastgap)                               getmat
10  {
       int ix, ly; /* "core" (minus endgaps) */
       int firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */

       int nm, i0, i1, siz0, siz1;
       char outx[32];
       double pct;
15     register n0, n1;
       register char *p0, *p1;

       /* get total matches, score
        */
20     i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
       p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
       p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
       n0 = pp[1].spc + 1;
       n1 = pp[0].spc + 1;

25     nm = 0;
       while ( *p0 && *p1 ) {
           if (siz0) {
30             p1++;
             n1++;
             siz0--;
           }
           else if (siz1) {
35             p0++;
             n0++;
             siz1--;
           }
           else {
40             if (xbrn[*p0-'A']&xbrn[*p1-'A'])
                 nm++;
             if (n0++ == pp[0].x[i0])
                 siz0 = pp[0].n[i0++];
             if (n1++ == pp[1].x[i1])
                 siz1 = pp[1].n[i1++];
45             p0++;
             p1++;
           }
       }

50     /* pct homology:
       * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
       * else, knock off overhangs and take shorter core
       */
       if (endgaps)
55         lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
       else
           lx = (lx < ly)? lx : ly;
       pct = 100.*((double)nm/(double)lx);
       fprintf(fx, "\n");
60     fprintf(fx, "%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
           nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

Page 2 of nwprint.c

WO 02/101069

PCT/US02/10513

**Table 1 (cont. 8)**

```

5      fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
      if (gapx) {
          (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
              ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "": "s");
          fprintf(fx, "%s", outx);
10     fprintf(fx, "\n", gaps in second sequence: %d", gapy);
      if (gapy) {
          (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
              ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "": "s");
          fprintf(fx, "%s", outx);
15     }
      if (dna)
          fprintf(fx,
              "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
              smax, DMAT, DMIS, DINSO, DINSI);
20     else
          fprintf(fx,
              "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
              smax, PINSO, PINSI);
      if (endgaps)
          fprintf(fx,
25         "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
              firstgap, (dna)? "base": "residue", (firstgap == 1)? "": "s",
              lastgap, (dna)? "base": "residue", (lastgap == 1)? "": "s");
      else
          fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
30 }

static nm; /* matches in core -- for checking */
static lmax; /* lengths of stripped file names */
35 static ij[2]; /* jmp index for a path */
static nc[2]; /* number at start of current line */
static ni[2]; /* current elem number -- for gapping */
static siz[2];
static char *ps[2]; /* ptr to current element */
40 static char *psn[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
45 * print alignment of described in struct path pp[]
*/
static
pr_align()
{
50     int nm; /* char count */
     int more;
     register i;

     for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
55         nm = stripname(name[i]);
         if (nm > lmax)
             lmax = nm;

         nc[i] = 1;
         ni[i] = 1;
60         siz[i] = ij[i] = 0;
         ps[i] = seqx[i];
         po[i] = out[i];
     }
65 }

```

...getmat

pr\_align

Page 3 of nwprint.c



WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1 (cont. 10)

```

5      (void) puts("n", fx);
      for (i = 0; i < 2; i++) {
          if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
              if (i == 0)
                  nums(i);
              if (i == 0 && *out[1])
                  stars();
              putline(i);
              if (i == 0 && *out[1])
                  fprintf(fx, star);
              if (i == 1)
                  nums(i);
          }
      }
20     /*
      * put out a number line: dumpblock()
      */
      static
25     nums(ix)          /* index in out[] holding seq line */
      {
          char          nline[P_LLINE];
          register char i, j;
          register char *pn, *px, *py;
30     for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
          *pn = ' ';
          for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
35     if (*py == ' ' || *py == '\t')
          *pn = ' ';
          else {
              if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                  j = (i < 0)? -i : i;
                  for (px = pn; j / 10, px--)
40     if (j < 0)
                      *px = '\t';
              }
              else
45     *pn = ' ';
              i++;
          }
          *pn = '\0';
          nc[ix] = i;
          for (pn = nline; *pn; pn++)
          (void) puts("pn", fx);
          (void) puts("n", fx);
55     }
      /*
      * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
      */
      static
60     putline(ix)
      {

```

...dumpblock

nums

putline

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1 (cont. 11)

```

5      int          i;
      register char *px;
      for (px = name[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
          (void)putc(*px, fx);
10     for (; i < lmax+P_SPC; i++)
          (void)putc(' ', fx);

      /* these count from 1:
      * ni[] is current element (from 1)
      * nc[] is number at start of current line
      */
15     for (px = out[ix]; *px; px++)
          (void)putc(*px&0x7F, fx);
          (void)putc('\n', fx);
20 }

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
25 static
stars()
{
    int
    register char *i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;
30     if (!(*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(p0[0] == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p0[1] == ' ')))
        return;
35     px = stars;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

40     for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbrn[*p0-'A']&xbrn[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
45             }
            else if (ldna && .day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
50         }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
55     }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}
60

```

...putline

stars

Page 6 of nwprint.c

WO 02/101069

PCT/US02/10513

**Table 1 (cont. 12)**

```
5  /*
   * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
   */
   static
   stripname(pn)                                stripname
10  {
   char *pn; /* file name (may be path) */
   register char *px, *py;
   py = 0;
   for (px = pn; *px; px++)
15     if (*px == '/')
         py = px + 1;
   if (py)
       (void) strepy(pn, py);
   return(strlen(pn));
20 }

25

30

35

40

45

50

55

60
```

Page 7 of nwprint.c

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1 (cont. 13)

```

5  /* cleanup() -- cleanup any tmp file
   * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
   * g_malloc() -- calloc() with error checkin
   * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
   * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
10 #include "nw.h"
   #include <sys/file.h>

   char *jname = "/tmp/hongXXXXXX"; /* tmp file for jumps */
15 FILE *fj;

   int cleanup(); /* cleanup tmp file */
   long lseek();

20 /* remove any tmp file if we blow
   */
   cleanup()
   {
25     int i;
       if (fj)
           (void) unlink(jname);
       exit(i);
   }

30 /* read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
   * skip lines starting with ';', '<', or '>'
   * seq in upper or lower case
   */
35 char *
   getseq(file, len)
       char *file; /* file name */
       int *len; /* seq len */
40 {
       char line[1024], *pseq;
       register char *px, *py;
       int nargc, tlen;
       FILE *fp;

45     if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
           fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
           exit(1);
       }
       tlen = nargc = 0;
50     while (!gets(line, 1024, fp)) {
           if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
               continue;
           for (px = line; *px != '\n'; px++)
               if (isupper(*px) || islower(*px))
                   tlen++;
55     }
       if ((pseq = malloc(unsigned)(tlen+6)) == 0) {
           fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
           exit(1);
60     }
       pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

Page 1 of nwsubr.c

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1 (cont. 14)

```

5      py = pseq + 4;
      *len = llen;
      rewind(fp);

      while (fgets(line, 1024, fp)) {
10         if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
            for (px = line; *px != '\n'; px++) {
                if (isupper(*px))
                    *py++ = *px;
                else if (islower(*px))
                    *py++ = toupper(*px);
                if (index("ATGCU", *(py-1)))
                    msgc++;
            }
            *py++ = '\0';
            *py = '\0';
            (void) fclose(fp);
            dms = msgc > (llen/3);
            return(pseq+4);
25     }

     char *
     g_alloc(msg, nx, sz)
     char *msg; /* program, calling routine */
     int nx, sz; /* number and size of elements */
30     {
         char *px, *calloc();

         if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
35             if (*msg) {
                 fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                 exit(1);
             }
         }
         return(px);
40     }

     /*
     * get final jumps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
     */
45     readjumps()
     {
         int fd = -1;
         int siz, i0, i1;
         register i, j, xx;
50         if (fd) {
             (void) fclose(fp);
             if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                 fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                 cleanup(1);
             }
55         }
         for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
             while (1) {
                 for (j = dx[dmax].tjmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                     ;
60

```

...getseq

g\_alloc

readjumps

Page 2 of nwsubr.c

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1 (cont. 15)

...readjumps

```

5         if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].jmp = MAXJMP-1;
        }
10        else
            break;
        }
        if (i >= JMPS) {
            fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
            cleanup(1);
15        }
        if (j >= 0) {
            siz = dx[dmax].jp.n[j];
            xx = dx[dmax].jp.x[j];
            dmax += siz;
20            if (siz < 0) { /* gap in second seq */
                pp[1].n[i1] = -siz;
                xx += siz;
                /* id = xx - yy + len1 - 1
                */
                pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                gapy += +;
                ngapy -= siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
30            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
            i1++;
        }
        else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
            pp[0].n[i0] = siz;
            pp[0].x[i0] = xx;
            gapx += +;
            ngapx += siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
35            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
            i0++;
        }
        }
        else
            break;
45    }
    /* reverse the order of jumps
    */
    for (j = 0, i0--, j < i0; j++, i0--) {
50        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
    }
    for (j = 0, i1--, j < i1; j++, i1--) {
55        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
    if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fj) {
60        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
    }

```

Page 3 of nwsubr.c

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Table 1 (cont. 16)

```

5  /*
   * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw( )
   */
   writejumps(ix)                                writejumps
   {
10     char *mktemp();
       if (!f) {
15         if (mktemp(jname) < 0) {
             fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
             cleanup(1);
         }
         if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
             fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
             exit(1);
         }
20     }
       (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
       (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
   }
25
30
35
40
45
50
55
60

```

Page 4 of nwsubr.c

WO 02/101069

PCT/US02/10513

**Table 2**

NS4 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX (Length = 15 amino acids)  
 Comparison Protein XXXXXYYYYYYYY (Length = 12 amino acids)

5 % amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the NS4 polypeptide) =

10 5 divided by 15 = 33.3%

**Table 3**

NS4 XXXXXXXXXXXX (Length = 10 amino acids)  
 Comparison Protein XXXXXYYYYYYZZYZ (Length = 15 amino acids)

15 % amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the NS4 polypeptide) =

20 5 divided by 10 = 50%

**Table 4**

NS4-DNA NNNNNNNNNNNNNN (Length = 14 nucleotides)  
 Comparison DNA NNNNNLLLLLLLLLLL (Length = 16 nucleotides)

30 % nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the NS4-DNA nucleic acid sequence) =

35 6 divided by 14 = 42.9%

**Table 5**

NS4-DNA NNNNNNNNNNNN (Length = 12 nucleotides)  
 Comparison DNA NNNLLLLV (Length = 9 nucleotides)

40 % nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the NS4-DNA nucleic acid sequence) =

50 4 divided by 12 = 33.3%

WO 02/101069

PCT/US02/10513

II. Compositions and Methods of the InventionA. Full-length NS4 Polypeptide

The present invention provides newly identified and isolated nucleotide sequences encoding polypeptides referred to in the present application as NS4 (alternatively UNQ5830, UNQ5924, UNQ5830). In particular, cDNA encoding an NS4 polypeptide has been identified and isolated, as disclosed in further detail in the Examples below.

It is noted that proteins produced in separate expression rounds may be given different PRO numbers but the UNQ number is unique for any given DNA and the encoded protein, and will not be changed. However, for sake of simplicity, in the present specification the protein encoded by DNA146649-1789R1, DNA149986-2883 or DNA149995-2871 as well as all further native homologues and variants included in the foregoing definition of NS4 (also sometimes referred to as PRO19652, PRO19816 and PRO19650), will be referred to as "NS4", regardless of their origin or mode of preparation.

As disclosed in the Examples below, cDNA clones designated herein as DNA146649-1789R1, DNA149986-2883 or DNA149995-2871 have been deposited with the ATCC. The actual nucleotide sequence of the clones can readily be determined by the skilled artisan by sequencing of the deposited clones using routine methods in the art.

The predicted amino acid sequence can be determined from the nucleotide sequence using routine skill. For the NS4 polypeptides and encoding nucleic acid described herein, Applicants have identified what is believed to be the reading frame best identifiable with the sequence information available at the time.

B. NS4 Variants

In addition to the full-length native sequence NS4 polypeptides described herein, it is contemplated that NS4 variants can be prepared. NS4 variants can be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the NS4 DNA, and/or by synthesis of the desired NS4 polypeptide. Those skilled in the art will appreciate that amino acid changes may alter post-translational processes of the NS4, such as changing the number or position of glycosylation sites or altering the membrane anchoring characteristics.

Variations in the native full-length sequence NS4 or in various domains of the NS4 described herein, can be made, for example, using any of the techniques and guidelines for conservative and non-conservative mutations set forth, for instance, in U.S. Patent No. 5,364,934. Variations may be a substitution, deletion or insertion of one or more codons encoding the NS4 that results in a change in the amino acid sequence of the NS4 as compared with the native sequence NS4. Optionally the variation is by substitution of at least one amino acid with any other amino acid in one or more of the domains of the NS4. Guidance in determining which amino acid residue may be inserted, substituted or deleted without adversely affecting the desired activity may be found by comparing the sequence of the NS4 with that of homologous known protein molecules and minimizing the number of amino acid sequence changes made in regions of high homology. Amino acid substitutions can be the result of replacing one amino acid with another amino acid having similar structural and/or chemical properties, such as the replacement of a leucine with a serine, *i.e.*, conservative amino acid replacements. Insertions or deletions may optionally be in the range of about 1 to 5 amino acids. The variation allowed may be determined by systematically making insertions, deletions

WO 02/101069

PCT/US02/10513

or substitutions of amino acids in the sequence and testing the resulting variants for activity exhibited by the full-length or mature native sequence.

NS4 polypeptide fragments are provided herein. Such fragments may be truncated at the N-terminus or C-terminus, or may lack internal residues, for example, when compared with a full length native protein. Certain fragments lack amino acid residues that are not essential for a desired biological activity of the NS4 polypeptide.

NS4 fragments may be prepared by any of a number of conventional techniques. Desired peptide fragments may be chemically synthesized. An alternative approach involves generating NS4 fragments by enzymatic digestion, e.g., by treating the protein with an enzyme known to cleave proteins at sites defined by particular amino acid residues, or by digesting the DNA with suitable restriction enzymes and isolating the desired fragment. Yet another suitable technique involves isolating and amplifying a DNA fragment encoding a desired polypeptide fragment, by polymerase chain reaction (PCR). Oligonucleotides that define the desired termini of the DNA fragment are employed at the 5' and 3' primers in the PCR. Preferably, NS4 polypeptide fragments share at least one biological and/or immunological activity with the native NS4 polypeptide shown in Figure 2A, Figure 2B or Figure 2C (SEQ ID NO:4-6, respectively).

In particular embodiments, conservative substitutions of interest are shown in Table 6 under the heading of preferred substitutions. If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated exemplary substitutions in Table 6, or as further described below in reference to amino acid classes, are introduced and the products screened.

Table 6			
Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	val; leu; ile	val	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln	gln
Asp (D)	glu	glu	glu
Cys (C)	ser	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn	asn
Glu (E)	asp	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu	leu
Pro (P)	ala	ala	ala
Ser (S)	thr	thr	thr
Thr (T)	ser	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu	leu

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Substantial modifications in function or immunological identity of the NS4 polypeptide are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;
- (3) acidic: asp, glu;
- (4) basic: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and
- (6) aromatic: trp, tyr, phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class. Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution sites or, more preferably, into the remaining (non-conserved) sites.

The variations can be made using methods known in the art such as oligonucleotide-mediated (site-directed) mutagenesis, alanine scanning, and PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis [Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **13**:4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **10**:6487 (1987)], cassette mutagenesis [Wells *et al.*, *Gene*, **34**:315 (1985)], restriction selection mutagenesis [Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser.A*, **317**:415 (1986)] or other known techniques can be performed on the cloned DNA to produce the NS4 variant DNA.

Scanning amino acid analysis can also be employed to identify one or more amino acids along a contiguous sequence. Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine, and cysteine. Alanine is typically a preferred scanning amino acid among this group because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant [Cunningham and Wells, *Science*, **244**: 1081-1085 (1989)]. Alanine is also typically preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, **150**:1 (1976)]. If alanine substitution does not yield adequate amounts of variant, an isoteric amino acid can be used.

#### C. Modifications of NS4

Covalent modifications of NS4 are included within the scope of this invention. One type of covalent modification includes reacting targeted amino acid residues of NS4 polypeptides with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C-terminal residues of the NS4. Derivatization with bifunctional agents is useful, for instance, for crosslinking NS4 to a water-insoluble support matrix or surface for use in the method for purifying anti-NS4 antibodies, and vice-versa. Commonly used crosslinking agents include, e.g.,

WO 02/101069

PCT/US02/10513

1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenylethane, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters, for example, esters with 4-azidosalicylic acid, homobifunctional imidoesters, including disuccinimidyl esters such as 3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate), bifunctional maleimides such as bis-N-maleimido-1,8-octane and agents such as methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidate.

5 Other modifications include deamidation of glutaminy and asparaginy residues to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively, hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, methylation of the  $\alpha$ -amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains [I.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetylation of the N-terminal amine, and amidation of any C-terminal carboxyl group.

10 Another type of covalent modification of the NS4 polypeptide included within the scope of this invention comprises altering the native glycosylation pattern of the polypeptide. "Altering the native glycosylation pattern" is intended for purposes herein to mean deleting one or more carbohydrate moieties found in native sequence NS4 (either by removing the underlying glycosylation site or by deleting the glycosylation by chemical and/or enzymatic means), and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the native sequence NS4. In addition, 15 the phrase includes qualitative changes in the glycosylation of the native proteins, involving a change in the nature and proportions of the various carbohydrate moieties present.

Addition of glycosylation sites to the NS4 polypeptide may be accomplished by altering the amino acid sequence. The alteration may be made, for example, by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the native sequence NS4 (for O-linked glycosylation sites). The NS4 amino acid sequence may 20 optionally be altered through changes at the DNA level, particularly by mutating the DNA encoding the NS4 polypeptide at preselected bases such that codons are generated that will translate into the desired amino acids.

Another means of increasing the number of carbohydrate moieties on the NS4 polypeptide is by chemical or enzymatic coupling of glycosides to the polypeptide. Such methods are described in the art, e.g., in WO 87/05330 published 11 September 1987, and in Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

25 Removal of carbohydrate moieties present on the NS4 polypeptide may be accomplished chemically or enzymatically or by mutational substitution of codons encoding for amino acid residues that serve as targets for glycosylation. Chemical deglycosylation techniques are known in the art and described, for instance, by Hakimuddin, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) and by Edge *et al.*, *Anal. Biochem.* 118:131 (1981). Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on polypeptides can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

30 Another type of covalent modification of NS4 comprises linking the NS4 polypeptide to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

The NS4 of the present invention may also be modified in a way to form a chimeric molecule comprising 35 NS4 fused to another, heterologous polypeptide or amino acid sequence.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

In one embodiment, such a chimeric molecule comprises a fusion of the NS4 with a tag polypeptide which provides an epitope to which an anti-tag antibody can selectively bind. The epitope tag is generally placed at the amino- or carboxyl- terminus of the NS4. The presence of such epitope-tagged forms of the NS4 can be detected using an antibody against the tag polypeptide. Also, provision of the epitope tag enables the NS4 to be readily purified by affinity purification using an anti-tag antibody or another type of affinity matrix that binds to the epitope tag. Various tag polypeptides and their respective antibodies are well known in the art. Examples include poly-histidine (poly-his) or poly-histidine-glycine (poly-his-gly) tags; the flu HA tag polypeptide and its antibody 12CA5 [Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **8**:2159-2165 (1988)]; the c-myc tag and the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto [Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, **5**:3610-3616 (1985)]; and the Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody [Paborsky *et al.*, *Protein Engineering*, **3**(6):547-553 (1990)]. Other tag polypeptides include the Flag-peptide [Hopp *et al.*, *BioTechnology*, **6**:1204-1210 (1988)]; the KT3 epitope peptide [Martin *et al.*, *Science*, **255**:192-194 (1992)]; an  $\alpha$ -tubulin epitope peptide [Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **266**:15163-15166 (1991)]; and the T7 gene 10 protein peptide tag [Lutz-Freyermuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:6393-6397 (1990)].

In an alternative embodiment, the chimeric molecule may comprise a fusion of the NS4 with an immunoglobulin or a particular region of an immunoglobulin. For a bivalent form of the chimeric molecule (also referred to as an "immunoadhesin"), such a fusion could be to the Fc region of an IgG molecule. The Ig fusions preferably include the substitution of a soluble (transmembrane domain deleted or inactivated) form of an NS4 polypeptide in place of at least one variable region within an Ig molecule. In a particularly preferred embodiment, the immunoglobulin fusion includes the hinge, CH2 and CH3, or the hinge, CH1, CH2 and CH3 regions of an IgG1 molecule. For the production of immunoglobulin fusions see also US Patent No. 5,428,130 issued June 27, 1995.

#### D. Preparation of NS4

The description below relates primarily to production of NS4 by culturing cells transformed or transfected with a vector containing NS4 nucleic acid. It is, of course, contemplated that alternative methods, which are well known in the art, may be employed to prepare NS4. For instance, the NS4 sequence, or portions thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques [see, e.g., Stewart *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**:2149-2154 (1963)]. *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance, using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) using manufacturer's instructions. Various portions of the NS4 may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods to produce the full-length NS4.

##### 1. Isolation of DNA Encoding NS4

DNA encoding NS4 may be obtained from a cDNA library prepared from tissue believed to possess the NS4 mRNA and to express it at a detectable level. Accordingly, human NS4 DNA can be conveniently obtained from a

WO 02/101069

PCT/US02/10513

cDNA library prepared from human tissue, such as described in the Examples. The NS4-encoding gene may also be obtained from a genomic library or by known synthetic procedures (e.g., automated nucleic acid synthesis).

5 Libraries can be screened with probes (such as antibodies to the NS4 or oligonucleotides of at least about 20-80 bases) designed to identify the gene of interest or the protein encoded by it. Screening the cDNA or genomic library with the selected probe may be conducted using standard procedures, such as described in Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). An alternative means to isolate the gene encoding NS4 is to use PCR methodology [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

10 The Examples below describe techniques for screening a cDNA library. The oligonucleotide sequences selected as probes should be of sufficient length and sufficiently unambiguous that false positives are minimized. The oligonucleotide is preferably labeled such that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. Methods of labeling are well known in the art, and include the use of radiolabels like <sup>32</sup>P-labeled ATP, biotinylation or enzyme labeling. Hybridization conditions, including moderate stringency and high stringency, are provided in Sambrook *et al.*, *supra*.

15 Sequences identified in such library screening methods can be compared and aligned to other known sequences deposited and available in public databases such as GenBank or other private sequence databases. Sequence identity (at either the amino acid or nucleotide level) within defined regions of the molecule or across the full-length sequence can be determined using methods known in the art and as described herein.

20 Nucleic acid having protein coding sequence may be obtained by screening selected cDNA or genomic libraries using the deduced amino acid sequence disclosed herein for the first time, and, if necessary, using conventional primer extension procedures as described in Sambrook *et al.*, *supra*, to detect precursors and processing intermediates of mRNA that may not have been reverse-transcribed into cDNA.

## 2. Selection and Transformation of Host Cells

25 Host cells are transfected or transformed with expression or cloning vectors described herein for NS4 production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences. The culture conditions, such as media, temperature, pH and the like, can be selected by the skilled artisan without undue experimentation. In general, principles, protocols, and practical techniques for maximizing the productivity of cell cultures can be found in *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) and Sambrook *et al.*, *supra*.

30 Methods of eukaryotic cell transfection and prokaryotic cell transformation are known to the ordinarily skilled artisan, for example, CaCl<sub>2</sub>, CaPO<sub>4</sub>, liposome-mediated and electroporation. Depending on the host cell used, transformation is performed using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride, as described in Sambrook *et al.*, *supra*, or electroporation is generally used for prokaryotes.

35 Infection with *Agrobacterium tumefaciens* is used for transformation of certain plant cells, as described by Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) and WO 89/05859 published 29 June 1989. For mammalian cells without such cell walls,

WO 02/101069

PCT/US02/10513

the calcium phosphate precipitation method of Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978) can be employed. General aspects of mammalian cell host system transfections have been described in U.S. Patent No. 4,399,216. Transformations into yeast are typically carried out according to the method of Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) and Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). However, other methods for introducing DNA into cells, such as by nuclear microinjection, electroporation, bacterial protoplast fusion with intact cells, or polycations, *e.g.*, polybrene, polyornithine, may also be used. For various techniques for transforming mammalian cells, see Keown *et al.*, *Methods in Enzymology* 185:527-537 (1990) and Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells. Suitable prokaryotes include but are not limited to eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *E. coli*. Various *E. coli* strains are publicly available, such as *E. coli* K12 strain MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* strain W3110 (ATCC 27,325) and K5 772 (ATCC 53,635). Other suitable prokaryotic host cells include Enterobacteriaceae such as *Escherichia*, *e.g.*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *e.g.*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, *e.g.*, *Serratia marcescans*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (*e.g.*, *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266,710 published 12 April 1989), *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. These examples are illustrative rather than limiting. Strain W3110 is one particularly preferred host or parent host because it is a common host strain for recombinant DNA product fermentations. Preferably, the host cell secretes minimal amounts of proteolytic enzymes. For example, strain W3110 may be modified to effect a genetic mutation in the genes encoding proteins endogenous to the host, with examples of such hosts including *E. coli* W3110 strain 1A2, which has the complete genotype *tonA*; *E. coli* W3110 strain 9E4, which has the complete genotype *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 strain 27C7 (ATCC 55,244), which has the complete genotype *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan<sup>r</sup>*; *E. coli* W3110 strain 37D6, which has the complete genotype *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ivG kan<sup>r</sup>*; *E. coli* W3110 strain 40B4, which is strain 37D6 with a non-kanamycin resistant *degP* deletion mutation; and an *E. coli* strain having mutant periplasmic protease disclosed in U.S. Patent No. 4,946,783 issued 7 August 1990. Alternatively, *in vitro* methods of cloning, *e.g.*, PCR or other nucleic acid polymerase reactions, are suitable.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for NS4-encoding vectors. *Saccharomyces cerevisiae* is a commonly used lower eukaryotic host microorganism. Others include *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature* 290: 140 [1981]; EP 139,383 published 2 May 1985); *Kluyveromyces* hosts (U.S. Patent No. 4,943,529; Flier *et al.*, *BioTechnology*, 9:968-975 (1991)) such as, *e.g.*, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilatum* (ATCC 36,906; Van den Berg *et al.*, *BioTechnology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *yarowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna *et al.*, *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, *Proc. Natl. Acad.*

WO 02/101069

PCT/US02/10513

5 *Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 published 31 October 1990); and filamentous fungi such as, e.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyptocladium* (WO 91/00357 published 10 January 1991), and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* (Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yeaton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) and *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]). Methylophilic yeasts are suitable herein and include, but are not limited to, yeast capable of growth on methanol selected from the genera consisting of *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, and *Rhodotorula*. A list of specific species that are exemplary of this class of yeasts may be found in C. Anthony, *The Biochemistry of Methylophilis* 269 (1982).

10 Suitable host cells for the expression of glycosylated NS4 are derived from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* SF9, as well as plant cells. Examples of useful mammalian host cell lines include Chinese hamster ovary (CHO) and COS cells. More specific examples include monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); 15 Chinese hamster ovary cells/DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); and mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51). The selection of the appropriate host cell is deemed to be within the skill in the art.

20 3. Selection and Use of a Replicable Vector

The nucleic acid (e.g., cDNA or genomic DNA) encoding NS4 may be inserted into a replicable vector for cloning (amplification of the DNA) or for expression. Various vectors are publicly available. The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, or phage. The appropriate nucleic acid sequence may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, DNA is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) using techniques known in the art. Vector components generally include, but are not limited to, 25 one or more of a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Construction of suitable vectors containing one or more of these components employs standard ligation techniques which are known to the skilled artisan.

The NS4 may be produced recombinantly not only directly, but also as a fusion polypeptide with a 30 heterologous polypeptide, which may be a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the NS4-encoding DNA that is inserted into the vector. The signal sequence may be a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the signal sequence may be, e.g., the yeast invertase leader, 35 alpha factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*  $\alpha$ -factor leaders, the latter described in U.S. Patent No. 5,010,182), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucoamylase leader (EP 362,179 published 4 April 1990),

WO 02/101069

PCT/US02/10513

or the signal described in WO 90/13646 published 15 November 1990. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences may be used to direct secretion of the protein, such as signal sequences from secreted polypeptides of the same or related species, as well as viral secretory leaders.

5 Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2 $\mu$  plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells.

10 Expression and cloning vectors will typically contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*.

15 An example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the NS4-encoding nucleic acid, such as DHFR or thymidine kinase. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the CHO cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). A suitable selection gene for use in yeast is the *trp1* gene present in the yeast plasmid YRp7 [Stinchcomb *et al.*, *Nature* 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene* 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene* 10:157 (1980)]. The *trp1* gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example, ATCC No. 44076 or PEP4-1 [Jones, *Genetics* 85:12 (1977)].

20 Expression and cloning vectors usually contain a promoter operably linked to the NS4-encoding nucleic acid sequence to direct mRNA synthesis. Promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the  $\beta$ -lactamase and lactose promoter systems [Chang *et al.*, *Nature* 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature* 281:544 (1979)], alkaline phosphatase, a tryptophan (*trp*) promoter system [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776], and hybrid promoters such as the *tac* promoter [deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding NS4.

25 Examples of suitable promoting sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase [Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] or other glycolytic enzymes [Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry* 17:4900 (1978)], such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

30 Other yeast promoters, which are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate

WO 02/101069

PCT/US02/10513

dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657.

NS4 transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus (UK 2,211,504 published 5 July 1989), adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, *e.g.*, the actin promoter or an immunoglobulin promoter, and from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

Transcription of a DNA encoding the NS4 by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are *cis*-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin,  $\alpha$ -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the NS4 coding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding NS4.

Still other methods, vectors, and host cells suitable for adaptation to the synthesis of NS4 in recombinant vertebrate cell culture are described in Gething, *et al.*, *Nature* 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature* 281:40-46 (1979); EP 117,060; and EP 117,058.

25

#### 4. Detecting Gene Amplification/Expression

Gene amplification and/or expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5201-5205 (1980)], dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. The antibodies in turn may be labeled and the assay may be carried out where the duplex is bound to a surface, so that upon the formation of duplex on the surface, the presence of antibody bound to the duplex can be detected.

Gene expression, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of cells or tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal

35



WO 02/101069

PCT/US02/10513

genomic DNA or mRNA to determine which members of such libraries the probe hybridizes to. Hybridization techniques are described in further detail in the Examples below.

Any EST sequences disclosed in the present application may similarly be employed as probes, using the methods disclosed herein.

5 Other useful fragments of the NS4 nucleic acids include antisense or sense oligonucleotides comprising a single-stranded nucleic acid sequence (either RNA or DNA) capable of binding to target NS4 mRNA (sense) or NS4 DNA (antisense) sequences. Antisense or sense oligonucleotides, according to the present invention, comprise a fragment of the coding region of NS4 DNA. Such a fragment generally comprises at least about 14 nucleotides, preferably from about 14 to 30 nucleotides. The ability to derive an antisense or a sense oligonucleotide, based upon  
10 a cDNA sequence encoding a given protein is described in, for example, Stein and Cohen, *Cancer Res.* 48:2659 (1988) and van der Krol *et al.*, *BioTechniques* 6:958 (1988).

Binding of antisense or sense oligonucleotides to target nucleic acid sequences results in the formation of duplexes that block transcription or translation of the target sequence by one of several means, including enhanced degradation of the duplexes, premature termination of transcription or translation, or by other means. The antisense  
15 oligonucleotides thus may be used to block expression of NS4 proteins. Antisense or sense oligonucleotides further comprise oligonucleotides having modified sugar-phosphodiester backbones (or other sugar linkages, such as those described in WO 91/06629) and wherein such sugar linkages are resistant to endogenous nucleases. Such oligonucleotides with resistant sugar linkages are stable *in vivo* (*i.e.*, capable of resisting enzymatic degradation) but retain sequence specificity to be able to bind to target nucleotide sequences.

20 Other examples of sense or antisense oligonucleotides include those oligonucleotides which are covalently linked to organic moieties, such as those described in WO 90/10048, and other moieties that increases affinity of the oligonucleotide for a target nucleic acid sequence, such as poly-(L-lysine). Further still, intercalating agents, such as ellipticine, and alkylating agents or metal complexes may be attached to sense or antisense oligonucleotides to modify binding specificities of the antisense or sense oligonucleotide for the target nucleotide sequence.

25 Antisense or sense oligonucleotides may be introduced into a cell containing the target nucleic acid sequence by any gene transfer method, including, for example, CaPO<sub>4</sub>-mediated DNA transfection, electroporation, or by using gene transfer vectors such as Epstein-Barr virus. In a preferred procedure, an antisense or sense oligonucleotide is inserted into a suitable retroviral vector. A cell containing the target nucleic acid sequence is contacted with the recombinant retroviral vector, either *in vivo* or *ex vivo*. Suitable retroviral vectors include, but are not limited to, those  
30 derived from the murine retrovirus M-MuLV, N2 (a retrovirus derived from M-MuLV), or the double copy vectors designated DCT5A, DCT5B and DCT5C (see WO 90/13641).

Sense or antisense oligonucleotides also may be introduced into a cell containing the target nucleotide sequence by formation of a conjugate with a ligand binding molecule, as described in WO 91/04753. Suitable ligand binding molecules include, but are not limited to, cell surface receptors, growth factors, other cytokines, or other  
35 ligands that bind to cell surface receptors. Preferably, conjugation of the ligand binding molecule does not

WO 02/101069

PCT/US02/10513

substantially interfere with the ability of the ligand binding molecule to bind to its corresponding molecule or receptor, or block entry of the sense or antisense oligonucleotide or its conjugated version into the cell.

Alternatively, a sense or an antisense oligonucleotide may be introduced into a cell containing the target nucleic acid sequence by formation of an oligonucleotide-lipid complex, as described in WO 90/10448. The sense or antisense oligonucleotide-lipid complex is preferably dissociated within the cell by an endogenous lipase.

The probes may also be employed in PCR techniques to generate a pool of sequences for identification of closely related NS4 coding sequences.

Nucleotide sequences encoding a NS4 can also be used to construct hybridization probes for mapping the gene which encodes that NS4 and for the genetic analysis of individuals with genetic disorders. The nucleotide sequences provided herein may be mapped to a chromosome and specific regions of a chromosome using known techniques, such as *in situ* hybridization, linkage analysis against known chromosomal markers, and hybridization screening with libraries.

When the coding sequences for NS4 encode a protein which binds to another protein (for example, where the NS4 is a receptor or co-ligand), the NS4 can be used in assays to identify the other proteins or molecules involved in the binding interaction. By such methods, inhibitors of the receptor/ligand binding interaction can be identified. Proteins involved in such binding interactions can also be used to screen for peptide or small molecule inhibitors or agonists of the binding interaction. Also, the receptor NS4 can be used to isolate correlative ligand(s). Screening assays can be designed to find lead compounds that mimic the biological activity of a native NS4 or a receptor for NS4. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug candidates. Small molecules contemplated include synthetic organic or inorganic compounds. The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays and cell based assays, which are well characterized in the art.

Nucleic acids which encode NS4 or its modified forms can also be used to generate either transgenic animals or "knock out" animals which, in turn, are useful in the development and screening of therapeutically useful reagents.

A transgenic animal (*e.g.*, a mouse or rat) is an animal having cells that contain a transgene, which transgene was introduced into the animal or an ancestor of the animal at a prenatal, *e.g.*, an embryonic stage. A transgene is a DNA which is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops. In one embodiment, cDNA encoding NS4 can be used to clone genomic DNA encoding NS4 in accordance with established techniques and the genomic sequences used to generate transgenic animals that contain cells which express DNA encoding NS4.

Methods for generating transgenic animals, particularly animals such as mice or rats, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866 and 4,870,009. Typically, particular cells would be targeted for NS4 transgene incorporation with tissue-specific enhancers. Transgenic animals that include a copy of a transgene encoding NS4 introduced into the germ line of the animal at an embryonic stage can be used to examine the effect of increased expression of DNA encoding NS4. Such animals can be used as tester animals for reagents thought to confer protection from, for example, pathological conditions associated with its overexpression.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

In accordance with this facet of the invention, an animal is treated with the reagent and a reduced incidence of the pathological condition, compared to untreated animals bearing the transgene, would indicate a potential therapeutic intervention for the pathological condition.

Alternatively, non-human homologues of NS4 can be used to construct a NS4 "knock out" animal which has a defective or altered DNA encoding NS4 as a result of homologous recombination between the endogenous DNA encoding NS4 and altered genomic DNA encoding NS4 introduced into an embryonic stem cell of the animal. For example, cDNA encoding NS4 can be used to clone genomic DNA encoding NS4 in accordance with established techniques. A portion of the genomic DNA encoding NS4 can be deleted or replaced with another gene, such as a gene encoding a selectable marker which can be used to monitor integration. Typically, several kilobases of unaltered flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector [see e.g., Thomas and Capecchi, *Cell* 51:503 (1987) for a description of homologous recombination vectors]. The vector is introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced DNA has homologously recombined with the endogenous DNA are selected [see e.g., Li et al., *Cell* 69:915 (1992)]. The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse or rat) to form aggregation chimeras [see e.g., Bradley, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term to create a "knock out" animal. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be identified by standard techniques and used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA. Knockout animals can be characterized for instance, for their ability to defend against certain pathological conditions and for their development of pathological conditions due to absence of the NS4 polypeptide.

Nucleic acid encoding the NS4 polypeptides may also be used in gene therapy. In gene therapy applications, genes are introduced into cells in order to achieve *in vivo* synthesis of a therapeutically effective genetic product, for example for replacement of a defective gene. "Gene therapy" includes both conventional gene therapy where a lasting effect is achieved by a single treatment, and the administration of gene therapeutic agents, which involves the one time or repeated administration of a therapeutically effective DNA or mRNA. Antisense RNAs and DNAs can be used as therapeutic agents for blocking the expression of certain genes *in vivo*. It has already been shown that short antisense oligonucleotides can be imported into cells where they act as inhibitors, despite their low intracellular concentrations caused by their restricted uptake by the cell membrane. (Zamecnik et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4143-4146 [1986]). The oligonucleotides can be modified to enhance their uptake, e.g. by substituting their negatively charged phosphodiester groups by uncharged groups.

There are a variety of techniques available for introducing nucleic acids into viable cells. The techniques vary depending upon whether the nucleic acid is transferred into cultured cells *in vitro*, or *in vivo* in the cells of the intended host. Techniques suitable for the transfer of nucleic acid into mammalian cells *in vitro* include the use of liposomes, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE-dextran, the calcium phosphate precipitation method, etc. The currently preferred *in vivo* gene transfer techniques include transfection with viral (typically retroviral)

WO 02/101069

PCT/US02/10513

vectors and viral coat protein-liposome mediated transfection (Dzau *et al.*, *Trends in Biotechnology* 11: 205-210 [1993]). In some situations it is desirable to provide the nucleic acid source with an agent that targets the target cells, such as an antibody specific for a cell surface membrane protein or the target cell, a ligand for a receptor on the target cell, *etc.* Where liposomes are employed, proteins which bind to a cell surface membrane protein associated with endocytosis may be used for targeting and/or to facilitate uptake, *e.g.* capsid proteins or fragments thereof tropic for a particular cell type, antibodies for proteins which undergo internalization in cycling, proteins that target intracellular localization and enhance intracellular half-life. The technique of receptor-mediated endocytosis is described, for example, by Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432 (1987); and Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3410-3414 (1990). For review of gene marking and gene therapy protocols see Anderson *et al.*, *Science* 256: 808-813 (1992).

The NS4 polypeptides described herein may also be employed as molecular weight markers for protein electrophoresis purposes.

The nucleic acid molecules encoding the NS4 polypeptides or fragments thereof described herein are useful for chromosome identification. In this regard, there exists an ongoing need to identify new chromosome markers, since relatively few chromosome marking reagents, based upon actual sequence data are presently available. Each NS4 nucleic acid molecule of the present invention can be used as a chromosome marker.

The NS4 polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may also be used for tissue typing, wherein the NS4 polypeptides of the present invention may be differentially expressed in one tissue as compared to another. NS4 nucleic acid molecules will find use for generating probes for PCR, Northern analysis, Southern analysis and Western analysis.

The NS4 polypeptides and modulators thereof described herein may also be employed as therapeutic agents. The NS4 polypeptides and modulators thereof of the present invention can be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions, whereby the NS4 product hereof is combined in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier vehicle. Therapeutic formulations are prepared for storage by mixing the active ingredient having the desired degree of purity with optional physiologically acceptable carriers, excipients or stabilizers (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone, amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN®, PLURONICS® or PEG.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes, prior to or following lyophilization and reconstitution.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Therapeutic compositions herein generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

The route of administration is in accord with known methods, e.g. injection or infusion by intravenous, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial or intrasplenic routes, topical administration, or by sustained release systems.

Dosages and desired drug concentrations of pharmaceutical compositions of the present invention may vary depending on the particular use envisioned. The determination of the appropriate dosage or route of administration is well within the skill of an ordinary physician. Animal experiments provide reliable guidance for the determination of effective doses for human therapy. Interspecies scaling of effective doses can be performed following the principles laid down by Mordenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" In *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96.

When *in vivo* administration of a NS4 polypeptide or agonist or antagonist thereof is employed, normal dosage amounts may vary from about 10 ng/kg to up to 100 mg/kg of mammal body weight or more per day, preferably about 1 µg/kg/day to 10 mg/kg/day, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature; see, for example, U.S. Pat. Nos. 4,657,760; 5,206,344; or 5,225,212. It is anticipated that different formulations will be effective for different treatment compounds and different disorders, that administration targeting one organ or tissue, for example, may necessitate delivery in a manner different from that to another organ or tissue.

Where sustained-release administration of a NS4 polypeptide or modulator is desired in a formulation with release characteristics suitable for the treatment of any disease or disorder requiring administration of the NS4 polypeptide or modulator, microencapsulation is contemplated. Microencapsulation of recombinant proteins for sustained release has been successfully performed with human growth hormone (rhGH), interferon- (rhIFN- ), interleukin-2, and MN rgp120. Johnson *et al.*, *Nat. Med.* 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.* 27:1221-1223 (1993); Hora *et al.*, *BioTechnology* 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds. (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; and U.S. Pat. No. 5,654,010.

The sustained-release formulations of these proteins can be developed using poly-lactic-coglycolic acid (PLGA) polymer due to its biocompatibility and wide range of biodegradable properties. The degradation products of PLGA, lactic and glycolic acids, can be cleared quickly within the human body. Moreover, the degradability of this polymer can be adjusted from months to years depending on its molecular weight and composition. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," in: M. Chasin and R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41.

The therapeutic agents and compositions comprising NS4 provided herein can be used in a number of applications. The applications include treating an individual with obesity or a condition associated with obesity. In one aspect, NS4 is administered to an individual in need thereof in an amount effective to treat the condition.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

5 Preferably, the condition is one which requires at least one of the following to be treated: an increase in metabolism, a decrease in body weight, a decrease in body fat, a decrease in triglycerides, a decrease in free fatty acids, an increase in glucose release from adipocytes, an increase in insulin sensitivity and/or an increase in leptin release from adipocytes. Each of these parameters can be measured by standard methods, for example, by measuring oxygen consumption to determine metabolic rate, using scales to determine weight, and measuring size to determine fat. Moreover, the presence and amount of triglycerides, free fatty acids, glucose and leptin can be determined by standard methods. Each of these parameters is exemplified below in the specific examples.

10 NS4 and compositions comprising NS4 are preferably used *in vivo*. However, as discussed below, administration can be *in vitro* such as in the methods described below for screening for modulators of NS4. Although, it is understood that modulators of NS4 can also be identified by the use of animal models and samples from patients.

This invention encompasses methods of screening compounds to identify those that mimic or enhance the NS4 polypeptide (agonists) or prevent or inhibit the effect of the NS4 polypeptide (antagonists). Agonists and antagonists are referred to as modulators herein. Screening assays for antagonist drug candidates are designed to identify compounds that bind or complex with the NS4 polypeptides encoded by the genes identified herein, or otherwise interfere with the interaction of the encoded polypeptides with other cellular proteins. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug candidates.

The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays, and cell-based assays, which are well characterized in the art.

20 All assays for antagonists are common in that they call for contacting the drug candidate with a NS4 polypeptide encoded by a nucleic acid identified herein under conditions and for a time sufficient to allow these two components to interact.

In binding assays, the interaction is binding and the complex formed can be isolated or detected in the reaction mixture. In a particular embodiment, the NS4 polypeptide encoded by the gene identified herein or the drug candidate is immobilized on a solid phase, *e.g.*, on a microtiter plate, by covalent or non-covalent attachments. Non-covalent attachment generally is accomplished by coating the solid surface with a solution of the NS4 polypeptide and drying. Alternatively, an immobilized antibody, *e.g.*, a monoclonal antibody, specific for the NS4 polypeptide to be immobilized can be used to anchor it to a solid surface. The assay is performed by adding the non-immobilized component, which may be labeled by a detectable label, to the immobilized component, *e.g.*, the coated surface containing the anchored component. When the reaction is complete, the non-reacted components are removed, *e.g.*, by washing, and complexes anchored on the solid surface are detected. When the originally non-immobilized component carries a detectable label, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexing occurred. Where the originally non-immobilized component does not carry a label, complexing can be detected, for example, by using a labeled antibody specifically binding the immobilized complex.

35 If the candidate compound interacts with but does not bind to a particular NS4 polypeptide encoded by a gene identified herein, its interaction with that polypeptide can be assayed by methods well known for detecting

WO 02/101069

PCT/US02/10513

protein-protein interactions. Such assays include traditional approaches, such as, *e.g.*, cross-linking, co-immunoprecipitation, and co-purification through gradients or chromatographic columns. In addition, protein-protein interactions can be monitored by using a yeast-based genetic system described by Fields and co-workers (Fields and Song, *Nature (London)* 340:245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9578-9582 (1991)) as disclosed by Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5789-5793 (1991). Many transcriptional activators, such as yeast GAL4, consist of two physically discrete modular domains, one acting as the DNA-binding domain, the other one functioning as the transcription-activation domain. The yeast expression system described in the foregoing publications (generally referred to as the "two-hybrid system") takes advantage of this property, and employs two hybrid proteins, one in which the target protein is fused to the DNA-binding domain of GAL4, and another, in which candidate activating proteins are fused to the activation domain. The expression of a GAL1-*lacZ* reporter gene under control of a GAL4-activated promoter depends on reconstitution of GAL4 activity via protein-protein interaction. Colonies containing interacting polypeptides are detected with a chromogenic substrate for  $\beta$ -galactosidase. A complete kit (MATCHMAKER<sup>TM</sup>) for identifying protein-protein interactions between two specific proteins using the two-hybrid technique is commercially available from Clontech. This system can also be extended to map protein domains involved in specific protein interactions as well as to pinpoint amino acid residues that are crucial for these interactions.

Compounds that interfere with the interaction of a DNA encoding a NS4 polypeptide identified herein and other intra- or extracellular components can be tested as follows: usually a reaction mixture is prepared containing the NS4 polypeptide and the intra- or extracellular component under conditions and for a time allowing for the interaction and binding of the two products. To test the ability of a candidate compound to inhibit binding, the reaction is run in the absence and in the presence of the test compound. In addition, a placebo may be added to a third reaction mixture, to serve as positive control. The binding (complex formation) between the test compound and the intra- or extracellular component present in the mixture is monitored as described hereinabove. The formation of a complex in the control reaction(s) but not in the reaction mixture containing the test compound indicates that the test compound interferes with the interaction of the test compound and its reaction partner.

To assay for antagonists, the NS4 polypeptide may be added to a cell along with the compound to be screened for a particular activity and the ability of the compound to inhibit the activity of interest in the presence of the NS4 polypeptide indicates that the compound is an antagonist to the NS4 polypeptide. Alternatively, antagonists may be detected by combining the NS4 polypeptide and a potential antagonist with membrane-bound NS4 polypeptide receptors or recombinant receptors under appropriate conditions for a competitive inhibition assay. The NS4 polypeptide can be labeled, such as by radioactivity, such that the number of NS4 polypeptide molecules bound to the receptor can be used to determine the effectiveness of the potential antagonist. The gene encoding the receptor can be identified by numerous methods known to those of skill in the art, for example, ligand panning and FACS sorting. Coigan *et al.*, *Current Protocols in Immun.* 1(2): Chapter 5 (1991). Preferably, expression cloning is employed wherein polyadenylated RNA is prepared from a cell responsive to the NS4 polypeptide and a cDNA library created from this RNA is divided into pools and used to transfect COS cells or other cells that are not

WO 02/101069

PCT/US02/10513

responsive to the NS4 polypeptide. Transfected cells that are grown on glass slides are exposed to labeled NS4 polypeptide. The NS4 polypeptide can be labeled by a variety of means including iodination or inclusion of a recognition site for a site-specific protein kinase. Following fixation and incubation, the slides are subjected to autoradiographic analysis. Positive pools are identified and sub-pools are prepared and re-transfected using an interactive sub-pooling and re-screening process, eventually yielding a single clone that encodes the putative receptor.

As an alternative approach for receptor identification, labeled NS4 polypeptide can be photoaffinity-linked with cell membrane or extract preparations that express the receptor molecule. Cross-linked material is resolved by PAGE and exposed to X-ray film. The labeled complex containing the receptor can be excised, resolved into peptide fragments, and subjected to protein micro-sequencing. The amino acid sequence obtained from micro-sequencing would be used to design a set of degenerate oligonucleotide probes to screen a cDNA library to identify the gene encoding the putative receptor.

In another assay for antagonists, mammalian cells or a membrane preparation expressing the receptor would be incubated with labeled NS4 polypeptide in the presence of the candidate compound. The ability of the compound to enhance or block this interaction could then be measured.

More specific examples of potential antagonists include an oligonucleotide that binds to the fusions of immunoglobulin with NS4 polypeptide, and, in particular, antibodies including, without limitation, poly- and monoclonal antibodies and antibody fragments, single-chain antibodies, anti-idiotypic antibodies, and chimeric or humanized versions of such antibodies or fragments, as well as human antibodies and antibody fragments. Alternatively, a potential antagonist may be a closely related protein, for example, a mutated form of the NS4 polypeptide that recognizes the receptor but imparts no effect, thereby competitively inhibiting the action of the NS4 polypeptide.

In one embodiment herein where competitive binding assays are performed, NS4 receptor or an antibody to NS4 may be used as a competitor.

Another potential NS4 polypeptide antagonist is an antisense RNA or DNA construct prepared using antisense technology, where, e.g., an antisense RNA or DNA molecule acts to block directly the translation of mRNA by hybridizing to targeted mRNA and preventing protein translation. Antisense technology can be used to control gene expression through triple-helix formation or antisense DNA or RNA, both of which methods are based on binding of a polynucleotide to DNA or RNA. For example, the 5' coding portion of the polynucleotide sequence, which encodes the mature NS4 polypeptides herein, is used to design an antisense RNA oligonucleotide of from about 10 to 40 base pairs in length. A DNA oligonucleotide is designed to be complementary to a region of the gene involved in transcription (triple helix - see Lee *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, *Science* 241: 456 (1988); Dervan *et al.*, *Science* 251:1360 (1991)), thereby preventing transcription and the production of the NS4 polypeptide. The antisense RNA oligonucleotide hybridizes to the mRNA *in vivo* and blocks translation of the mRNA molecule into the NS4 polypeptide (antisense - Okano, *Neurochem.* 56:560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression* (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)). The oligonucleotides described above can also be delivered to cells such that the antisense RNA or DNA may be expressed *in vivo* to inhibit production of

WO 02/101069

PCT/US02/10513

the NS4 polypeptide. When antisense DNA is used, oligodeoxyribonucleotides derived from the translation-initiation site, *e.g.*, between about -10 and +10 positions of the target gene nucleotide sequence, are preferred.

Potential antagonists include small molecules that bind to the active site, the receptor binding site, or growth factor or other relevant binding site of the NS4 polypeptide, thereby blocking the normal biological activity of the NS4 polypeptide. Examples of small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like molecules, preferably soluble peptides, and synthetic non-peptidyl organic or inorganic compounds.

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. Ribozymes act by sequence-specific hybridization to the complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Specific ribozyme cleavage sites within a potential RNA target can be identified by known techniques. For further details see, *e.g.*, Rossi, *Current Biology* 4:469-471 (1994), and PCT publication No. WO 97/33551 (published September 18, 1997).

Nucleic acid molecules in triple-helix formation used to inhibit transcription should be single-stranded and composed of deoxynucleotides. The base composition of these oligonucleotides is designed such that it promotes triple-helix formation via Hoogsteen base-pairing rules, which generally require sizeable stretches of purines or pyrimidines on one strand of a duplex. For further details see, *e.g.*, PCT publication No. WO 97/33551, *supra*.

These small molecules can be identified by any one or more of the screening assays discussed hereinabove and/or by any other screening techniques well known for those skilled in the art.

It is appreciated that all the assays provided herein can be used to screen a wide variety of candidate bioactive agents. The term "candidate bioactive agent", "candidate agent" or "drug candidate" or grammatical equivalents as used herein describes any molecule, *e.g.*, protein, oligopeptide, small organic molecule, polysaccharide, polynucleotide, purine analog, *etc.*, to be tested for bioactive agents that are capable of directly or indirectly altering either the cellular activity phenotype or the expression of a NS4 sequence, including both nucleic acid sequences and protein sequences.

Candidate agents can encompass numerous chemical classes, though typically they are organic molecules, preferably small organic compounds having a molecular weight of more than 100 and less than about 2,500 daltons (d). Small molecules are further defined herein as having a molecular weight of between 50 d and 2000 d. In another embodiment, small molecules have a molecular weight of less than 1500, or less than 1200, or less than 1000, or less than 750, or less than 500 d. In one embodiment, a small molecule as used herein has a molecular weight of about 100 to 200 d. Candidate agents comprise functional groups necessary for structural interaction with proteins, particularly hydrogen bonding, and typically include at least an amine, carbonyl, hydroxyl or carboxyl group, preferably at least two of the functional chemical groups. The candidate agents often comprise cyclical carbon or heterocyclic structures and/or aromatic or polyaromatic structures substituted with one or more of the above functional groups. Candidate agents are also found among biomolecules including peptides, saccharides, fatty acids, steroids, purines, pyrimidines, derivatives, structural analogs or combinations thereof. Particularly preferred are peptides.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Candidate agents are obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. For example, numerous means are available for random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules, including expression of randomized oligonucleotides. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts are available or readily produced.

5 Additionally, natural or synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical and biochemical means. Known pharmacological agents may be subjected to directed or random chemical modifications, such as acylation, alkylation, esterification, amidification to produce structural analogs.

In a preferred embodiment, the candidate bioactive agents are proteins. By "protein" herein is meant at least two covalently attached amino acids, which includes proteins, polypeptides, oligopeptides and peptides. The protein  
10 may be made up of naturally occurring amino acids and peptide bonds, or synthetic peptidomimetic structures. Thus "amino acid", or "peptide residue", as used herein means both naturally occurring and synthetic amino acids. For example, homo-phenylalanine, citrulline and noreleucine are considered amino acids for the purposes of the invention. "Amino acid" also includes amino acid residues such as proline and hydroxyproline. The side chains may be in either the (R) or the (S) configuration. In the preferred embodiment, the amino acids are in the (S) or L-configuration.  
15 If non-naturally occurring side chains are used, non-amino acid substituents may be used, for example to prevent or retard *in vivo* degradations.

In a preferred embodiment, the candidate bioactive agents are naturally occurring proteins or fragments of naturally occurring proteins. Thus, for example, cellular extracts containing proteins, or random or directed digests of proteinaceous cellular extracts, may be used. In this way libraries of prokaryotic and eucaryotic proteins may be  
20 made for screening in the methods of the invention. Particularly preferred in this embodiment are libraries of bacterial, fungal, viral, and mammalian proteins, with the latter being preferred, and human proteins being especially preferred.

In a preferred embodiment, the candidate bioactive agents are peptides of from about 5 to about 30 amino acids, with from about 5 to about 20 amino acids being preferred, and from about 7 to about 15 being particularly  
25 preferred. The peptides may be digests of naturally occurring proteins as is outlined above, random peptides, or "biased" random peptides. By "randomized" or grammatical equivalents herein is meant that each nucleic acid and peptide consists of essentially random nucleotides and amino acids, respectively. Since generally these random peptides (or nucleic acids, discussed below) are chemically synthesized, they may incorporate any nucleotide or amino acid at any position. The synthetic process can be designed to generate randomized proteins or nucleic acids,  
30 to allow the formation of all or most of the possible combinations over the length of the sequence, thus forming a library of randomized candidate bioactive proteinaceous agents.

In one embodiment, the library is fully randomized, with no sequence preferences or constants at any position. In a preferred embodiment, the library is biased. That is, some positions within the sequence are either held constant, or are selected from a limited number of possibilities. For example, in a preferred embodiment, the  
35 nucleotides or amino acid residues are randomized within a defined class, for example, of hydrophobic amino acids, hydrophilic residues, sterically biased (either small or large) residues, towards the creation of nucleic acid binding

WO 02/101069

PCT/US02/10513

domains, the creation of cysteines, for cross-linking, prolines for SH-3 domains, serines, threonines, tyrosines or histidines for phosphorylation sites, etc., or to purines, etc.

In a preferred embodiment, the candidate bioactive agents are nucleic acids. By "nucleic acid" or "oligonucleotide" or grammatical equivalents herein means at least two nucleotides covalently linked together. A nucleic acid of the present invention will generally contain phosphodiester bonds, although in some cases, as outlined below, nucleic acid analogs are included that may have alternate backbones, comprising, for example, phosphoramidate (Beaucage *et al.*, *Tetrahedron* 49(10):1925 (1993) and references therein; Letsinger, *J. Org. Chem.* 35:3800 (1970); Sprinzl *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 81:579 (1977); Letsinger *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 14:3487 (1986); Sawai *et al.*, *Chem. Lett.* 805 (1984); Letsinger *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); and Pauwels *et al.*, *Chemica Scripta* 26:141 (1986)), phosphorothioate (Mag *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:1437 (1991); and U.S. Patent No. 5,644,048), phosphorodithioate (Briu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321 (1989), O-methylphosphoroamidite linkages (see Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), and peptide nucleic acid backbones and linkages (see Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895 (1992); Meier *et al.*, *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008 (1992); Nielsen, *Nature* 365:566 (1993); Carlsson *et al.*, *Nature* 380:207 (1996), all of which are incorporated by reference). Other analog nucleic acids include those with positive backbones (Denpey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097 (1995); non-ionic backbones (U.S. Patent Nos. 5,386,023, 5,637,684, 5,602,240, 5,216,141 and 4,469,863; Kiedrowski *et al.*, *Angew. Chem. Intl. (Ed. English)* 30:423 (1991); Letsinger *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); Letsinger *et al.*, *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597 (1994); Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4:395 (1994); Jeffs *et al.*, *J. Biomolecular NMR* 34:17 (1994); *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) and non-ribose backbones, including those described in U.S. Patent Nos. 5,235,033 and 5,034,506, and Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook. Nucleic acids containing one or more carbocyclic sugars are also included within the definition of nucleic acids (see Jenkins *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* (1995) pp169-176). Several nucleic acid analogs are described in Rawls, C & E News June 2, 1997 page 35. All of these references are hereby expressly incorporated by reference. These modifications of the ribose-phosphate backbone may be done to facilitate the addition of additional moieties such as labels, or to increase the stability and half-life of such molecules in physiological environments. In addition, mixtures of naturally occurring nucleic acids and analogs can be made. Alternatively, mixtures of different nucleic acid analogs, and mixtures of naturally occurring nucleic acids and analogs may be made. The nucleic acids may be single stranded or double stranded, as specified, or contain portions of both double stranded or single stranded sequence. The nucleic acid may be DNA, both genomic and cDNA, RNA or a hybrid, where the nucleic acid contains any combination of deoxyribo- and ribo-nucleotides, and any combination of bases, including uracil, adenine, thymine, cytosine, guanine, inosine, xanthine hypoxanthine, isocytosine, isoguanine, etc.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

As described above generally for proteins, nucleic acid candidate bioactive agents may be naturally occurring nucleic acids, random nucleic acids, or "biased" random nucleic acids. For example, digests of prokaryotic or eukaryotic genomes may be used as is outlined above for proteins.

5 In a preferred embodiment, the candidate bioactive agents are organic chemical moieties, a wide variety of which are available in the literature.

In a preferred embodiment, as outlined above, screens may be done on individual genes and gene products (proteins). In a preferred embodiment, the gene or protein has been identified as described below in the Examples as a differentially expressed gene associated with particular tissues and thus conditions related to those tissues. Thus, in one embodiment, screens are designed to first find candidate agents that can bind to NS4, and then these agents 10 may be used in assays that evaluate the ability of the candidate agent to modulate NS4 activity. Thus, as will be appreciated by those in the art, there are a number of different assays which may be run.

Screening for agents that modulate the activity of NS4 may also be done. In a preferred embodiment, methods for screening for a bioactive agent capable of modulating the activity of NS4 comprise the steps of adding a candidate bioactive agent to a sample of NS4 and determining an alteration in the biological activity of NS4.

15 "Modulating the activity of NS4" includes an increase in activity, a decrease in activity, or a change in the type or kind of activity present. Thus, in this embodiment, the candidate agent should both bind to NS4 (although this may not be necessary), and alter its biological or biochemical activity as defined herein. The methods include both *in vitro* screening methods, as are generally outlined above, and *in vivo* screening of cells for alterations in the presence, expression, distribution, activity or amount of NS4.

20 Thus, in this embodiment, the methods comprise combining a sample and a candidate bioactive agent, and evaluating the effect on NS4 activity. By "NS4 protein activity" or grammatical equivalents herein is meant at least one of the NS4 protein's biological activities as described above.

In a preferred embodiment, the activity of the NS4 protein is increased; in another preferred embodiment, the activity of the NS4 protein is decreased. Thus, bioactive agents that are antagonists are preferred in some 25 embodiments, and bioactive agents that are agonists may be preferred in other embodiments.

In one aspect of the invention, cells containing NS4 sequences are used in drug screening assays by evaluating the effect of drug candidates on NS4. Cell type include normal cells, tumor cells, and adipocytes.

Methods of assessing NS4 activity such as changes in glucose uptake, leptin release, metabolism, triglyceride and free fatty acid levels, body weight and body fat, are known in the art and are exemplified below in the examples.

30 In a preferred embodiment, the methods comprise adding a candidate bioactive agent, as defined above, to a cell comprising NS4. Preferred cell types include almost any cell. The cells contain a nucleic acid, preferably recombinant, that encodes a NS4 protein. In a preferred embodiment, a library of candidate agents are tested on a plurality of cells.

35 In one aspect, the assays are evaluated in the presence or absence or previous or subsequent exposure to physiological signals, for example hormones, antibodies, peptides, antigens, cytokines, growth factors, action

WO 02/101069

PCT/US02/10513

potentials, pharmacological agents including chemotherapeutics, radiation, carcinogenics, or other cells (*i.e.* cell-cell contacts). In another example, the determinations are determined at different stages of the cell cycle process.

The NS4 sequences provided herein can also be used in methods of diagnosis. Overexpression of NS4 may indicate an abnormally high metabolic rate and underexpression may indicate a propensity for obesity and related disorders. Moreover, a sample from a patient may be analyzed for mutated or dysfunctional NS4. Generally, such methods include comparing a sample from a patient and comparing NS4 expression to that of a control.

#### F. Anti-NS4 Antibodies

The present invention further provides anti-NS4 antibodies. Exemplary antibodies include polyclonal, monoclonal, humanized, bispecific, and heteroconjugate antibodies.

##### 1. Polyclonal Antibodies

The anti-NS4 antibodies may comprise polyclonal antibodies. Methods of preparing polyclonal antibodies are known to the skilled artisan. Polyclonal antibodies can be raised in a mammal, for example, by one or more injections of an immunizing agent and, if desired, an adjuvant. Typically, the immunizing agent and/or adjuvant will be injected in the mammal by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. The immunizing agent may include the NS4 polypeptide or a fusion protein thereof. It may be useful to conjugate the immunizing agent to a protein known to be immunogenic in the mammal being immunized. Examples of such immunogenic proteins include but are not limited to keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, and soybean trypsin inhibitor. Examples of adjuvants which may be employed include Freund's complete adjuvant and MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate). The immunization protocol may be selected by one skilled in the art without undue experimentation.

##### 2. Monoclonal Antibodies

The anti-NS4 antibodies may, alternatively, be monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies may be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975). In a hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is typically immunized with an immunizing agent to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the immunizing agent. Alternatively, the lymphocytes may be immunized *in vitro*.

The immunizing agent will typically include the NS4 polypeptide or a fusion protein thereof. Generally, either peripheral blood lymphocytes ("PBLs") are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Usually, rat

WO 02/101069

PCT/US02/10513

or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells may be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRPT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

5 Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

10 The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can then be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against NS4. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

15 After the desired hybridoma cells are identified, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods [Goding, *supra*]. Suitable culture media for this purpose include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 medium. Alternatively, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites in a mammal.

20 The monoclonal antibodies secreted by the subclones may be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

25 The monoclonal antibodies may also be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Patent No. 4,816,567. DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention can be readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the invention serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences [U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, *supra*] or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for

WO 02/101069

PCT/US02/10513

the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

The antibodies may be monovalent antibodies. Methods for preparing monovalent antibodies are well known in the art. For example, one method involves recombinant expression of immunoglobulin light chain and modified heavy chain. The heavy chain is truncated generally at any point in the Fc region so as to prevent heavy chain crosslinking. Alternatively, the relevant cysteine residues are substituted with another amino acid residue or are deleted so as to prevent crosslinking.

*In vitro* methods are also suitable for preparing monovalent antibodies. Digestion of antibodies to produce fragments thereof, particularly, Fab fragments, can be accomplished using routine techniques known in the art.

### 3. Human and Humanized Antibodies

The anti-NS4 antibodies of the invention may further comprise humanized antibodies or human antibodies. Humanized forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab)', or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Humanized antibodies include human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Humanized antibodies may also comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin [Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain.

Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)], by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Human antibodies can also be produced using various techniques known in the art, including phage display libraries [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. The techniques of Cole *et al.* and Boerner *et al.* are also available for the preparation of human monoclonal antibodies (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)). Similarly, human antibodies can be made by introducing of human immunoglobulin loci into transgenic animals, *e.g.*, mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, and in the following scientific publications: Marks *et al.*, *BioTechnology* 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

#### 4. Bispecific Antibodies

Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for the NS4, the other one is for any other antigen, and preferably for a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities [Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)]. Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule is usually accomplished by affinity chromatography steps. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, published 13 May 1993, and in Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) can be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

According to another approach described in WO 96/27011, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the CH3 region of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (*e.g.* tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side

WO 02/101069

PCT/US02/10513

chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

5 Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (e.g. F(ab')<sub>2</sub> bispecific antibodies). Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')<sub>2</sub> fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then  
10 converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Fab' fragments may be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody F(ab')<sub>2</sub> molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

20 Various technique for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also  
25 be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V<sub>H</sub>) connected to a light-chain variable domain (V<sub>L</sub>) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains of one fragment are forced to pair with the complementary V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> domains of another  
30 fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (scFv) dimers has also been reported. See, Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994). Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes on a given NS4 polypeptide herein.  
35 Alternatively, an anti-NS4 polypeptide arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (e.g. CD2, CD3, CD28, or B7), or Fc receptors for IgG (FcγR), such

WO 02/101069

PCT/US02/10513

as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular NS4 polypeptide. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express a particular NS4 polypeptide. These antibodies possess a NS4-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radiometal chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA. Another bispecific antibody of interest binds the NS4 polypeptide and further binds tissue factor (TF).

#### 5. Heteroconjugate Antibodies

Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells [U.S. Patent No. 4,676,980], and for treatment of HIV infection [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. It is contemplated that the antibodies may be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980.

#### 6. Effector Function Engineering

It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance, *e.g.*, the effectiveness of the antibody in treating cancer. For example, cysteine residue(s) may be introduced into the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron *et al.*, *J. Exp Med.*, 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al.*, *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered that has dual Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989).

#### 7. Immunoconjugates

The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (*e.g.*, an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (*i.e.*, a radioconjugate).

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain,

WO 02/101069

PCT/US02/10513

modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, saponaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , and  $^{186}\text{Re}$ .

5 Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridylthiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active  
10 fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methylthiethylene triaminopentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionuclide to the antibody. See WO94/11026.

15 In another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such streptavidin) for utilization in tumor pretargeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) that is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionuclide).

#### 8. Immunoliposomes

20 The antibodies disclosed herein may also be formulated as immunoliposomes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4030 (1980); and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

25 Particularly useful liposomes can be generated by the reverse-phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) via a disulfide-interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as Doxorubicin) is optionally contained within the liposome. See Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81(19): 1484  
30 (1989).

#### 9. Pharmaceutical Compositions of Antibodies

35 Antibodies specifically binding a NS4 polypeptide identified herein, as well as other molecules identified by the screening assays disclosed hereinbefore, can be administered for the treatment of various disorders in the form of pharmaceutical compositions.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

If the NS4 polypeptide is intracellular and whole antibodies are used as inhibitors, internalizing antibodies are preferred. However, lipofections or liposomes can also be used to deliver the antibody, or an antibody fragment, into cells. Where antibody fragments are used, the smallest inhibitory fragment that specifically binds to the binding domain of the target protein is preferred. For example, based upon the variable-region sequences of an antibody, peptide molecules can be designed that retain the ability to bind the target protein sequence. Such peptides can be synthesized chemically and/or produced by recombinant DNA technology. See, e.g., Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993). The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Alternatively, or in addition, the composition may comprise an agent that enhances its function, such as, for example, a cytotoxic agent, cytokine, chemotherapeutic agent, or growth-inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles, and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and  $\gamma$  ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated antibodies remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

G. Generalized Uses for anti-NS4 Antibodies

The anti-NS4 antibodies of the invention have various utilities. For example, anti-NS4 antibodies may be used in diagnostic assays for NS4, e.g., detecting its expression in specific cells, tissues, or serum. Various diagnostic

WO 02/101069

PCT/US02/10513

assay techniques known in the art may be used, such as competitive binding assays, direct or indirect sandwich assays and immunoprecipitation assays conducted in either heterogeneous or homogeneous phases [Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]. The antibodies used in the diagnostic assays can be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety should be capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the detectable moiety may be a radioisotope, such as  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , or  $^{125}\text{I}$ , a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin, or an enzyme, such as alkaline phosphatase, beta-galactosidase or horseradish peroxidase. Any method known in the art for conjugating the antibody to the detectable moiety may be employed, including those methods described by Hunter *et al.*, *Nature*, 144:945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, 13:1014 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 40:219 (1981); and Nygren, *J. Histochem. Cytochem.*, 30:407 (1982).

Anti-NS4 antibodies also are useful for the affinity purification of NS4 from recombinant cell culture or natural sources. In this process, the antibodies against NS4 are immobilized on a suitable support, such as a Sephadex resin or filter paper, using methods well known in the art. The immobilized antibody then is contacted with a sample containing the NS4 to be purified, and thereafter the support is washed with a suitable solvent that will remove substantially all the material in the sample except the NS4, which is bound to the immobilized antibody. Finally, the support is washed with another suitable solvent that will release the NS4 from the antibody.

The following examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

#### H. Transgenic animals

Nucleic acids which encode novel human NS4 or analogous NS4 from other species, such as the murine, can be used to generate either transgenic animals or "knock out" animals which, in turn, are useful in the development and screening of therapeutically useful reagents. A transgenic animal (e.g., a mouse) is an animal having cells that contain a transgene, which transgene was introduced into the animal or an ancestor of the animal at a prenatal, e.g., an embryonic stage. A transgene is a DNA which is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops. In one embodiment, murine cDNA encoding or an appropriate sequence thereof can be used to clone genomic DNA encoding in accordance with established techniques and the genomic sequences used to generate transgenic animals that contain cells which express DNA encoding NS4. Methods for generating transgenic animals, particularly animals such as mice, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866 and 4,870,009. Typically, particular cells would be targeted for transgene incorporation with tissue-specific enhancers, which could result in production of NS4. Transgenic animals that include a copy of a transgene encoding introduced into the germ line of the animal at an embryonic stage can be used to examine the effect of increased expression of DNA encoding. Such animals can be used as tester animals for reagents thought to confer protection from weight related disorders, such as, obesity, cachexia or anorexia. In accordance with this facet of the invention, an animal is treated with the reagent and a reduced incidence of the disease, compared to untreated animals bearing the transgene, would indicate a potential therapeutic intervention for the disease.

Alternatively, the non-human homologues of NS4 can be used to construct a "knock out" animal which has

WO 02/101069

PCT/US02/10513

a defective or altered gene encoding NS4 as a result of homologous recombination between the endogenous gene encoding and altered genomic DNA encoding introduced into an embryonic cell of the animal. For example, murine cDNA encoding NS4 can be used to clone genomic DNA encoding in accordance with established techniques. A portion of the genomic DNA encoding (e.g., such as an exon) NS4 can be deleted or replaced with another gene, such as a gene encoding a selectable marker which can be used to monitor integration. Typically, several kilobases of unaltered flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector (see e.g., Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) for a description of homologous recombination vectors). The vector is introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced DNA has homologously recombined with the endogenous DNA are selected (see e.g., Li et al., *Cell*, 69:915 [1992]). The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse) to form aggregation chimeras (see e.g., Bradley, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. [IRL, Oxford, 1987], pp. 113-152). A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term to create a "knock out" animal. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be identified by standard techniques and used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA. Knockout animals can be characterized for their ability to accept grafts, reject tumors and defend against infectious diseases and can be used in the study of basic immunobiology.

One particular technique used for the creation of transgenic animals involves the use of yeast artificial chromosomes (YAC). Yeast artificial chromosomes are cloning vectors constructed from elements of yeast chromosomes, and allow the vector to be replicated and maintained in yeast cells *in vivo*. Yeast elements include a centromere, an autonomous replication sequence, a pair of telomeres, yeast selectable markers, and usually a bacterial origin of replication and selectable marker for replication and selection of the YAC vector arms in bacteria.

YACs may be used in combination with gene targeting of endogenous loci for insertion into the host animal's genome. An advantage of using YACs is that hundreds of kilobases of DNA may be inserted into a host cell. Therefore, the use of YAC cloning vehicles permits inclusion of a substantial portions of the transgene region. A further advantage is that sequences can be deleted or inserted onto the YAC by utilizing high frequency homologous recombination in yeast. This provides for facile engineering of the YAC transgenes.

Another strategy of incorporating large segments of human nucleic acid into mammals, such as occurs for the creation of human antibodies is known as the "minilocus approach". The "minilocus approach" is directed to facsimile reproduction of the locus for the gene of interest (such as an immunoglobulin) through inclusion of individual genes which comprise the locus. For example, when the locus is an immunoglobulin, the component genes may be one or more VH genes, one or more DH genes, one or more JH genes, a mu constant region, a second constant region can be formed into a single construct for insertion into the animal. Examples of this approach are described in U.S.P. 5,545,807 to Surani et al., U.S.P. 5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650 and 5,814,318 each to Lonberg and Kay, U.S.P. 5,591,669 to Krimpenfort and Berns, U.S.P. 5,612,205, 5,721,367, 5,789,215 to Berns et al., and U.S.P. 5,643,763 to Choi and Dunn, European Patent No. 0 546 073 B1 and International Patent Application Nos. WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227,

WO 02/101069

PCT/US02/10513

WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 and 98/24884. Additional examples appear in Taylor et al., *Nucleic Acids Res.* 20: 6287-6295 (1992), Chen et al., *Inter. Immunol.* 5: 647-656 (1993), Tuailon et al., *J. Immunol.* 154: 6453-6465 (1995), Choi et al., *Nature Genetics* 4: 117-123 (1993), Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994), Taylor et al., *Internat. Immunol.* 6: 579-591 (1994), Tuailon et al., *J. Immunol.* 154: 6453-6465 (1995) and Fishwild et al., *Nature Biotech.* 14: 845-851 (1996).

Yet another strategy for introducing human nucleic acid into mammalian cells is termed "microcell fusion". In microcell fusion, portions or whole human chromosomes can be introduced into mice as described in European Pat. No. EP 0 843 961 A1. Because this approach results in a transgene comprising a substantial amount of genetic material, when a particular locus comprises many genes, there is typically not a great degree of control over the profile of expression of each particular gene. Another difficulty with microcell fusion is that the transchromosomes are mitotically and meiotically unstable. For example, when the transgene was an immunoglobulin locus, the transchromosomes encoding human IgH, IgK or both were lost with a frequency approaching 80%.

I. Uses of NS4 polynucleotide polypeptides encoded thereby for weight related disorders, treatment and diagnosis.

The invention is also directed to the use of NS4 DNA, polypeptides encoded therefrom, including peptide fragments thereof and antibodies directed thereagainst and peptide fragments for various particular uses related to the diagnosis and treatment of body weight disorders, such as obesity, cachexia and anorexia.

While each of the uses described below are directed primarily to body weight disorders, it should be recognized that the diagnostic and therapeutic treatments described below can also be used in connection with other defects associated with such body weight disorders, such as, polycystic ovarian disease, dermatological disorders such as infections, varicose veins, Acanthosis nigricans, and eczema, exercise intolerance, abnormal metabolism, hyperphagia, diabetes mellitus, insulin resistance, hypertension, hypercholesterolemia, stroke, hyperlipidemia, cholelithiasis, osteoarthritis, orthopedic injury, thromboembolic disease, cancer, and coronary heart disease.

Such uses include, for example: (1) prognostic and diagnostic evaluation of body weight disorder and the identification of individuals at risk for developing such disorders; (2) methods for the treatment of body weight disorders; (3) identification of compounds which modulate the expression of the NS4 DNA or activity of NS4 polypeptide (4). More specifically, such uses on an individual include, the detection of the presence of an NS4 mutant, or the detection of either over- or under-expression of NS4 polypeptide relative to wild type expression levels, non-diseased organisms having genetic profile which correlates with a diseased state, or the susceptibility toward such body weight disorders.

The methods described herein may be performed, for example, by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one specific NS4 nucleic acid or anti-NS4 polypeptide described herein, which may be used to screen and diagnose individuals exhibiting body weight disorder abnormalities, and then screen such individuals having a predisposition to developing a body weight disorder abnormality.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

In the detection of NS4 mutants, any nucleated cell from the individual in question can be used as a source for genomic nucleic acid. In the detection of NS4 expression, any cell type or tissue in which the NS4 DNA is expressed may be utilized, such as, for example, tissues or cells shown herein to express the NS4 DNA. Examples of both nucleic acid-based as well as peptide-based detection techniques are described below.

5 (1) *Detection of NS4 nucleic acid*

Mutations or polymorphisms within the NS4 DNA can be detected through a number of techniques. Nucleic acid from any nucleated cell can be used as the starting point for such assay techniques, and may be isolated according to standard nucleic acid preparation procedures which are well known to those of skill in the art.

10 Genomic DNA may be used in hybridization or amplification assays of biological samples to detect abnormalities involving NS4 gene structure, including point mutations, insertions, deletions and chromosomal rearrangements. Such assays may include, but are not limited to, Southern analyses, single stranded conformation polymorphism analyses (SSCP), and PCR analyses.

15 Diagnostic methods for the detection of NS4 gene- specific mutations can involve for example, contacting and incubating nucleic acids obtained from a sample, *e.g.*, derived from a patient sample or other appropriate cellular source with one or more labeled nucleic acid reagents including recombinant DNA molecules, cloned genes or degenerate variants thereof, under conditions favorable for the specific annealing of these reagents to their complementary sequences within or flanking the NS4 gene. Preferably, the lengths of such nucleic acid reagents can be at least 15 to 30 nucleotides.

20 After incubation, all non-annealed nucleic acids are removed from the nucleic acid:NS4 molecule hybrid. The presence of nucleic acids that have hybridized, if any such molecules exist, is then detected. Using such a detection scheme, the nucleic acid from the cell type or tissue of interest can be immobilized, for example, to a solid support such as a membrane, or a plastic surface such as that on a microtiter plate or polystyrene beads. In this case, after incubation, non-annealed, labeled nucleic acid reagents are easily removed. Detection of the remaining, annealed, labeled NS4 nucleic acid reagents is accomplished using standard techniques well-known to those in the art. The

25 NS4 DNA sequences to which the nucleic acid reagents have annealed can be compared to the annealing pattern expected from a normal NS4 DNA sequence in order to determine whether an NS4 DNA mutation is present.

30 In a preferred embodiment, NS4 gene mutations or polymorphisms can be detected by using a microassay of NS4 nucleic acid sequences immobilized to a substrate or "gene chip" (*see, e.g. Cronin, et al., Human Mutation 7:244-255(1996).*

Alternative diagnostic methods for the detection of NS4 gene specific nucleic acid molecules, in patient samples or other appropriate cell sources, may involve their amplification, *e.g.*, by PCR (the experimental embodiment set forth in U.S. Patent No. 4,683,202), followed by the analysis of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art, such as, for example, those listed above. The resulting amplified sequences can be compared to those that would be expected if the nucleic acid being amplified contained only normal copies of the NS4 gene in order to determine whether an NS4 gene mutation exists.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Among those NS4 nucleic acid sequences which are preferred for such amplification-related diagnostic screening analyses are oligonucleotide primers which amplify NS4 exon sequences. The sequences of such oligonucleotide primers are, therefore, preferably derived from NS4 intron sequences so that the entire exon, or coding region, can be analyzed as discussed below. Primer pairs useful for amplification of NS4 exons are preferably derived from adjacent introns. Appropriate primer pairs can be chosen such that each of the 25 NS4 exons are amplified.

Primers for the amplification of NS4 exons can be routinely designed by one of ordinary skill in the art by utilizing the coding and untranslated sequences of NS4 shown in Figures 1A, 1B and 1C. Additional NS4 nucleic acid sequences which are preferred for such amplification-related analyses are those which will detect the presence of an NS4 polymorphism. Such polymorphisms include ones which represent mutations associated with body weight disorders such as obesity, cachexia, or anorexia.

Further, well-known genotyping techniques can be performed to type polymorphisms that are in close proximity to mutations in the NS4 gene itself, including mutations associated with weight disorders such as obesity, cachexia, or anorexia. Such polymorphisms can be used to identify individuals in families likely to carry mutations in the NS4 gene. If a polymorphism exhibits linkage disequilibrium with mutations in the NS4 gene, the polymorphism can also be used to identify individuals in the general population who are likely to carry such mutations.

Polymorphisms that can be used in this way include restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), which involve sequence variations in restriction enzyme target sequences, single-base polymorphisms, and simple sequence length polymorphisms (SSLPs). For example, U.S. Pat. No. 5,075,217 describes a DNA marker based on length polymorphisms in blocks of (dC-dA)<sub>n</sub>-(dG-dT)<sub>n</sub> short tandem repeats. The average separation of (dC-dA)<sub>n</sub>-(dG-dT)<sub>n</sub> blocks is estimated to be 30,000-60,000 bp. Markers that are so closely spaced exhibit a high frequency co-inheritance, and are extremely useful in the identification of genetic mutations, such as, for example, mutations within the NS4 gene, and the diagnosis of diseases and disorders related to mutations in the NS4 gene.

Also, U.S. Pat.No. 5,364,759 describe a DNA profiling assay for detecting short tri and tetra nucleotide repeat sequences. The process includes extracting the DNA of interest, such as the NS4 gene, amplifying the extracted DNA, and labelling the repeat sequences to form a genotypic map of the individual's DNA.

An NS4 probe could additionally be used to directly identify RFLPs. Further, a NS4 probe or primers derived from the NS4 sequence could be used to isolate genomic clones such as YACs, BACs, PACs, cosmids, phage, or plasmids.

The DNA contained in these clones can be screened for single-base polymorphisms or SSLPs using standard hybridization or sequencing procedures. The level of NS4 gene expression can also be assayed. For example, RNA from a cell type or tissue known, or suspected, to express the NS4 gene, such as muscle, brain, kidney, testes, heart, liver, lung, skin, hypothalamus, spleen, and adipose tissue may be isolated and tested utilizing hybridization or PCR techniques such as are described, above. The isolated cells can be derived from cell culture or from a patient. The analysis of cells taken from culture may be a necessary step in the assessment of cells to be used as part of a cell-based

WO 02/101069

PCT/US02/10513

gene therapy technique or, alternatively, to test the effect of compounds on the expression of the NS4 gene. Such analyses may reveal both quantitative and qualitative aspects of the expression pattern of the NS4 gene, including activation or inactivation of NS4 gene expression.

5 In one embodiment of such a detection scheme, a cDNA molecule is synthesized from an RNA molecule of interest (e.g., by reverse transcription of the RNA molecule into cDNA). All or part of the resulting cDNA is then used as the template for a nucleic acid amplification reaction, such as a PCR amplification reaction, or the like. The nucleic acid reagents used as synthesis initiation reagents (e.g., primers) in the reverse transcription and nucleic acid amplification steps of this method are chosen from among the NS4 gene nucleic acid reagents described herein.

10 The preferred lengths of such nucleic acid reagents are at least 9-30 nucleotides. For detection of the amplified product, the nucleic acid amplification may be performed using radioactively or non-radioactively labeled nucleotides. Alternatively, enough amplified product may be made such that the product may be visualized by standard ethidium bromide staining or by utilizing any other suitable nucleic acid staining method.

As an alternative to amplification techniques, standard Northern analyses can be performed to determine the level of mRNA expression of the NS4 gene, if a sufficient quantity of the appropriate cells can be obtained.

15 Additionally, it is possible to perform such NS4 gene expression assays "in situ", i.e., directly upon tissue sections (fixed and/or frozen) of patient tissue obtained from biopsies or resections, such that no nucleic acid purification is necessary. Nucleic acid reagents such as those described herein may be used as probes and/or primers for such *in situ* procedures (see, for example, Nuovo, G.J., 1992, "PCR In Situ Hybridization: Protocols and Applications", Raven Press, NY).

20

(2) *Detection of NS4 gene products.*

NS4 gene products, including both native sequence, variants, and polypeptide fragments thereof, may be detected using antibodies which are directed against such NS4 gene products. Such anti-NS4 antibodies may be used as diagnostics and prognostics for a body weight disorder. Such methods may be used to detect abnormalities in the level of NS4 gene expression or of NS4 gene product synthesis, or abnormalities in the structure, temporal expression, and/or physical location of NS4 gene product. The antibodies and immunoassay methods described herein have, for example, important *in vitro* applications in assessing the efficacy of treatments for body weight disorders such as obesity, cachexia, and anorexia. Antibodies, or fragments of antibodies, such as those described below, may be used to screen potentially therapeutic compounds *in vitro* to determine their effects on NS4 gene expression and NS4 gene product production. The compounds that have beneficial effects on body weight disorders, such as obesity, cachexia, and anorexia, can thereby be identified, and a therapeutically effective dose determined.

25 *In vitro* immunoassays may also be used, for example, to assess the efficacy of cell-based gene therapy for a body weight disorders, including obesity, cachexia, and anorexia. Antibodies directed against NS4 gene products may be used *in vitro* to determine, for example, the level of NS4 gene expression achieved in cells genetically engineered to produce NS4 gene product. In the case of intracellular NS4 gene products, such an assessment is done, preferably, using cell lysates or extracts. Such analysis will allow for a determination of the number of transformed

35

WO 02/101069

PCT/US02/10513

cells necessary to achieve therapeutic efficacy *in vivo*, as well as optimization of the gene replacement protocol.

The tissue or cell type to be analyzed will generally include those that are known, or suspected, to express an NS4 gene. The protein isolation methods employed herein may, for example, be such as those described in Harlow and Lane (1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). The isolated cells can be derived from cell culture or from a patient. The analysis of cells taken from culture may be a necessary step in the assessment of cells to be used as part of a cell-based gene therapy technique or, alternatively, to test the effect of compounds on the expression of the NS4 gene.

Preferred diagnostic methods for the detection of NS4 gene products, conserved variants or peptide fragments thereof, may involve, for example, immunoassays wherein the NS4 gene products or conserved variants or peptide fragments are detected by their interaction with an anti-NS4 gene product-specific antibody.

For example, antibodies, or fragments of antibodies, such as those described, above, may be used to quantitatively or qualitatively detect the presence of NS4 gene products or conserved variants or peptide fragments thereof. This can be accomplished, for example, by immunofluorescence techniques employing a fluorescently labeled antibody coupled with light microscopic, flow cytometric, or fluorimetric detection. Such techniques are especially preferred for NS4 gene products that are expressed on the cell surface.

The antibodies (or fragments thereof) useful in the present invention may, additionally, be employed histologically, as in immunofluorescence or immunoelectron microscopy, for *in situ* detection of NS4 gene products, conserved variants or peptide fragments thereof. *In situ* detection may be accomplished by removing a histological specimen from a patient, and applying thereto a labeled antibody that binds to an NS4 polypeptide. The antibody (or fragment) is preferably applied by overlaying the labeled antibody (or fragment) onto a biological sample. Through the use of such a procedure, it is possible to determine not only the presence of the NS4 gene product, conserved variants or peptide fragments, but also its distribution in the examined tissue. Using the present invention, those of ordinary skill will readily recognize that any of a wide variety of histological methods (such as staining procedures) can be modified in order to achieve *in situ* detection of an NS4 gene product.

Immunoassays for NS4 gene products, conserved variants, or peptide fragments thereof will typically comprise: (1) incubating a sample, such as a biological fluid, a tissue extract, freshly harvested cells, or lysates of cells in the presence of a detectably labeled antibody capable of identifying NS4 gene products, conserved variants or peptide fragments thereof; and (2) detecting the bound antibody by any of a number of techniques well-known in the art.

The biological sample may be brought in contact with and immobilized onto a solid phase support or carrier, such as nitrocellulose, that is capable of immobilizing cells, cell particles or soluble proteins. The support may then be washed with suitable buffers followed by treatment with the detectably labeled NS4 gene product specific antibody.

The solid phase support may then be washed with the buffer a second time to remove unbound antibody. The amount of bound label on the solid support may then be detected by conventional means.

"Solid phase support or carrier" means any support capable of binding an antigen or an antibody. Well-

WO 02/101069

PCT/US02/10513

known supports or carriers include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, natural and modified celluloses, polyacrylamides, gabbros, and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble to some extent or insoluble for the purposes of the present invention. The support material may have virtually any possible structural configuration so long as the coupled molecule is capable of binding to an antigen or antibody.

5 Thus, the support configuration may be spherical, as in a bead, or cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the external surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as a sheet, test strip, etc. Preferred supports include polystyrene beads. Those skilled in the art will know many other suitable carriers for binding antibody or antigen, or will be able to ascertain the same by use of routine experimentation.

One method for detectably labeling an NS4 gene product-specific antibody is through linkage to a readily  
10 detectable enzyme, such as an enzyme immunoassay (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)II, *Diagnostic Horizons* 2: 1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD (1978); Voller, A. et al., *J. Clin. Pathol.* 31, 507-520 (1978); Butler, J.E., *Meth. Enzymol.* 73: 482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, FL (1980); Ishikawa, E., et al. (eds.), *Enzyme Immunoassay*, Kogaku Shoin, Tokyo (1981). The enzyme which is bound to the antibody will react with an appropriate substrate,  
15 preferably a chromogenic substrate, in such a manner as to produce a chemical moiety that can be detected, for example, by spectrophotometric, fluorimetric or by visual means. Enzymes that can be used to detectably label the antibody include, but are not limited to, malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-5-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase,  $\alpha$ -glycerophosphate, dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase,  $\beta$ -galactosidase, ribonuclease, urease, catalase,  
20 glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and acetylcholinesterase. The detection can be accomplished by colorimetric methods that employ a chromogenic substrate for the enzyme. Detection may also be accomplished by visual comparison of the extent of enzymatic reaction of a substrate in comparison with similarly prepared standards.

Detection may also be accomplished using any of a variety of other immunoassays. For example, by  
25 radioactively labeling the antibodies or antibody fragments, it is possible to detect NS4 gene products through the use of a radioimmunoassay (RIA) (see, for example, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986). The radioactive isotope can be detected by such means as the use of a gamma counter or a scintillation counter or by autoradiography.

It is also possible to label the antibody with a fluorescent compound. When the fluorescently labeled  
30 antibody is exposed to light of the proper wave length, its presence can then be detected due to fluorescence. Among the most commonly used fluorescent labeling compounds are fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, *o*-phthaldehyde and fluorescamine.

The antibody can also be detectably labeled using fluorescence emitting metals such as  $^{152}\text{Eu}$ , or others of the lanthanide series. These metals can be attached to the antibody using such metal chelating groups as diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

35 The antibody also can be detectably labeled by coupling it to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-tagged antibody is then determined by detecting the presence of luminescence that arises

WO 02/101069

PCT/US02/10513

during the course of a chemical reaction. Examples of particularly useful chemiluminescent labeling compounds are luminol, isoluminol, therromatic acridinium ester, imidazole, acridinium salt and oxalate ester.

Likewise, a bioluminescent compound may be used to label the antibody of the present invention. Bioluminescence is a type of chemiluminescence found in biological systems in which a catalytic protein increases the efficiency of the chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent protein is determined by detecting the presence of luminescence. Important bioluminescent compounds for purposes of labeling are luciferin, luciferase and aequorin.

(3) *Screening Assays for Compounds that Interact with NS4 nucleic acid or Gene Product*

The following assays are designed to identify compounds that bind to an NS4 gene product, compounds that bind to proteins, or portions of proteins that interact with an NS4 gene product, compounds that interfere with the interaction of an NS4 gene product with proteins and compounds that modulate the activity of the NS4 gene (i.e., modulate the level of NS4 gene expression and/or modulate the level of NS4 gene product activity). Assays may additionally be utilized that identify compounds that bind to NS4 gene regulatory sequences (e.g., promoter sequences; see e.g., Platt, *J. Biol. Chem.* 269: 28558-28562 (1994), which is incorporated herein by reference in its entirety, and that can modulate the level of NS4 gene expression. Such compounds may include, but are not limited to, small organic molecules, such as ones that are able to cross the blood-brain barrier, gain to and/or entry into an appropriate cell and affect expression of the NS4 gene or some other gene involved in the body weight regulatory pathway, or intracellular proteins.

Methods for the identification of such proteins are described, below. Such proteins may be involved in the control and/or regulation of body weight. Furthermore, among these compounds are compounds that affect the level of NS4 gene expression and/or NS4 gene is product activity and that can be used in the therapeutic treatment of body weight disorders, including obesity, cachexia, and anorexia.

Compounds may include, but are not limited to, peptides such as, for example, soluble peptides, including but not limited to, Ig-tailed fusion peptides, and members of random peptide libraries; (see, e.g., Lam *et al.*, *Nature* 354: 82-84 (1991); Houghten *et al.*, *Nature* 354: 84-86 (1991), and combinatorial chemistry-derived molecular library made of D- and/or L- configuration amino acids, phosphopeptides (including, but not limited to members of random or partially degenerate, directed phosphopeptide libraries; see, e.g., Songyang *et al.*, *Cell* 72: 767-778 (1993), antibodies (including, but not limited to, polyclonal, monoclonal, humanized, anti-idiotypic, chimeric or single chain antibodies, and FAb, F(ab'), and FAb expression library fragments, and epitope-binding fragments thereof), and small organic or inorganic molecules.

Compounds identified via assays such as those described herein may be useful, for example, in elaborating the biological function of the NS4 gene product and for ameliorating body weight disorders, such as obesity, cachexia, or anorexia.

(a) *In vitro Screening Assays for Compounds that Bind to NS4 gene product*

*In vitro* systems may be designed to identify compounds capable of binding the NS4 gene products of the

WO 02/101069

PCT/US02/10513

invention. Compounds identified may be useful, for example, in modulating the activity of unpaired and/or mutant NS4 gene products, in elaborating the biological function of the NS4 gene product, in screens for identifying compounds that disrupt normal NS4 gene product interactions, or may in themselves disrupt such interactions.

5 The principle of the assays used to identify compounds that bind to the NS4 gene product involves preparing a reaction mixture of the NS4 gene product and the test compound under conditions and for a time sufficient to allow the two components to interact and bind, thus forming a complex that can be removed and/or detected in the reaction mixture. These assays can be conducted in a variety of ways. For example, one method to conduct such an assay involves anchoring an NS4 gene product or a test substance onto a solid support and detecting NS4 gene product/test compound complexes formed on the solid support at the end of the reaction. In one embodiment of such a method, 10 the NS4 gene product may be anchored onto a solid support, and the test compound, which is not anchored, may be labeled, either directly or indirectly.

In practice, microtiter plates are conveniently utilized as the solid support. The anchored component may be immobilized by non-covalent or covalent attachments. Non-covalent attachment may be accomplished by simply coating the solid surface with a solution of the protein and drying. Alternatively, an immobilized antibody, preferably 15 a monoclonal antibody, specific for the protein to be immobilized may be used to anchor the protein to the solid surface. The surfaces may be prepared in advance and stored.

In order to conduct the assay, the non-immobilized component is added to the coated surface containing the anchored component. After the reaction is complete, unreacted components are removed (*e.g.*, by washing) under conditions such that any complexes formed will remain immobilized on the solid surface. The detection of complexes 20 anchored on the solid surface can be accomplished in a number of ways. Where the previously non-immobilized component is pre-labeled, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexes were formed. Where the previously non-immobilized component is not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the surface; *e.g.*, using a labeled antibody specific for the previously non-immobilized component (the antibody, in turn, may be directly labeled or indirectly labeled with a labeled anti-Ig antibody). 25

Alternatively, a reaction can be conducted in a liquid phase, the reaction products separated from unreacted components, and complexes detected; *e.g.*, using an immobilized antibody specific for NS4 gene product or the test compound to anchor any complexes formed in solution, and a labeled antibody specific for the other component of the possible complex to detect anchored complexes.

30 *(b) Assays for Proteins that Interact with the NS4 Gene Product*

Any method suitable for detecting protein-protein interactions may be employed for identifying NS4 gene product-protein interactions. Among the traditional methods that may be employed are co-immunoprecipitation, cross-linking and co-purification through gradients or chromatographic columns. Utilizing procedures such as these allows for the identification of proteins that interact with NS4 gene products. Such proteins can include, but are not 35 limited, the NS4 gene product. Once isolated, such a protein can be identified and can be used in conjunction with standard techniques, to identify proteins it interacts with. For example, at least a portion of the amino acid sequence

WO 02/101069

PCT/US02/10513

of a protein that interacts with the NS4 gene product can be ascertained using techniques well known to those of skill in the art, such as via the Edman degradation technique (see, e.g., Creighton, "Proteins: Structures and Molecular Principles," W.H. Freeman & Co., N.Y., pp. 34-49 (1983)). The amino acid sequence obtained may be used as a guide for the generation of oligonucleotide mixtures that can be used to screen for gene sequences encoding such proteins.

5 Screening may be accomplished, for example, by standard hybridization or PCR techniques. Techniques for the generation of oligonucleotide mixtures and the screening are well-known. (See, e.g., Ausubel, *supra*, and 1990, "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications," Innis *et al.*, eds. Academic Press, Inc., New York).

Additionally, methods may be employed that result in the simultaneous identification of genes that encode a protein which interacts with an NS4 gene product. These methods include, for example, probing expression libraries with labeled NS4 gene product, using NS4 gene product in a manner similar to the well known technique of antibody 10 probing of Xgt11 libraries. One method that detects protein interactions *in vivo*, the two-hybrid system, is described in detail for illustration only and not by way of limitation. One version of this system has been described (Chien, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9578-9582 (1991) and is commercially available from Clontech (Palo Alto, CA). Briefly, utilizing such a system, plasmids are constructed that encode two hybrid proteins: one consists of the DNA-binding domain of a transcription activator protein fused to the NS4 gene product and the other consists of the 15 transcription activator protein's activation domain fused to an unknown protein that is encoded by a cDNA that has been recombined into this plasmid as part of a cDNA library. The DNA-binding domain fusion plasmid and the cDNA library are transformed into a strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* that contains a reporter gene (e.g., HBS or lacZ) whose regulatory region contains the transcription activator's binding site. Either hybrid protein alone cannot activate transcription of the reporter gene: the DNA-binding domain hybrid cannot because it does not provide 20 activation function and the activation domain hybrid cannot because it cannot localize to the activator's binding sites. Interaction of the two hybrid proteins reconstitutes the functional activator protein and results in expression of the reporter gene, which is detected by an assay for the reporter gene product.

The two-hybrid system or related methodologies may be used to screen activation domain libraries for 25 proteins that interact with the "bait" gene product. By way of example, and not by way of limitation, NS4 gene products may be used as the bait gene product. Total genomic or cDNA sequences are fused to the DNA encoding an activation domain.

This library and a plasmid encoding a hybrid of a bait NS4 gene product fused to the DNA-binding domain are co-transformed into a yeast reporter strain, and the resulting transformants are screened for those that express the 30 reporter gene. For example, a bait NS4 gene sequence, such as the open reading frame of the NS4 gene, can be cloned into a vector such that it is translationally fused to the DNA encoding the DNA-binding domain of the GAL4 protein. These colonies are purified and the library plasmids responsible for reporter gene expression are isolated. DNA sequencing is then used to identify the proteins encoded by the library plasmids.

A cDNA library of the cell line from which proteins that interact with bait NS4 gene product are to be 35 detected can be made using methods routinely practiced in the art. According to the particular system described herein, for example, the cDNA fragments can be inserted into a vector such that they are translationally fused to the

WO 02/101069

PCT/US02/10513

transcriptional activation domain of GAL4. Such a library can be co-transformed along with the bait NS4 gene-GAL4 fusion plasmid into a yeast strain that contains a lacZ gene driven by a promoter that contains GAL4 activation sequence.

5 A cDNA encoded protein, fused to a GAL4 transcriptional activation domain that interacts with bait NS4 gene product will reconstitute an active GAL4 protein and thereby drive expression of the HIS3 gene. Colonies that express HIS3 can be detected by their growth on petri dishes containing semi-solid agar based media lacking histidine.

The cDNA can then be purified from these strains, and used to produce and isolate the bait NS4 gene product-interacting protein using techniques routinely practiced in the art.

10 (c) *Assays for Compounds that Interfere with NS4 Gene Product Macromolecule Interaction*

The NS4 gene products may, *in vivo*, interact with one or more macromolecules, such as proteins. For example, the NS4 gene-products may, *in vivo*, interact with the NS4 gene products. Other macromolecules which interact with the NS4 gene products may include, but are not limited to, nucleic acid molecules and those proteins 15 identified via methods such as those described herein. For purposes of this discussion, the macromolecules are referred to herein as "binding partners". Compounds that disrupt NS4 gene product binding to a binding partner may be useful in regulating the activity of the NS4 gene product, especially mutant NS4 gene products. Such compounds may include, but are not limited to molecules such as peptides, and the like.

The basic principle of an assay system used to identify compounds that interfere with the interaction between 20 the NS4 gene product and a binding partner or partners involves preparing a reaction mixture containing the NS4 gene product and the binding partner under conditions and for a time sufficient to allow the two to interact and bind, thus forming a complex. In order to test a compound for inhibitory activity, the reaction mixture is prepared in the presence and absence of the test compound. The test compound may be initially included in the reaction mixture, or may be added at a time subsequent to the addition of NS4 gene product and its binding partner. Control reaction 25 mixtures are incubated without the test compound or with a compound which is known not to block complex formation. The formation of any complexes between the NS4 gene product and the binding partner is then detected. The formation of a complex in the control reaction, but not in the reaction mixture containing the test compound, indicates that the compound interferes with the interaction of the NS4 gene product and the binding partner. Additionally, complex formation within reaction mixtures containing the test compound and normal NS4 gene 30 product may also be compared to complex formation within reaction mixtures containing the test compound and a mutant NS4 gene product. This comparison may be important in those cases wherein it is desirable to identify compounds that disrupt interactions of mutant but not normal NS4 gene product.

The assay for compounds that interfere with the interaction of the NS4 gene products and binding partners can be conducted in a heterogeneous or homogeneous format. Heterogeneous assays involve anchoring either the 35 NS4 gene product or the binding partner onto a solid support and detecting complexes formed on the solid support at the end of the reaction. In homogeneous assays, the entire reaction is carried out in a liquid phase. In either

WO 02/101069

PCT/US02/10513

approach, the order of addition of reactants can be varied to obtain different information about the compounds being tested. For example, test compounds that interfere with the interaction between the NS4 gene products and the binding partners, *e.g.*, by competition, can be identified by conducting the reaction in the presence of the test substance; *i.e.*, by adding the test substance to the reaction mixture prior to or simultaneously with the NS4 gene product and interactive intracellular binding partner. Alternatively, test compounds that disrupt preformed complexes, *e.g.*, compounds with higher binding constants that displace one of the components from the complex, can be tested by adding the test compound to the reaction mixture after complexes have been formed. The various formats are described briefly below.

10 In a heterogeneous assay system, either the NS4 gene product or the interactive binding partner, is anchored onto a solid surface, while the non-anchored species is labeled, either directly or indirectly. In practice, microtiter plates are conveniently utilized. The anchored species may be immobilized by non-covalent or covalent attachments. Non-covalent attachment may be accomplished simply by coating the solid surface with a solution of the NS4 gene product or binding partner and drying. Alternatively, an immobilized antibody specific for the species to be anchored may be used to anchor the species to the solid surface. The surfaces may be prepared in advance and stored.

15 In order to conduct the assay, the partner of the immobilized species is exposed to the coated surface with or without the test compound. After the reaction is complete, unreacted components are removed (*e.g.*, by washing) and any complexes formed will remain immobilized on the solid surface. The detection of complexes anchored on the solid surface can be accomplished in a number of ways. Where the non-immobilized species is pre-labeled, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexes were formed. Where the non-immobilized species is not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the surface; *e.g.*, using a labeled antibody specific for the initially non-immobilized species (the antibody, in turn, may be directly labeled or indirectly labeled with a labeled anti-Ig antibody). Depending upon the order of addition of reaction components, test compounds that inhibit complex formation or that disrupt preformed complexes can be detected.

20 Alternatively, the reaction can be conducted in a liquid phase in the presence or absence of the test compound, the reaction products separated from unreacted components, and complexes detected; *e.g.*, using an immobilized antibody specific for one of the binding components to anchor any complexes formed in solution, and a labeled antibody specific for the other partner to detect anchored complexes. Again, depending upon the order of addition of reactants to the liquid phase, test compounds that inhibit complex formation or that disrupt preformed complexes can be identified.

30 In an alternate embodiment of the invention, a homogeneous assay can be used. In this approach, a preformed complex of the NS4 gene product and the interactive binding partner is prepared in which either the NS4 gene product or its binding partners is labeled, but the signal generated by the label is quenched due to complex formation (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,109,496 by Rubenstein which utilizes this approach for immunoassays). The addition of a test substance that competes with and displaces one of the species from the preformed complex will result in the generation of a signal above background. In this way, test substances that disrupt NS4 gene product/binding partner interaction can be identified.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

In another embodiment of the invention, these same techniques can be employed using peptide fragments that correspond to the binding domains of the NS4 gene product and/or the binding partner (in cases where the binding partner is a protein), in place of one or both of the full length proteins. Any number of methods routinely practiced in the art can be used to identify and isolate the binding sites. These methods include, but are not limited to, mutagenesis of the gene encoding one of the proteins and screening for disruption of binding in a co-immunoprecipitation assay. Compensating mutations in the gene encoding the second species in the complex can then be selected. Sequence analysis of the genes encoding the respective proteins will reveal the mutations that correspond to the region of the protein involved in interactive binding. Alternatively, one protein can be anchored to a solid surface using methods described in this Section above, and allowed to interact with and bind to its labeled binding partner, which has been treated with a proteolytic enzyme, such as trypsin. After washing, a short, labeled peptide comprising the binding domain may remain associated with the solid material, which can be isolated and identified by amino acid sequencing. Also, once the gene coding for the segments is engineered to express peptide fragments of the protein, it can then be tested for binding activity and purified or synthesized.

For example, and not by way of limitation, an NS4 gene product can be anchored to a solid material as described, above, in this Section by making a GST-1 fusion protein and allowing it to bind to glutathione agarose beads. The binding partner can be labeled with a radioactive isotope, such as <sup>35</sup>S, and cleaved with a proteolytic enzyme such as trypsin. Cleavage products can then be added to the anchored GST-1 fusion protein and allowed to bind. After washing away unbound peptides, labeled bound material, representing the binding partner binding domain, can be eluted, purified, and analyzed for amino acid sequence by well-known methods. Peptides so identified can be produced synthetically or produced using recombinant DNA technology.

*(d) Assays for the Identification of Compounds Useful in the Treatment of Body Weight Disorders*

Compounds, including but not limited to binding compounds identified via assay techniques such as those described previously can be tested for the ability to treat symptoms of body weight disorders. It should be noted that the assays described herein can identify compounds that affect NS4 activity by either affecting NS4 gene expression or by affecting the level of NS4 gene product activity. For example, compounds may be identified that are involved in another step in the pathway in which the NS4 gene and/or NS4 gene product is involved, such as, for example, a step which is either "upfield" or "downfield" of the step in the pathway mediated by the NS4 gene. Such compounds may, by affecting this same pathway, modulate the effect of NS4 on the development of body weight disorders. Such compounds can be used as part of a therapeutic method for the treatment of the disorder.

Described below are cell-based and animal model-based assays for the identification of compounds exhibiting such an ability to ameliorate symptoms of body weight disorders. First, cell-based systems can be used to identify compounds that may act to ameliorate symptoms of body weight disorders. Such cell systems can include, for example, recombinant or non-recombinant cell, such as cell lines, that express the NS4 gene.

In utilizing such cell systems, cells that express NS4 may be exposed to a compound suspected of exhibiting

WO 02/101069

PCT/US02/10513

an ability to ameliorate body weight disorder symptoms, at a sufficient concentration and for a sufficient time to elicit such an amelioration of such symptoms in the exposed cells. After exposure, the cells can be assayed to measure alterations in the expression of the NS4 gene, e.g., by assaying cell lysates for NS4 mRNA transcripts (e.g., by Northern analysis) or for NS4 gene products expressed by the cell; compounds that modulate expression of the NS4 gene are good candidates as therapeutics.

In addition, animal-based systems or models for a mammalian body weight disorder, for example, transgenic mice containing a human or altered form of NS4 gene, may be used to identify compounds capable of ameliorating symptoms of the disorder. Such animal models may be used as test substrates for the identification of drugs, pharmaceuticals, therapies and interventions. For example, animal models may be exposed to a compound suspected of exhibiting an ability to ameliorate symptoms, at a sufficient concentration and for a sufficient time to elicit such an amelioration of body weight disorder symptoms. The response of the animals to the exposure may be monitored by assessing the reversal of the symptoms of the disorder.

With regard to intervention, any treatments that reverse any aspect of body weight disorder-like symptoms should be considered as candidates for human therapeutic intervention in such a disorder.

(4) *Compounds and Methods for the Treatment of Body Weight Disorders*

Described below are methods and compositions whereby body weight disorders, including obesity, cachexia, and anorexia, may be treated. Such methods can comprise, for example administering compounds which modulate the expression of a mammalian NS4 gene and/or the synthesis or activity of a mammalian NS4 gene product, so that symptoms of the body weight disorder are ameliorated. Alternatively, in those instances whereby the mammalian body weight disorder results from NS4 gene mutations, such methods can comprise supplying the mammal with a nucleic acid molecule encoding an unimpaired NS4 gene product such that an unimpaired NS4 gene product is expressed and symptoms of the disorder are ameliorated. In another embodiment of methods for the treatment of mammalian body weight disorders resulting from NS4 gene mutations, such methods can comprise supplying the mammal with a cell comprising a nucleic acid molecule that encodes an unimpaired NS4 gene product such that the cell expresses the unimpaired NS4 gene product, and symptoms of the disorder are ameliorated.

Alternatively, symptoms of certain body weight disorders such as, for example, cachexia and anorexia, which involve a lower than normal body weight phenotype, may be ameliorated by increasing the level of NS4 gene expression and/or NS4 gene product activity.

(a) *Inhibitory Antisense, Ribozyme and Triple Helix Approaches*

In another embodiment, symptoms of body weight disorders may be ameliorated by decreasing the level of NS4 gene expression and/or NS4 gene product activity by using NS4 gene sequences in conjunction with well-known antisense, gene "knock-out," ribozyme and/or triple helix methods to decrease the level of NS4 gene expression.

Among the compounds that may exhibit the ability to modulate the activity, expression or synthesis of the NS4 gene, including the ability to ameliorate the symptoms of a mammalian body weight disorder, are antisense, ribozyme, and

WO 02/101069

PCT/US02/10513

triple helix molecules. Such molecules may be designed to reduce or inhibit either unimpaired, or if appropriate, mutant target gene activity. Techniques for the production and use of such molecules are well known to those of skill in the art.

Antisense RNA and DNA molecules act to directly block the translation of mRNA by hybridizing to targeted mRNA and preventing protein translation. Antisense approaches involve the design of oligonucleotides that are complementary to a target gene mRNA. The antisense oligonucleotides will bind to the complementary target gene mRNA transcripts and prevent translation. Absolute complementarity, although preferred, is not required.

A sequence "complementary" to a portion of an RNA, as referred to herein, means a sequence having sufficient complementarity to be able to hybridize with the RNA, forming a stable duplex; in the case of double-stranded antisense nucleic acids, a single strand of the duplex DNA may thus be tested, or triplex formation may be assayed. The ability to hybridize will depend on both the degree of complementarity and the length of the antisense nucleic acid. Generally, the longer the hybridizing nucleic acid, the more base mismatches with an RNA it may contain and still form a stable duplex (or triplex, as the case may be). One skilled in the art can ascertain a tolerable degree of mismatch by use of standard procedures to determine the melting point of the hybridized complex.

In one embodiment, oligonucleotides complementary to non-coding regions of the NS4 gene could be used in an antisense approach to inhibit translation of endogenous NS4 mRNA. Antisense nucleic acids should be at least six nucleotides in length, and are preferably oligonucleotides ranging from 6 to about 50 nucleotides in length. In specific aspects the oligonucleotide is at least nucleotides, at least 17 nucleotides, at least 25 nucleotides or at least 50 nucleotides.

Regardless of the choice of target sequence, it is preferred that *in vitro* studies are first performed to quantitate the ability of the antisense oligonucleotide to inhibit gene expression. It is preferred that these studies utilize controls that distinguish between antisense gene inhibition and nonspecific biological effects of oligonucleotides. It is also preferred that these studies compare levels of the target RNA or protein with that of an internal control RNA or protein. Additionally, it is envisioned that results obtained using the antisense oligonucleotide are compared with those obtained using a control oligonucleotide. It is preferred that the control oligonucleotide is of approximately the same length as the test oligonucleotide and that the nucleotide sequence of the oligonucleotide differs from the antisense sequence no more than is necessary to prevent specific hybridization to the target sequence.

The oligonucleotides can be DNA or RNA or chimeric mixtures or derivatives or modified versions thereof, single-stranded or double-stranded. The oligonucleotide can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone, for example, to improve stability of the molecule, hybridization, etc. The oligonucleotide may include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, e.g., Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6553-6556 (1989); Lemaitre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 648-652 (1987); PCT Publication No. W088/09810, published December 15, 1988) or the blood-brain barrier (see e.g., PCT Publication No. W089/10134, published April 25, 1988), hybridization-triggered cleavage agents (see, e.g., Krol *et al.*, *BioTechniques* 6: 958-976 (1988)) or intercalating

WO 02/101069

PCT/US02/10513

agents (see *e.g.*, Zon, *Pharm. Res.* 5: 539-549 (1988)). To this end, the oligonucleotide may be conjugated to another molecule, *e.g.*, a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, hybridization-triggered cleavage agent, *etc.*

The antisense oligonucleotide may comprise at least one modified base moiety which is selected from the group including but not limited to 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xanthine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, NG-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2, 2 - dimethyl guanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonylmethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid ( $\nu$ ), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid -methyl ester, uracil-5-oxyacetic acid ( $\nu$ ), 5-methyl-2-thiouracil, 3 - (3-amino-3-N-2 -carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine.

The antisense oligonucleotide may also comprise at least one modified sugar moiety selected from the group including but not limited to arabinose, 2-fluoroarabinose, xylulose, and hexose. Alternatively, the antisense oligonucleotide comprises at least one modified phosphate backbone selected from the group consisting of a phosphorothioate, a phosphorodithioate, a phosphoramidothioate, a phosphoramidate, a phosphordiamidate, a methylphosphonate, an alkyl phosphotriester, and a formacetal or analog thereof. Alternatively still, the antisense oligonucleotide is an  $\alpha$ -anomeric oligonucleotide. An  $\alpha$ -anomeric oligonucleotide forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual  $\beta$ -units, the strands run parallel to each other (Gautier *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15: 6625-6641 (1987)). The oligonucleotide is a 2'-O-methylribonucleotide (Inoue *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15: 6131-6148 (1987)), or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue *et al.*, *FEBS Lett.* 215: 327-330 (1987)).

Oligonucleotides of the invention may be synthesized by standard methods known in the art, *e.g.*, by use of an automated DNA synthesizer (such as are commercially available from Biosearch, Applied Biosystems, *etc.*). As examples, phosphorothioate oligonucleotides may be synthesized by the method of Stein *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16: 3209 (1988), methylphosphonate oligonucleotides can be prepared by use of controlled pore glass polymer supports (Sarin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 7448-7451 (1988), *etc.*

While antisense nucleotides complementary to the target gene coding region sequence could be used, those complementary to the transcribed, untranslated region are most preferred.

Antisense molecules should be delivered to cells that express the target gene *in vivo*. A number of methods have been developed for delivering antisense DNA or RNA to cells; *e.g.*, antisense molecules can be injected directly into the tissue site, or modified antisense molecules, designed to target the desired cells (*e.g.*, antisense linked to peptides or antibodies that specifically bind receptors or antigens expressed on the target cell surface) can be administered systemically.

However, it is often difficult to achieve intracellular concentrations of the antisense sufficient to suppress

WO 02/101069

PCT/US02/10513

translation of endogenous mRNAs. Therefore a preferred approach utilizes a recombinant DNA construct in which the antisense oligonucleotide is placed under the control of a strong pol III or pol II promoter. The use of such a construct to transfect target cells in the patient will result in the transcription of sufficient amounts of single stranded RNAs that will form complementary base pairs with the endogenous target gene transcripts and thereby prevent translation of the target gene mRNA. For example, a vector can be introduced *e.g.*, such that it is taken up by a cell and directs the transcription of an antisense RNA. Such a vector can remain episomal or become chromosomally integrated, as long as it can be transcribed to produce the desired antisense RNA. Such vectors can be constructed by recombinant DNA technology methods standard in the art. Vectors can be plasmid, viral, or others known in the art, used for replication and expression in mammalian cells. Expression of the sequence encoding the antisense RNA can be by any promoter known in the art to act in mammalian, preferably human cells. Such promoters can be inducible or constitutive. Such promoters include but are not limited to: the SV40 early promoter region (Bernois and Chambon, *Nature* 290: 304-310 (1981), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, *et al.*, *Cell* 22: 787-797 (1980), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1441-1445 (1981), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster *et al.*, *Nature* 296: 39-42 (1982), *etc.* Any type of plasmid, cosmid, YAC or viral vector can be used to prepare the recombinant DNA construct which can be introduced directly into the tissue site. Alternatively, viral vectors can be used that selectively infect the desired tissue, in which case administration may be accomplished by another route (*e.g.*, systemically). Ribozyme molecules designed to catalytically cleave target gene mRNA transcripts can also be used to prevent translation of target gene mRNA and, therefore, expression of target gene product. (See *e.g.*, PCT International Publication W090/11364, published October 4, 1990; Sarver *et al.*, *Science* 247: 1222-1225 (1990).

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. (For a review, see Rossi *Current Biology* 4: 469-471 (1994). The mechanism of ribozyme action involves sequence specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by an endonucleolytic cleavage event. The composition of ribozyme molecules must include one or more sequences complementary to the target gene mRNA, and must include the well known catalytic sequence responsible for mRNA cleavage. For this sequence, see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,093,246, which is incorporated herein by reference in its entirety.

While ribozymes that cleave mRNA at site specific recognition sequences can be used to destroy target gene mRNAs, the use of hammerhead ribozymes is preferred. Hammerhead ribozymes cleave mRNAs at locations dictated by flanking regions that form complementary base pairs with the target mRNA. The sole requirement is that the target mRNA have the following sequence of two bases: 5'-UG-3'. The construction and production of hammerhead ribozymes is well known in the art and is described more fully in Myers, *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, New York, (see especially Figure 4, page 833 (1995) and in Haseloff and Gerlach, *Nature* 334: 585-591 (1988), which is incorporated herein by reference in its entirety.

Preferably the ribozyme is engineered so that the cleavage recognition site is located near the 5' end of the target gene mRNA, *i.e.*, to increase efficiency and minimize the intracellular-accumulation of non-functional mRNA transcripts.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

The ribozymes of the present invention also include RNA endoribonucleases (hereinafter "Cech-type ribozymes") such as the one that occurs naturally in *Tetrahymena thermophila* (known as the IVS, or L-19 IVS RNA) and that has been extensively described by Thomas Cech and collaborators (Zaug *et al.*, *Science* 224: 574-578 (1984); Zaug and Cech, *Science* 231: 470-475 (1986); Zaug *et al.*, *Nature* 324: 429-433 (1986); published International patent application No. WO 88/04300 by University Patents Inc.; Been and Cech, *Cell* 47: 207-216 (1986). The Cech-type ribozymes have an eight base pair active site which hybridizes to a target RNA sequence whereafter cleavage of the target RNA takes place. The invention encompasses those Cech-type ribozymes which target eight base-pair active site sequences that are present in the target gene.

As in the antisense approach, the ribozymes can be composed of modified oligonucleotides (*e.g.*, for improved stability, targeting, *etc.*) and should be delivered to cells that express the target gene *in vivo*. A preferred method of delivery involves using a DNA construct "encoding" the ribozyme under the control of a strong constitutive pol III or pol II promoter, so that transfected cells will produce sufficient quantities of the ribozyme to destroy endogenous target gene messages and inhibit translation. Because ribozymes unlike antisense molecules, are catalytic, a lower intracellular concentration is required for efficiency.

Endogenous target gene expression can also be reduced by inactivating or "knocking out" the target gene or its promoter using targeted homologous recombination (*e.g.*, see Smithies *et al.*, *Nature* 317: 230-234 (1985); Thomas and Capecchi, *Cell* 51: 503-512 (1987); Thompson *et al.*, *Cell* 5: 313-321 (1989); each of which is incorporated by reference herein in its entirety). For example, a mutant, non-functional target gene (or a completely unrelated DNA sequence) flanked by DNA homologous to the endogenous target gene (either the coding regions or regulatory regions of the target gene) can be used, with or without a selectable marker and/or a negative selectable marker, to transfect cells that express the target gene *in vivo*. Insertion of the DNA construct, via targeted homologous recombination, results in inactivation of the target gene. Such approaches are particularly suited in the agricultural field where modifications to ES (embryonic stem) cells can be used to generate animal offspring with an inactive target gene (*e.g.*, see Thomas and Capecchi, 1987 and Thompson, 1989, *supra*). However this approach can be adapted for use in humans provided the recombinant DNA constructs are directly administered or targeted to the required site *in vivo* using appropriate viral vectors.

Alternatively, endogenous target gene expression can be reduced by targeting deoxyribonucleotide sequences complementary to the regulatory region of the target gene (*i.e.*, the target gene promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the target gene in target cells in the body. (See generally, Helene, *Anticancer Drug Des.*, 6 (6): 569-584 (1991); Helene *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660: 27-36 (1992); and Maher, *Bioassays* 14(12): 807-815 (1992).

Nucleic acid molecules to be used in triplex helix formation for the inhibition of transcription should be single stranded and composed of deoxynucleotides. The base composition of these oligonucleotides must be designed to promote triple helix formation via Hoogsteen base pairing rules, which generally require sizeable stretches of either purines or pyrimidines to be present on one strand of a duplex. Nucleotide sequences may be pyrimidine-based, which will result in TAT and CGC\* triplets across the three associated strands of the resulting triple helix. The

WO 02/101069

PCT/US02/10513

pyrimidine-rich molecules provide base complementarity to a purine-rich region of a single strand of the duplex in a parallel orientation to that strand. In addition, nucleic acid molecules may be chosen that are purine-rich, for example, contain a stretch of G residues. These molecules will form a triple helix with a DNA duplex that is rich in GC pairs, in which the majority of the purine residues are located on a single strand of the targeted duplex, resulting in GGC triplets across the three strands in the triplex.

Alternatively, the potential sequences that can be targeted for triple helix formation may be increased by creating a so called "switchback" nucleic acid molecule. Switchback molecules are synthesized in an alternating 5'-3', 3'-5' manner, such that they base pair with first one strand of a duplex and then the other, eliminating the necessity for a sizeable stretch of either purines or pyrimidines to be present on one strand of a duplex.

In instances wherein the antisense, ribozyme, and/or triple helix molecules described herein are utilized to inhibit mutant gene expression, it is possible that the technique may so efficiently reduce or inhibit the transcription (triple helix) and/or translation (antisense, ribozyme) of mRNA produced by normal target gene alleles that the possibility may arise wherein the concentration of normal target gene product present may be lower than is necessary for a normal phenotype. In such cases, to ensure that substantially normal levels of target gene activity are maintained, therefore, nucleic acid molecules that encode and express target gene polypeptides exhibiting normal target gene activity may, be introduced into cells via gene therapy methods such as those described, below, that do not contain sequences susceptible to whatever antisense, ribozyme, or triple helix treatments are being utilized. Alternatively, in instances whereby the target gene encodes an extracellular protein, it may be preferable to co-administer normal target gene protein in order to maintain the requisite level of target gene activity.

Anti-sense RNA and DNA, ribozyme, and triple helix molecules of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of DNA and RNA molecules, as discussed above. These include techniques for chemically synthesizing oligodeoxyribonucleotides and oligoribonucleotides well known in the art such as for example solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by *in vitro* and *in vivo* transcription of DNA sequences encoding the antisense RNA molecule. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors that incorporate suitable RNA polymerase promoters such as the T7 or SP6 polymerase promoters. Alternatively, antisense cDNA constructs that synthesize antisense RNA constitutively or inducibly, depending on the promoter used, can be introduced stably into cell lines.

(b) *Gene Replacement Therapy*

The NS4 gene nucleic acid sequences described herein can be utilized for the treatment of a mammalian body weight disorders, including obesity, cachexia, and anorexia. Such treatment can be in the form of gene replacement therapy. Specifically, one or more copies of a normal NS4 gene or a portion of the NS4 gene that directs the production of a NS4 gene product exhibiting normal NS4 gene function, may be inserted into the appropriate cells within a patient, using vectors that include, but are not limited to adenovirus, adeno-associated virus, and retrovirus vectors, in addition to other particles that introduce DNA into cells, such as liposomes.

Because the NS4 gene is expressed in the brain, such gene replacement therapy techniques should be capable

WO 02/101069

PCT/US02/10513

delivering NS4 gene sequences to these cell types within patients. Thus, in one embodiment, techniques that are well known to those of skill in the art (see, e.g., PCT Publication No. W089/10134, published April 25, 1988) can be used to enable NS4 gene sequences to cross the blood-brain barrier readily and to deliver the sequences to cells in the brain. With respect to delivery that is capable of crossing the blood-brain barrier, viral vectors such as, for example, those described above, are preferable.

5 In another embodiment, techniques for delivery involve direct administration of such NS4 gene sequences to the site of the cells in which the NS4 gene sequences are to be expressed.

10 Additional methods that may be utilized to increase the overall level of NS4 gene expression and/or NS4 gene product activity include using target homologous recombination methods, to modify the expression characteristic of an endogenous NS4 gene in a cell or microorganism by inserting a heterologous DNA regulatory element such that the inserted regulatory element is operatively linked with the endogenous NS4 gene in question. Targeted homologous recombination can be thus used to activate transcription of an endogenous NS4 gene that is "transcriptionally silent", i.e., is not normally expressed, or to enhance the expression of an endogenous NS4 gene that is normally expressed.

15 Further, the overall level of NS4 gene expression and/or NS4 gene product activity may be increased by the introduction of appropriate NS4-expressing cells, preferably autologous cells, into a patient at positions and in numbers that are sufficient to ameliorate body weight disorder symptoms. Such cells may be either recombinant or non-recombinant.

20 Among the cells that can be administered to increase the overall level of NS4 gene expression in a patient are normal cells, preferably brain cells, that express the NS4 gene. Alternatively, cells, preferably autologous cells, can be engineered to express NS4 gene sequences, and may then be introduced into a patient in positions appropriate for the amelioration of the body weight disorder symptoms. Alternatively, cells that express an unimpaired NS4 gene and that are from a MHC matched individual can be utilized, and may include, for example, brain cells. The expression of the NS4 gene sequences is controlled by the appropriate gene regulatory sequences to allow such expression in the necessary cell types. Such gene regulatory sequences are well known to the skilled artisan. Such cell-based gene therapy techniques are well known to those skilled in the art, see e.g., U.S. Patent No. 5,399,349. When the cells to be administered are non-autologous cells, they can be administered using well known techniques that prevent a host immune response against the introduced cells from developing. For example, the cells may be introduced in an encapsulated form which, while allowing for an exchange of components with the immediate extracellular environment, does not allow the introduced cells to be recognized by the host immune system.

30 Additionally, compounds, such as those identified via techniques such as those described herein, that are capable of modulating NS4 gene product activity can be administered using standard techniques that are well known to those of skill in the art. In instances in which the compounds to be administered are to involve an interaction with brain cells, the administration techniques should include well known ones that allow for a crossing of the blood-brain barrier.

35 All patent and literature references cited in the present specification are hereby incorporated by reference

WO 02/101069

PCT/US02/10513

in their entirety.

#### EXAMPLES

Commercially available reagents referred to in the examples were used according to manufacturer's instructions unless otherwise indicated. The source of those cells identified in the following examples, and throughout the specification, by ATCC accession numbers is the American Type Culture Collection, Manassas, VA.

#### EXAMPLE 1

##### Isolation of cDNA Clones Encoding a Human NS4 (DNA149986-2883 and DNA149995-2871)

A sequence encoding the OPG ligand (without signal sequence) (amino acids 69-317; see Anderson *et al.*, *Nature*, 390:175 (1997)) was used to search sequence databases. The databases included public databases (e.g., GenBank). The search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 [Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)], and it led to the identification of a genomic sequence (AC010969). The genomic DNA sequence was analyzed using the gene prediction program GENSCAN, licensed from Stanford University. GENSCAN analysis predicts gene coding regions, creating DNA sequences with potential open reading frames. A consensus DNA sequence was assembled (DNA143746) which exhibited correspondence to nucleotides 64070 - 64243 of the genomic DNA sequence AC010969. In a translated reading frame, DNA143746 comprises a region of 57 contiguous residues which shows an approximate 60% amino acid sequence identity to the OPG ligand.

Based on the consensus sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO. Forward and reverse PCR primers generally range from 20 to 30 nucleotides and are often designed to give a PCR product of about 100-1000 bp in length. The probe sequences are typically 40-55 bp in length. In some cases, additional oligonucleotides are synthesized when the consensus sequence is greater than about 1-1.5 kbp. In order to screen several libraries for a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification, as per Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, *supra*, with the PCR primer pair. A positive library was then used to isolate clones encoding the gene of interest using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs.

PCR primers (forward and reverse) were synthesized:

forward PCR primer 5' - GATTGGGCAAACGTCTCCAACATGACT - 3' (SEQ ID NO: 7)

reverse PCR primer 5' -TTGTCATGTTTCCAAGAAGAAAGACTCGT - 3' (SEQ ID NO: 8)

Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the consensus DNA144269 sequence which had the following nucleotide sequence:

hybridization probe

5'-CAGCAACGGAAAACCTAAGAGTCAAAGGCATTATTACCGGAATGCCGACATTTGCTCTCGA -3' (SEQ ID NO: 9)

RNA for construction of the cDNA libraries used for the isolation of DNA149986-2883 (SEQ ID NO:2) and DNA149995 (SEQ ID NO:3) was isolated from human fetal brain tissues. RNA from 50 different human cDNA

WO 02/101069

PCT/US02/10513

libraries was pooled and used to clone DNA146649-1789R1. The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to Sall hemikimased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRK5B or pRK5D; pRK5B is a precursor of pRK5D that does not contain the Sfil site; see, Holmes *et al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites.

DNA sequencing of the clones isolated as described above gave the full-length DNA sequences DNA146649-1789R1 (SEQ ID NO:1), DNA149986-2883 (SEQ ID NO:2) and DNA149995-2871 (SEQ ID NO:3) encoding full length polypeptides PRO19652, PRO19816 and PRO19650, respectively.

The clone DNA146649-1789R1 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 486-488 and a stop signal at nucleotide positions 747-749 (Figure 1A, SEQ ID NO:1). The predicted polypeptide precursor is 87 amino acids long, has a calculated molecular weight of approximately 9958 daltons and an estimated pI of approximately 9.70. The clone DNA149986-2883 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 1784-1786 and a stop signal at nucleotide positions 2069-2071 (Figure 1B, SEQ ID NO:2). The predicted polypeptide precursor is 95 amino acids long, has a calculated molecular weight of approximately 10734 daltons and an estimated pI of approximately 10.00. The clone DNA149995-2871 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 447-449 and a stop signal at nucleotide positions 732-734 (Figure 1C, SEQ ID NO:3). The predicted polypeptide precursor is 95 amino acids long, has a calculated molecular weight of approximately 10704 daltons and an estimated pI of approximately 10.00.

Analysis of the full-length polypeptide sequences shown in Figure 2A, Figure 2B and 2C (SEQ ID NOs:4, 5 & 6), respectively, evidence the presence of a variety of important polypeptide domains as shown in Figures 2A, 2B & 2C, respectively, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximately as described above.

The amino acid sequences of PRO19650 and PRO19816 polypeptides are identical except for amino acid position 5 which is occupied by threonine in PRO19650 and methionine in PRO19816. The amino acid sequence PRO19652 appears to be truncated variant of PRO19650, in which the C-terminal is shortened and the remaining 3 C-terminal residues are different. A comparison of the polypeptides appears in Figure 4.

Clones DNA146649-1789R1, DNA149995-2871 and DNA149986-2883 have been deposited with the ATCC on May 15, 2001, May 31, 2000 and April 4, 2000 respectively, and are assigned ATCC deposit Nos. PTA-3376, PTA-1971 and PTA-1627 respectively.

#### EXAMPLE 2

##### Use of NS4 polynucleotides as hybridization probes

The following method describes use of a nucleotide sequence encoding SRT as a hybridization probe.

DNA comprising the coding sequence of full-length or mature SRT is employed as a probe to screen for homologous DNAs (such as those encoding naturally-occurring variants of SRT) in human tissue cDNA libraries

WO 02/101069

PCT/US02/10513

or human tissue genomic libraries.

Hybridization and washing of filters containing either library DNAs is performed under the following high stringency conditions. Hybridization of radiolabeled SRT-derived probe to the filters is performed in a solution of 50% formamide, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.1% sodium pyrophosphate, 50 mM sodium phosphate, pH 6.8, 5 2x Denhardt's solution, and 10% dextran sulfate at 42°C for 20 hours. Washing of the filters is performed in an aqueous solution of 0.1x SSC and 0.1% SDS at 42°C.

DNAs having a desired sequence identity with the DNA encoding full-length native sequence SRT can then be identified using standard techniques known in the art.

Using standard Northern blot techniques (Clontech), it has been determined that DNA146649-1789R1 10 (SEQ ID NO:1) shows expression in various tissues as reported in Figures 5A, 5B and 5C, and various tumor cell lines as reported in Figure 5D.

### EXAMPLE 3

#### Expression of NS4 in *E. coli*

15 This example illustrates preparation of an unglycosylated form of NS4 by recombinant expression in *E. coli*.

The DNA sequence encoding NS4 is initially amplified using selected PCR primers. The primers should contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector. A variety of expression vectors may be employed. An example of a suitable vector is pBR322 (derived from *E. coli*; see Bolivar *et al.*, *Gene* 2:95 (1977)) which contains genes for ampicillin and tetracycline resistance. The vector is 20 digested with restriction enzyme and dephosphorylated. The PCR amplified sequences are then ligated into the vector. The vector will preferably include sequences which encode for an antibiotic resistance gene, a trp promoter, a polyhis leader (including the first six STII codons, polyhis sequence, and enterokinase cleavage site), the NS4 coding region, lambda transcriptional terminator, and an argU gene.

The ligation mixture is then used to transform a selected *E. coli* strain using the methods described in 25 Sambrook *et al.*, *supra*. Transformants are identified by their ability to grow on LB plates and antibiotic resistant colonies are then selected. Plasmid DNA can be isolated and confirmed by restriction analysis and DNA sequencing.

Selected clones can be grown overnight in liquid culture medium such as LB broth supplemented with antibiotics. The overnight culture may subsequently be used to inoculate a larger scale culture. The cells are then 30 grown to a desired optical density, during which the expression promoter is turned on.

After culturing the cells for several more hours, the cells can be harvested by centrifugation. The cell pellet obtained by the centrifugation can be solubilized using various agents known in the art, and the solubilized NS4 35 protein can then be purified using a metal chelating column under conditions that allow tight binding of the protein.

NS4 may be expressed in *E. coli* in a poly-His tagged form, using the following procedure. The DNA encoding NS4 is initially amplified using selected PCR primers. The primers will contain restriction enzyme sites 35 which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector, and other useful sequences providing for efficient and reliable translation initiation, rapid purification on a metal chelation column, and

WO 02/101069

PCT/US02/10513

proteolytic removal with enterokinase. The PCR-amplified, poly-His tagged sequences are then ligated into an expression vector, which is used to transform an *E. coli* host based on strain 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHis(htpRts) clpP(lacIq)). Transformants are first grown in LB containing 50 mg/ml carbenicillin at 30°C with shaking until an O.D.600 of 3-5 is reached. Cultures are then diluted 50-100 fold into CRAP media (prepared by mixing 3.57 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.71 g sodium citrate•2H<sub>2</sub>O, 1.07 g KCl, 5.36 g Difco yeast extract, 5.36 g Sheffield hycase SF in 500 mL water, as well as 110 mM MPOS, pH 7.3, 0.55% (w/v) glucose and 7 mM MgSO<sub>4</sub>) and grown for approximately 20-30 hours at 30°C with shaking. Samples are removed to verify expression by SDS-PAGE analysis, and the bulk culture is centrifuged to pellet the cells. Cell pellets are frozen until purification and refolding.

*E. coli* paste from 0.5 to 1 L fermentations (6-10 g pellets) is resuspended in 10 volumes (w/v) in 7 M guanidine, 20 mM Tris, pH 8 buffer. Solid sodium sulfite and sodium tetrathionate is added to make final concentrations of 0.1M and 0.02 M, respectively, and the solution is stirred overnight at 4°C. This step results in a denatured protein with all cysteine residues blocked by sulfitolization. The solution is centrifuged at 40,000 rpm in a Beckman Ultracentrifuge for 30 min. The supernatant is diluted with 3-5 volumes of metal chelate column buffer (6 M guanidine, 20 mM Tris, pH 7.4) and filtered through 0.22 micron filters to clarify. The clarified extract is loaded onto a 5 ml Qiagen Ni-NTA metal chelate column equilibrated in the metal chelate column buffer. The column is washed with additional buffer containing 50 mM imidazole (Calbiochem, Utrol grade), pH 7.4. The protein is eluted with buffer containing 250 mM imidazole. Fractions containing the desired protein are pooled and stored at 4°C. Protein concentration is estimated by its absorbance at 280 nm using the calculated extinction coefficient based on its amino acid sequence.

The proteins are refolded by diluting the sample slowly into freshly prepared refolding buffer consisting of: 20 mM Tris, pH 8.6, 0.3 M NaCl, 2.5 M urea, 5 mM cysteine, 20 mM glycine and 1 mM EDTA. Refolding volumes are chosen so that the final protein concentration is between 50 to 100 micrograms/ml. The refolding solution is stirred gently at 4°C for 12-36 hours. The refolding reaction is quenched by the addition of TFA to a final concentration of 0.4% (pH of approximately 3). Before further purification of the protein, the solution is filtered through a 0.22 micron filter and acetonitrile is added to 2-10% final concentration. The refolded protein is chromatographed on a Poros R1/H reversed phase column using a mobile buffer of 0.1% TFA with elution with a gradient of acetonitrile from 10 to 80%. Aliquots of fractions with A280 absorbance are analyzed on SDS polyacrylamide gels and fractions containing homogeneous refolded protein are pooled. Generally, the properly refolded species of most proteins are eluted at the lowest concentrations of acetonitrile since those species are the most compact with their hydrophobic interiors shielded from interaction with the reversed phase resin. Aggregated species are usually eluted at higher acetonitrile concentrations. In addition to resolving misfolded forms of proteins from the desired form, the reversed phase step also removes endotoxin from the samples.

Fractions containing the desired folded NS4 polypeptide are pooled and the acetonitrile removed using a gentle stream of nitrogen directed at the solution. Proteins are formulated into 20 mM HEPES, pH 6.8 with 0.14 M sodium chloride and 4% mannitol by dialysis or by gel filtration using G25 Superfine (Pharmacia) resins equilibrated in the formulation buffer and sterile filtered.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

## EXAMPLE 4

Expression of NS4 in mammalian cells

5 This example illustrates preparation of a potentially glycosylated form of NS4 by recombinant expression in mammalian cells.

The vector, pRK5 (see EP 307,247, published March 15, 1989), is employed as the expression vector. Optionally, the NS4 DNA is ligated into pRK5 with selected restriction enzymes to allow insertion of the NS4 DNA using ligation methods such as described in Sambrook *et al.*, *supra*. The resulting vector is called pRK5-NS4.

10 In one embodiment, the selected host cells may be 293 cells. Human 293 cells (ATCC CCL 1573) are grown to confluence in tissue culture plates in medium such as DMEM supplemented with fetal calf serum and optionally, nutrient components and/or antibiotics. About 10 µg pRK5-NS4 DNA is mixed with about 1 µg DNA encoding the VA RNA gene [Thimmappaya *et al.*, *Cell* 31:543 (1982)] and dissolved in 500 µl of 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M CaCl<sub>2</sub>. To this mixture is added, dropwise, 500 µl of 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO<sub>4</sub>, and a precipitate is allowed to form for 10 minutes at 25°C. The precipitate is suspended and  
15 added to the 293 cells and allowed to settle for about four hours at 37°C. The culture medium is aspirated off and 2 ml of 20% glycerol in PBS is added for 30 seconds. The 293 cells are then washed with serum free medium, fresh medium is added and the cells are incubated for about 5 days.

Approximately 24 hours after the transfections, the culture medium is removed and replaced with culture medium (alone) or culture medium containing 200 µCi/ml <sup>35</sup>S-cysteine and 200 µCi/ml <sup>35</sup>S-methionine. After a 12  
20 hour incubation, the conditioned medium is collected, concentrated on a spin filter, and loaded onto a 15% SDS gel. The processed gel may be dried and exposed to film for a selected period of time to reveal the presence of NS4 polypeptide. The cultures containing transfected cells may undergo further incubation (in serum free medium) and the medium is tested in selected bioassays.

In an alternative technique, NS4 may be introduced into 293 cells transiently using the dextran sulfate  
25 method described by Somparyrac *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12:7575 (1981). 293 cells are grown to maximal density in a spinner flask and 700 µg pRK5-NS4 DNA is added. The cells are first concentrated from the spinner flask by centrifugation and washed with PBS. The DNA-dextran precipitate is incubated on the cell pellet for four hours. The cells are treated with 20% glycerol for 90 seconds, washed with tissue culture medium, and re-introduced into the spinner flask containing tissue culture medium, 5 µg/ml bovine insulin and 0.1 µg/ml bovine transferrin.  
30 After about four days, the conditioned media is centrifuged and filtered to remove cells and debris. The sample containing expressed NS4 can then be concentrated and purified by any selected method, such as dialysis and/or column chromatography.

In another embodiment, NS4 can be expressed in CHO cells. The pRK5-NS4 can be transfected into CHO  
35 cells using known reagents such as CaPO<sub>4</sub> or DEAE-dextran. As described above, the cell cultures can be incubated, and the medium replaced with culture medium (alone) or medium containing a radiolabel such as <sup>35</sup>S-methionine. After determining the presence of NS4 polypeptide, the culture medium may be replaced with serum free medium.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Preferably, the cultures are incubated for about 6 days, and then the conditioned medium is harvested. The medium containing the expressed NS4 can then be concentrated and purified by any selected method.

5 Epitope-tagged NS4 may also be expressed in host CHO cells. The NS4 may be subcloned out of the pRK5 vector. The subclone insert can undergo PCR to fuse in frame with a selected epitope tag such as a poly-his tag into a Baculovirus expression vector. The poly-his tagged NS4 insert can then be subcloned into a SV40 driven vector containing a selection marker such as DHFR for selection of stable clones. Finally, the CHO cells can be transfected (as described above) with the SV40 driven vector. Labeling may be performed, as described above, to verify expression. The culture medium containing the expressed poly-His tagged NS4 can then be concentrated and purified by any selected method, such as by Ni<sup>2+</sup>-chelate affinity chromatography.

10 NS4 may also be expressed in CHO and/or COS cells by a transient expression procedure or in CHO cells by another stable expression procedure.

Stable expression in CHO cells is performed using the following procedure. The proteins are expressed as an IgG construct (immunoadhesin), in which the coding sequences for the soluble forms (e.g. extracellular domains) of the respective proteins are fused to an IgG1 constant region sequence containing the hinge, CH2 and CH2 domains and/or is a poly-His tagged form.

15 Following PCR amplification, the respective DNAs are subcloned in a CHO expression vector using standard techniques as described in Ausubel *et al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). CHO expression vectors are constructed to have compatible restriction sites 5' and 3' of the DNA of interest to allow the convenient shuttling of cDNA's. The vector used expression in CHO cells is as described in Lucas *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 24:9 (1774-1779) (1996), and uses the SV40 early promoter/enhancer to drive expression of the cDNA of interest and dihydrofolate reductase (DHFR). DHFR expression permits selection for stable maintenance of the plasmid following transfection.

20 Twelve micrograms of the desired plasmid DNA is introduced into approximately 10 million CHO cells using commercially available transfection reagents Superfect<sup>®</sup> (Qiagen), Dospere<sup>®</sup> or Fugene<sup>®</sup> (Boehringer Mannheim). The cells are grown as described in Lucas *et al.*, *supra*. Approximately 3 x 10<sup>7</sup> cells are frozen in an ampule for further growth and production as described below.

The ampules containing the plasmid DNA are thawed by placement into water bath and mixed by vortexing. The contents are pipetted into a centrifuge tube containing 10 mLs of media and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. The supernatant is aspirated and the cells are resuspended in 10 mL of selective media (0.2 µm filtered PS20 with 5% 0.2 µm diafiltered fetal bovine serum). The cells are then aliquoted into a 100 mL spinner containing 90 mL of selective media. After 1-2 days, the cells are transferred into a 250 mL spinner filled with 150 mL selective growth medium and incubated at 37°C. After another 2-3 days, 250 mL, 500 mL and 2000 mL spinners are seeded with 3 x 10<sup>6</sup> cells/mL. The cell media is exchanged with fresh media by centrifugation and resuspension in production medium. Although any suitable CHO media may be employed, a production medium described in U.S. Patent No. 5,122,469, issued June 16, 1992 may actually be used. A 3L production spinner is seeded at 1.2 x 10<sup>6</sup> cells/mL. On day 0, the cell number pH is determined. On day 1, the spinner is sampled and sparging with filtered

WO 02/101069

PCT/US02/10513

air is commenced. On day 2, the spinner is sampled, the temperature shifted to 33°C, and 30 mL of 500 g/L glucose and 0.6 mL of 10% antifoam (e.g., 35% polydimethylsiloxane emulsion, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion) taken. Throughout the production, the pH is adjusted as necessary to keep it at around 7.2. After 10 days, or until the viability dropped below 70%, the cell culture is harvested by centrifugation and filtering through a 0.22 µm filter.

5 The filtrate was either stored at 4°C or immediately loaded onto columns for purification.

For the poly-His tagged constructs, the proteins are purified using a Ni-NTA column (Qiagen). Before purification, imidazole is added to the conditioned media to a concentration of 5 mM. The conditioned media is pumped onto a 6 ml Ni-NTA column equilibrated in 20 mM Hepes, pH 7.4, buffer containing 0.3 M NaCl and 5 mM imidazole at a flow rate of 4-5 ml/min. at 4°C. After loading, the column is washed with additional equilibration

10 buffer and the protein eluted with equilibration buffer containing 0.25 M imidazole. The highly purified protein is subsequently desalted into a storage buffer containing 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl and 4% mannitol, pH 6.8, with a 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) column and stored at -80°C.

Immunoadhesin (Fc-containing) constructs are purified from the conditioned media as follows. The conditioned medium is pumped onto a 5 ml Protein A column (Pharmacia) which had been equilibrated in 20 mM

15 Na phosphate buffer, pH 6.8. After loading, the column is washed extensively with equilibration buffer before elution with 100 mM citric acid, pH 3.5. The eluted protein is immediately neutralized by collecting 1 ml fractions into tubes containing 275 µL of 1 M Tris buffer, pH 9. The highly purified protein is subsequently desalted into storage buffer as described above for the poly-His tagged proteins. The homogeneity is assessed by SDS polyacrylamide gels and by N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation.

20

#### EXAMPLE 5

##### Expression of NS4 in Yeast

The following method describes recombinant expression of NS4 in yeast.

25 First, yeast expression vectors are constructed for intracellular production or secretion of NS4 from the ADH2/GAPDH promoter. DNA encoding NS4 and the promoter is inserted into suitable restriction enzyme sites in the selected plasmid to direct intracellular expression of NS4. For secretion, DNA encoding NS4 can be cloned into the selected plasmid, together with DNA encoding the ADH2/GAPDH promoter, a native NS4 signal peptide or other mammalian signal peptide, or, for example, a yeast alpha-factor or invertase secretory signal/leader sequence, and

30 linker sequences (if needed) for expression of NS4.

Yeast cells, such as yeast strain AB110, can then be transformed with the expression plasmids described above and cultured in selected fermentation media. The transformed yeast supernatants can be analyzed by precipitation with 10% trichloroacetic acid and separation by SDS-PAGE, followed by staining of the gels with Coomassie Blue stain.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Recombinant NS4 can subsequently be isolated and purified by removing the yeast cells from the fermentation medium by centrifugation and then concentrating the medium using selected cartridge filters. The concentrate containing NS4 may further be purified using selected column chromatography resins.

5

## EXAMPLE 6

## Expression of NS4 in Baculovirus-Infected Insect Cells

The following method describes recombinant expression of NS4 in Baculovirus-infected insect cells.

The sequence coding for NS4 is fused upstream of an epitope tag contained within a baculovirus expression vector. Such epitope tags include poly-his tags and immunoglobulin tags (like Fc regions of IgG). A variety of plasmids may be employed, including plasmids derived from commercially available plasmids such as pVL1393 (Novagen). Briefly, the sequence encoding NS4 or the desired portion of the coding sequence of NS4 such as the sequence encoding the extracellular domain of a transmembrane protein or the sequence encoding the mature protein if the protein is extracellular is amplified by PCR with primers complementary to the 5' and 3' regions. The 5' primer may incorporate flanking (selected) restriction enzyme sites. The product is then digested with those selected restriction enzymes and subcloned into the expression vector.

Recombinant baculovirus is generated by co-transfecting the above plasmid and BaculoGold™ virus DNA (Pharmingen) into *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") cells (ATCC CRL 1711) using lipofectin (commercially available from GIBCO-BRL). After 4 - 5 days of incubation at 28°C, the released viruses are harvested and used for further amplifications. Viral infection and protein expression are performed as described by O'Reilley *et al.*, *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

Expressed poly-his tagged NS4 can then be purified, for example, by Ni<sup>2+</sup>-chelate affinity chromatography as follows. Extracts are prepared from recombinant virus-infected Sf9 cells as described by Rupert *et al.*, *Nature*, 362:175-179 (1993). Briefly, Sf9 cells are washed, resuspended in sonication buffer (25 mL Hepes, pH 7.9; 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1 mM EDTA; 10% glycerol; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl), and sonicated twice for 20 seconds on ice. The sonicates are cleared by centrifugation, and the supernatant is diluted 50-fold in loading buffer (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7.8) and filtered through a 0.45 μm filter. A Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose column (commercially available from Qiagen) is prepared with a bed volume of 5 mL, washed with 25 mL of water and equilibrated with 25 mL of loading buffer. The filtered cell extract is loaded onto the column at 0.5 mL per minute. The column is washed to baseline A<sub>280</sub> with loading buffer, at which point fraction collection is started. Next, the column is washed with a secondary wash buffer (50 mM phosphate; 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 6.0), which elutes nonspecifically bound protein. After reaching A<sub>280</sub> baseline again, the column is developed with a 0 to 500 mM Imidazole gradient in the secondary wash buffer. One mL fractions are collected and analyzed by SDS-PAGE and silver staining or Western blot with Ni<sup>2+</sup>-NTA-conjugated to alkaline phosphatase (Qiagen). Fractions containing the eluted His<sub>6</sub>-tagged NS4 are pooled and dialyzed against loading buffer.

Alternatively, purification of the IgG tagged (or Fc tagged) NS4 can be performed using known chromatography techniques, including for instance, Protein A or protein G column chromatography.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

## EXAMPLE 7

Preparation of Antibodies that Bind NS4

5 This example illustrates preparation of monoclonal antibodies which can specifically bind NS4. Techniques for producing the monoclonal antibodies are known in the art and are described, for instance, in Goding, *supra*. Immunogens that may be employed include purified NS4, fusion proteins containing NS4, and cells expressing recombinant NS4 on the cell surface. Selection of the immunogen can be made by the skilled artisan without undue experimentation.

10 Mice, such as Balb/c, are immunized with the NS4 immunogen emulsified in complete Freund's adjuvant and injected subcutaneously or intraperitoneally in an amount from 1-100 micrograms. Alternatively, the immunogen is emulsified in MPL-TDM adjuvant (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) and injected into the animal's hind foot pads. The immunized mice are then boosted 10 to 12 days later with additional immunogen emulsified in the selected adjuvant. Thereafter, for several weeks, the mice may also be boosted with additional immunization injections. Serum samples may be periodically obtained from the mice by retro-orbital bleeding for testing in ELISA assays to detect anti-NS4 antibodies.

15 After a suitable antibody titer has been detected, the animals "positive" for antibodies can be injected with a final intravenous injection of NS4. Three to four days later, the mice are sacrificed and the spleen cells are harvested. The spleen cells are then fused (using 35% polyethylene glycol) to a selected murine myeloma cell line such as P3X63AgU.1, available from ATCC, No. CRL 1597. The fusions generate hybridoma cells which can then be plated in 96 well tissue culture plates containing HAT (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine) medium to inhibit proliferation of non-fused cells, myeloma hybrids, and spleen cell hybrids.

20 The hybridoma cells will be screened in an ELISA for reactivity against NS4. Determination of "positive" hybridoma cells secreting the desired monoclonal antibodies against NS4 is within the skill in the art.

25 The positive hybridoma cells can be injected intraperitoneally into syngeneic Balb/c mice to produce ascites containing the anti-NS4 monoclonal antibodies. Alternatively, the hybridoma cells can be grown in tissue culture flasks or roller bottles. Purification of the monoclonal antibodies produced in the ascites can be accomplished using ammonium sulfate precipitation, followed by gel exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of antibody to protein A or protein G can be employed.

## EXAMPLE 8

Purification of NS4 Polypeptides Using Specific Antibodies

30 Native or recombinant NS4 polypeptides may be purified by a variety of standard techniques in the art of protein purification. For example, pro-NS4 polypeptide, mature NS4 polypeptide, or pre-NS4 polypeptide is purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for the NS4 polypeptide of interest. In general, an immunoaffinity column is constructed by covalently coupling the anti-NS4 polypeptide antibody to an activated chromatographic resin.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Polyclonal immunoglobulins are prepared from immune sera either by precipitation with ammonium sulfate or by purification on immobilized Protein A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Likewise, monoclonal antibodies are prepared from mouse ascites fluid by ammonium sulfate precipitation or chromatography on immobilized Protein A. Partially purified immunoglobulin is covalently attached to a chromatographic resin such as CnBr-activated SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology). The antibody is coupled to the resin, the resin is blocked, and the derivative resin is washed according to the manufacturer's instructions.

Such an immunoaffinity column is utilized in the purification of NS4 polypeptide by preparing a fraction from cells containing NS4 polypeptide in a soluble form. This preparation is derived by solubilization of the whole cell or of a subcellular fraction obtained via differential centrifugation by the addition of detergent or by other methods well known in the art. Alternatively, soluble NS4 polypeptide containing a signal sequence may be secreted in useful quantity into the medium in which the cells are grown.

A soluble NS4 polypeptide-containing preparation is passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of NS4 polypeptide (e.g., high ionic strength buffers in the presence of detergent). Then, the column is eluted under conditions that disrupt antibody/NS4 polypeptide binding (e.g., a low pH buffer such as approximately pH 2-3, or a high concentration of a chaotrope such as urea or thiocyanate ion), and NS4 polypeptide is collected.

#### EXAMPLE 9

##### Drug Screening

This invention is particularly useful for screening compounds by using NS4 polypeptides or binding fragment thereof in any of a variety of drug screening techniques. The NS4 polypeptide or fragment employed in such a test may either be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. One method of drug screening utilizes eukaryotic or prokaryotic host cells which are stably transformed with recombinant nucleic acids expressing the NS4 polypeptide or fragment. Drugs are screened against such transformed cells in competitive binding assays. Such cells, either in viable or fixed form, can be used for standard binding assays. One may measure, for example, the formation of complexes between NS4 polypeptide or a fragment and the agent being tested. Alternatively, one can examine the diminution in complex formation between the NS4 polypeptide and its target cell or target receptors caused by the agent being tested.

Thus, the present invention provides methods of screening for drugs or any other agents which can affect a NS4 polypeptide-associated disease or disorder. These methods comprise contacting such an agent with an NS4 polypeptide or fragment thereof and assaying (i) for the presence of a complex between the agent and the NS4 polypeptide or fragment, or (ii) for the presence of a complex between the NS4 polypeptide or fragment and the cell, by methods well known in the art. In such competitive binding assays, the NS4 polypeptide or fragment is typically labeled. After suitable incubation, free NS4 polypeptide or fragment is separated from that present in bound form,

WO 02/101069

PCT/US02/10513

and the amount of free or uncomplexed label is a measure of the ability of the particular agent to bind to NS4 polypeptide or to interfere with the NS4 polypeptide/cell complex.

Another technique for drug screening provides high throughput screening for compounds having suitable binding affinity to a polypeptide and is described in detail in WO 84/03564, published on September 13, 1984.

5 Briefly stated, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. As applied to an NS4 polypeptide, the peptide test compounds are reacted with NS4 polypeptide and washed. Bound NS4 polypeptide is detected by methods well known in the art. Purified NS4 polypeptide can also be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. In addition, non-neutralizing antibodies can be used to capture the peptide and immobilize it on the solid support.

10 This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralizing antibodies capable of binding NS4 polypeptide specifically compete with a test compound for binding to NS4 polypeptide or fragments thereof. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with NS4 polypeptide.

15

## EXAMPLE 10

Rational Drug Design

The goal of rational drug design is to produce structural analogs of biologically active polypeptide of interest (i.e., an NS4 polypeptide) or of small molecules with which they interact, e.g., agonists, antagonists, or inhibitors.

20 Any of these examples can be used to fashion drugs which are more active or stable forms of the NS4 polypeptide or which enhance or interfere with the function of the NS4 polypeptide *in vivo* (c.f., Hodgson, *BioTechnology*, 9: 19-21 (1991)).

In one approach, the three-dimensional structure of the NS4 polypeptide, or of an NS4 polypeptide-inhibitor complex, is determined by x-ray crystallography, by computer modeling or, most typically, by a combination of the two approaches. Both the shape and charges of the NS4 polypeptide must be ascertained to elucidate the structure and to determine active site(s) of the molecule. Less often, useful information regarding the structure of the NS4 polypeptide may be gained by modeling based on the structure of homologous proteins. In both cases, relevant structural information is used to design analogous NS4 polypeptide-like molecules or to identify efficient inhibitors. Useful examples of rational drug design may include molecules which have improved activity or stability as shown by Braxton and Wells, *Biochemistry*, 31:7796-7801 (1992) or which act as inhibitors, agonists, or antagonists of native peptides as shown by Athauda *et al.*, *J. Biochem.*, 113:742-746 (1993).

35 It is also possible to isolate a target-specific antibody, selected by functional assay, as described above, and then to solve its crystal structure. This approach, in principle, yields a pharmacore upon which subsequent drug design can be based. It is possible to bypass protein crystallography altogether by generating anti-idiotypic antibodies (anti-ids) to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, the binding site of the anti-ids would be expected to be an analog of the original receptor. The anti-id could then be used to identify

WO 02/101069

PCT/US02/10513

and isolate peptides from banks of chemically or biologically produced peptides. The isolated peptides would then act as the pharmacore.

By virtue of the present invention, sufficient amounts of the NS4 polypeptide may be made available to perform such analytical studies as X-ray crystallography. In addition, knowledge of the NS4 polypeptide amino acid sequence provided herein will provide guidance to those employing computer modeling techniques in place of or in addition to x-ray crystallography.

#### EXAMPLE 11

##### Investigation of Weight, Leptin Levels, Food Intake, Urine Production, Oxygen Consumption, and Triglyceride and Free Fatty Acid Levels in NS4 Transgenic Mice

A DNA fragment containing an open reading frame encoding NS4 is amplified using PCR and cut with restriction enzymes XhoI and EcoRV. The DNA is then gel-purified and ligated into an expression vector previously digested with the same enzymes.

Next, the cDNA encoding human NS4 is cloned into a plasmid that contains the promoter for myosin light chain (MLC). This promoter is sufficient for muscle specific transcription of the transgene. A splice acceptor and donor can also be included 5' to the NS4 cDNA in order to increase the level of expression. Moreover, a splice donor and acceptor with a poly A addition signal can also be included 3' to the NS4 cDNA in order to increase the level of transcription and to provide a transcription termination site.

The DNA encompassing the MLC promoter, the 5' splice acceptor and donor, the NS4 cDNA and the 3' splice acceptor and donor and the transcription termination site (the transgene) is released from the bacterial vector sequences using appropriate restriction enzymes and purified following size fractionation on agarose gels. The purified DNA is injected into one pronucleus of fertilized mouse eggs and transgenic mice generated and identified as described (Tim Stewart, "Genetic Modification of Animals"; *Exploring Genetic Mechanisms*, pp 565-598 (1997) Eds M Singer and P Berg; University Science Books; Sausalito, Calif). Unless otherwise noted mice are maintained on standard lab chow in a temperature and humidity controlled environment. Standard mouse chow is Purina 5010 (Harlan Teklab, Madison WI). The high fat (58% kJ fat) and low fat (10.5% kJ fat) isocaloric diets discussed below are based on the diets described by Surwit and colleagues (Surwit, R.S. et al., *Metabolism: Clinical & Experimental* 44, 645-651 (1995)) and can be purchased from Research Diets (New Brunswick NJ). A 12 hour (6.00PM/6.00AM) light cycle is used. After the NS4 transgenic mice are 8 months old, they are age-matched with non-transgenics and analyzed using the pDEXA Sabre X-ray bone densitometer (Norland Medical Systems, Inc.). The mice are anesthetized for 6-8 minutes. A reduction in either total body mass or fat content (as a % of body weight) of NS4 transgenic mice compared to non-transgenic controls is indicative of utility for body weight disorders.

Additionally, the effect of increased food intake and metabolic rate (as evidenced by their rate of oxygen consumption) can also be measured. Decreased body weight in combination with increased food intake could be indicative of a general decrease in adiposity levels. Moreover, increased food intake in combination with increased urine output, without an increase in water intake could be indicative of an increased metabolism

WO 02/101069

PCT/US02/10513

Obesity and elevated triglycerides and free fatty acids are risk factors for cardiovascular disease. NS4 can be investigated for whether it might reduce either triglycerides or free fatty acid levels.

\*\*\*\*\*

5 The following materials have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

<u>Material</u>	<u>ATCC Dep. No.</u>	<u>Deposit Date</u>
DNA146649-1789R1	PTA-3376	May 15, 2001
DNA149986-2883	PTA-1627	April 4, 2000
DNA149995-2871	PTA-1971	May 31, 2000

10 This deposit was made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposit will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Genentech, Inc. and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit

15 to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 USC §122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 CFR §1.14 with particular reference to 886 OG 638).

20 The assignee of the present application has agreed that if a culture of the materials on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, the materials will be promptly replaced on notification with another of the same. Availability of the deposited material is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

25 The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the construct deposited, since the deposited embodiment is intended as a single illustration of certain aspects of the invention and any constructs that are functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material herein does not constitute an admission that the written description herein contained is inadequate to enable the practice of any aspect of the invention, including the best mode thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific

30 illustrations that it represents. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated nucleic acid molecule which comprises DNA having at least about 80% sequence identity to: (a) a DNA molecule encoding a NS4 polypeptide comprising the sequence of amino acid residues from about (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4), (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6); or (b) the complement of the DNA molecule of (a).
2. The isolated nucleic acid molecule of Claim 1 comprising the sequence of nucleotide positions from about: (i) 486 or about 543 to about 746, inclusive, of Figure 1A (SEQ ID NO:1); (ii) 1784 or about 1841 to about 2068, inclusive, of Figure 1B (SEQ ID NO:2) or (iii) 447 or about 504 to about 731, inclusive, of Figure 1C (SEQ ID NO:3).
3. The isolated nucleic acid molecule of Claim 1 comprising a nucleotide sequence that encodes the sequence of amino acid residues from about (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6).
4. An isolated nucleic acid molecule comprising DNA which comprises at least about 80% sequence identity to (a) a DNA molecule encoding the same mature polypeptide encoded by the human cDNA deposited with the ATCC on (i) May 15, 2001 under ATCC Deposit No. PTA-3376 (DNA146649-1789R1), (ii) April 4, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1627 or (iii) May 31, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1971 (DNA149995-2871), or (b) the complement of the DNA molecule of (a).
5. The isolated nucleic acid molecule of Claim 4 comprising DNA encoding the same mature polypeptide encoded by the human cDNA deposited with the ATCC on (i) May 15, 2001 under ATCC Deposit No. PTA-3376 (DNA146649-1789R1), (ii) April 4, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1627 or (iii) May 31, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1971 (DNA149995-2871), or (b) the complement of the DNA molecule of (a).
6. An isolated nucleic acid molecule comprising DNA having at least about 80% nucleic acid sequence identity to the full-length polypeptide coding sequence of the human cDNA deposited with the ATCC on: (a) (i) May 15, 2001 under ATCC Deposit No. PTA-3376 (DNA146649-1789R1), (ii) April 4, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1627 or (iii) May 31, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1971 (DNA149995-2871); or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

WO 02/101069

PCT/US02/10513

7. The isolated nucleic acid molecule of Claim 6 comprising the full-length polypeptide coding sequence of the human protein eDNA deposited with the ATCC on: (a) (i) May 15, 2001 under ATCC Deposit No. PTA-3376 (DNA146649-1789R1), (ii) April 4, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1627 or (iii) May 31, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1971 (DNA149995-2871); or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

8. An isolated nucleic acid molecule encoding a NS4 polypeptide comprising DNA that hybridizes to the complement of the nucleic acid sequence that encodes amino acids (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6).

9. The isolated nucleic acid molecule of Claim 8, wherein the nucleic acid that encodes amino acids acids: (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6) comprising nucleotides (i) 486 or about 543 to about 746, inclusive, of Figure 1A (SEQ ID NO:1), (ii) 1784 or about 1841 to about 2068, inclusive, of Figure 1B (SEQ ID NO:2) or (iii) 447 or about 504 to about 731, inclusive, of Figure 1C (SEQ ID NO:3), respectively.

10. The isolated nucleic acid molecule of Claim 9, wherein the hybridization occurs under stringent hybridization and wash conditions.

11. An isolated nucleic acid molecule comprising at least 31 nucleotides and which is produced by hybridizing a test DNA molecule under stringent hybridization conditions with (a) a DNA molecule which encodes a NS4 polypeptide comprising a sequence of amino acid residues from about (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6), or (b) the complement of the DNA molecule of (a), and isolating the test DNA molecule.

12. The isolated nucleic acid molecule of Claim 12, which has at least about 80% sequence identity to (a) or (b).

13. A vector comprising the nucleic acid molecule of Claim 1.

14. The vector of Claim 13, wherein said nucleic acid molecule is operably linked to control sequences recognized by a host cell transformed with the vector.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

15. A nucleic acid molecule deposited with the ATCC under accession number (i) PTA-3376 (DNA146649-1789R1), (ii) PTA-1627 or (iii) PTA-1971 (DNA149995-2871).

16. A host cell comprising the vector of Claim 13.

17. The host cell of Claim 16, wherein said cell is selected from the group consisting of a CHO, *E. coli* and yeast.

18. A process for producing a NS4 polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 17 under conditions suitable for expression of said NS4 polypeptide and recovering said NS4 polypeptide from the cell culture.

19. An isolated NS4 polypeptide comprising an amino acid sequence comprising at least about 80% sequence identity to the sequence of amino acid residues from about (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6).

20. The isolated NS4 polypeptide of Claim 19 comprising amino acid residues (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6).

21. An isolated NS4 polypeptide having at least about 80% sequence identity to the polypeptide encoded by the cDNA insert of the vector deposited with the ATCC on (i) May 15, 2001 under ATCC Deposit No. PTA-3376 (DNA146649-1789R1), (ii) April 4, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1627 or (iii) May 31, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1971 (DNA149995-2871).

22. The isolated NS4 polypeptide of Claim 21 which is encoded by the cDNA insert of the vector deposited with the ATCC on (i) May 15, 2001 under ATCC Deposit No. PTA-3376 (DNA146649-1789R1), (ii) April 4, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1627 or (iii) May 31, 2000 under ATCC Deposit No. PTA-1971 (DNA149995-2871).

23. An isolated NS4 polypeptide comprising the sequence of amino acid residues from (i) 1 or about 20 to about 87 of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive of Figure 2C (SEQ ID NO:6), or a fragment thereof

WO 02/101069

PCT/US02/10513

sufficient to provide a binding site for an anti-NS4 antibody.

24. An isolated polypeptide produced by (i) hybridizing a test DNA molecule under stringent conditions with (a) a DNA molecule encoding a NS4 polypeptide comprising the sequence of amino acid residues from (i) 1 or about 20 to about 87, inclusive, of Figure 2A (SEQ ID NO:4); (ii) 1 or about 20 to about 95, inclusive, of Figure 2B (SEQ ID NO:5) or (iii) 1 or about 20 or about 95, inclusive, of Figure 2C (SEQ ID NO:6), or (b) the complement of the DNA molecule of (a), (ii) culturing a host cell comprising said test DNA molecule under conditions suitable for the expression of said polypeptide, and (iii) recovering said polypeptide from the cell culture.

25. The isolated polypeptide of Claim 24, wherein said test DNA has at least about 80% sequence identity to (a) or (b).

26. A chimeric molecule comprising an NS4 polypeptide fused to a heterologous amino acid sequence.

27. The chimeric molecule of Claim 26, wherein said heterologous amino acid sequence is either an epitope tag sequence or an Fc region of an immunoglobulin.

28. An antibody which specifically binds to an NS4 polypeptide.

29. The antibody of Claim 28, wherein said antibody selected from the group consisting of: a monoclonal antibody, a humanized antibody or an antibody fragment.

30. A composition of matter comprising (a) an NS4 polypeptide, (b) an agonist to a NS4 polypeptide, (c) an antagonist to a NS4 polypeptide, or (d) an anti-NS4 antibody in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.

31. A method for screening for a bioactive agent capable of binding to NS4 comprising:

- a) adding a candidate bioactive agent to a sample of NS4; and
- b) determining the binding of said candidate agent to said NS4, wherein binding indicates a bioactive agent capable of binding to NS4.

32. A method for screening for a bioactive agent capable of modulating the activity of NS4, said method comprising the steps of:

WO 02/101069

PCT/US02/10513

- a) adding a candidate bioactive agent to a sample of NS4; and
  - b) determining an alteration in the biological activity of NS4, wherein an alteration indicates a bioactive agent capable of modulating the activity of NS4.
33. A method of identifying a receptor for NS4, said method comprising combining NS4 with a composition comprising cell membrane material wherein said NS4 complexes with a receptor on said cell membrane material, and identifying said receptor as a NS4 receptor.
34. The method of Claim 33 wherein NS4 binds to said receptor, and said method further includes a step of crosslinking said NS4 and receptor.
35. The method of Claim 33, wherein said composition is a cell.
36. The method of Claim 33, wherein said composition is a cell membrane extract preparation.
37. A method of treating an individual for a body weight disorder, said method comprising administering to said individual a composition comprising a therapeutically effective amount of NS4.
38. The method of Claim 37, wherein the body weight disorder is selected from the group consisting of obesity, anorexia and cachexia.
39. The method of Claim 38, wherein said treatment of obesity further results in the treatment of a condition related to obesity.
40. The method according to Claim 37, wherein said NS4 has at least about 80% amino acid sequence identity to the amino acid sequences shown in Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) or Figure 2C (SEQ ID NO:6).
41. A method of reducing total body mass in an individual, said method comprising administering to said individual a therapeutically effective amount of NS4.
42. The method of Claim 37, wherein said reduction in total body mass includes a reduction in body fat of said individual.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

43. The method according to Claim 37, wherein said NS4 has at least about 80% amino acid sequence identity to the amino acid sequence shown in Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) or Figure 2C (SEQ ID NO:6).

44. A method of reducing the level of at least one triglyceride or free fatty acid in an individual, said method comprising administering to said individual a therapeutically effective amount of NS4.

45. The method according to Claim 60, wherein said NS4 has at least about 80% amino acid sequence identity to the amino acid sequence shown in Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) or Figure 2C (SEQ ID NO:6).

46. A method of increasing the metabolic rate in an individual, said method comprising administering to said individual an effective amount of NS4.

47. The method according to Claim 65, wherein said NS4 has at least about 80% amino acid sequence identity to the amino acid sequence shown in Figure 2A (SEQ ID NO:4), Figure 2B (SEQ ID NO:5) or Figure 2C (SEQ ID NO:6).

48. A rodent comprising a genome comprising a transgene encoding NS4.

WO 02/101069

PCT/US02/10513

1 / 5

AAAAGAGGATAATTC AAGAAGGGCTCTTTAAGGACTATTTCCCAAGATGGGAATGGAGGGGAACCT  
 GCAGGGCTAGTGTCTACCTCCAGCAGGCAGCAGCTAATTCCTGAGGGGATAAGGACGTGGTTGCGA  
 GGACATGGAGGGAAAGTTCTACAGAGGAGGCACAGTGGGCTTCAGGAACACCCTGCTTGAGAGGCCTG  
 TGAGAGGTGGGGAATCAATACCTGACCTCGCTCTCCTCCATCTCTCCCACCCACAGGGGTGGTG  
 TGGGCCCAACAGCGAGCCTCCCGGGGAGAGAGTGGAGAGGAGACTGGAGGGCCAGTAGAAGGTAT  
 GCACACAAGTATCTACAAGGCACCAGGCATTTTTTGAGCATTGGGATTTGTGAGCAACAAGTATGAG  
 CAAAAAACCTTGCTCTGGTGGAGGGAACATTCTAGCAAGGAAGGCAAATGCAAGCAGGAGAAGTAT  
 TTGCTAAGAATGGCAATCCTGACGCTCAGCCTTCAACTCATCTTTGTTAATAATCAATCAATATCCCA  
 TGAGGCTCATAAAACGAGTCTTCTTTGGAAACATGACCAAGATGGGCAACGCTCTCCAAACATGA  
 CTTTCAGCAACGGAAAACTAAGAGTCAAAGGCATTTATTACCGGAATGCCACATTTGCTCTCGACAT  
 CGCCTAACCTCAGCAGGCCTAACCTGACAGACCTTCAGCTATGGTGTAAATTTGAGAATCATCTACTG  
 AGCATCAACTATGTAACAGCATTTGGGTGGGTGCCAGAGATCCAAAGCTAAGACACCAAAACCTGCT  
 CTCCAGGAAACAGAGGCTGAGAAAGAGGGCCAGCAGGTGTCTGTCACTTGGAGCCGTGAGAGCAG  
 GGAGTGGGTGCTGGGCTGAGGAACAGAGTAAATGGCCCTGGGACCCCGGGAAGAGATGAGTTTTG  
 AGGCAAAAGGATTTGCATTTGTGGATGAACCTTTGTGTTCACTGAAGCTGAAGTTGTAACCTCTGAA  
 CCACAGGACAAAGCATGATGTGATGCTTCTCTCACTAAATGGCAATGCTCTTGAGAAGACCCCTGTCT  
 AATCATCTCTGTCTCAGCCTGGCTATAACATATGCTTATCGCATGCTTTTATAAAAAGGAGGAA  
 AATGC

**FIG. 1A**

AAAAAATACAGCAGGTGAAGGAGTTGGAGAGTAGGGGTGGAGGGCCACGCAGCACTTGTCTTCA  
 CCCTGGAGGGGATCTGTACATGCCCCAGATTGCTGGTCCCTAGAAATGTTACTGAGGCAGCCTCTG  
 CATTTTTGCAGGGATTGTTTTCTACTGTTTGACATTACGTAACCTCCTAACGCTGTCTGGGGAAGAT  
 GCTACCCCTGCTCTCCCGTCTTCTCTGCACTCTCAGCAATGGGATGGGCTGACTGATGCCCTGTGG  
 GCTGGAAAGCTGACCCAGTTGCTGACAGACCAGACCCCTCACATAGTGTGCTGGGCTGAGGAATC  
 CAGGAGAGCCCGAGGGGGGACACTGAAGGTGTATCGTTGGCCCTGCCAGCTGCAAGTGAACGCTTCT  
 GATGAATTTAATAGGGAGAAAGAAGTATTTGCTAAGAATGGCAATCCTGACGCTCAGCCTTCAACTC  
 ATCTTGTATTATAATCAATCAATATCCCATGAGGCTCATAAAGCAGTCTTCTTCTTGGAAACATGA  
 CCAAGATTGGGCAACGCTCACAACATGACTTTCAGCAACGGAAAACTAAGAGTCAAAGGCATTTATT  
 ACCGGAATGCCGACATTTGCTCTCGACATCGCGTAACCTCAGCAGGCCTAACTCTGACAGACCTTCAG  
 CTATGGTGTAAATTTGAGGTCAGTGGCCAGAGGACAGATCCCGTCTACATTAAGTGAAGCGGAGAGC  
 TACTGCAGGGTCTGAGCAGAGTCTTAATTTATTTTAGAAGAATCATCATGGCTCCTAGATTAGGA  
 ATAAAACGAAGGGGCCAGGGATGGAACAGATGAGTCCAGTTGGGTTACTGCAAAAGATCCAGGCCAGA  
 AATCCAGGCACAGTGGCCACACACCTGAGTCCAGATAATTCACCTACTGGTCTGCTCTGTGGCCTA  
 CTGGTCCGAGTCCAGCCCGACTGATTTCTGGCCCTGTAATGTCTAAAAAGCTCCCTGCTGATGTTT  
 TGCAAGTACTGTGTTACTTTGAAGGCAGTCTTAGGATAAACTAGTCTGTTTATCATTACAGAATCAT  
 TCCTGAGCATCAACTATGTAACCCAGCATTTGGGTTGGGTGCCAGAGATCCAAAGCTAAGACACCAAAA  
 CCTGCTCTCCAGGAAACGAGAGGCTGAGAA

**FIG. 1C**

GGTGGAGCCAAATAAGGGAATGAAAGCAGGCCACCGGAGCCTCGGAGAGGCAACCGTTGGGGTACTC  
TTCCACACTGTGGCAGCTTTGTCTTTTGCTCTTTGCAGTAAGTTTGTCTTGTCTTACTCTTTGGGT  
CTGCACATGCTTTATGAACCTGTAACACTGACCATGGAGGCTGCAGCTTCACTCCCAAGCCAGCAAG  
ACCAGGAGCCACTGGGAGGAGGAATGAACAACCTCTGGACACGCCACCCCTTAAGAGCTGTAACACTCA  
CCGCGACGGTCTGCAGCTTCACTCTGAAAGTCAGCGAGACCACAAACCACAGAGGAGAAAAATCC  
GGACACATCTGAACATCTGAGGGAACCTCCGCACACACCATCTTTAAGAACTGTAACACTCACCCAGG  
GGCCCGTGGCTTCACTCTGAAAGTCAGCAAGCAAGAACCCACCAATCTGAGACACACAGGACACA  
CACATGGGAGGGGGGCCAGAGGGAACCTAGCTGGCTTGGGGTGGGAATTTGAATCCCTGAGCCCA  
TCTTCTTCTTTCCACCACTTTGTCCGGTGACATTAGGACCAACCAACCAATGCCATTATATTTCTTAGT  
TTACAAGAAAAATGTTGAAGTTCTCATCCACAGAATCACTTAGCTTCTTGTCTTTTACAAGTGGTGA  
TTAGGAGTATTCATACAGATTTGTGTATCACTATAACAGTTACAGCATGGACTACTGGTGTCTCT  
CTTTACTAAGTAAATGGTGTCTTAGCACCTTTAAATCTAATCCATTTAGAGAGCCAGTTCCGGAAA  
CCTCAGAACCGATTGGAAAACTCCGTTCTTCTGAAGCCATTTTGGAAACCACATCTGTGCTAGGTT  
CTCCAGGAAAACAGAACCAATATGTTTTATTTACTATGGGGACTGGCTCATATGATTCTGGAGGCCA  
GAAGTCCCTCCCTCAAGATGTGCTGTGAGCAAGCTGCAGAACCCAGAAAGCTGGTGGTGTGAGAT  
CTGAAGCCCTGAGAACTGGGTGGGAGTGGGACAGACTAAGGGCCCTTTAGTCTCTGGGTGGTGGTGG  
TCCCAACAGGTGAGCCTTTCTGTGGAGAAGGGTGGAGAGGGGATCTGGAAGGCCAATAGAGATACTC  
AGCACTAAGAGACCTTTGGACTCAGACCCAGAACTTACACCATTCATTCACTCAGTCGGTGAATAATGTA  
TTGACCACTGTATCAACCAGGATGTGACACAAAAACAGATGGCACACTCAAAGAGGATAAATCAAG  
AAGGGCTTCTTAAGGACTATTTCCCAAGATGGGAATGGAGGGGAACCTGCAGGGCTAGTGTCTTAC  
CCTCCAGCAGGCAGCAGCTAATTTCTGAGGGGATAAGGACCTGGTGGTGGAGGACATGGAGGGAAAGTT  
CTACAGAGGAGGCACAGTGGCTTCCAGAACACCTGCTTGAGAGGCTGTGAGAGGGATTGTTTTCT  
ACTGTTGACATTCACGTAACTCTTAACGCTGTCTGGGGAAGATGCTACCCCTGCTCTCCCGCTCT  
TTCTGCACTCTCAGCAATGGGATGGGCTGACTGATGCCCTGTGGGCTGGAAAGCTGACCCACAGTTGC  
TGCAGACCAGACCCCTCACATAGTGTGCTGGGCTGAGGAATCCAGGAGAGCCCGAGGGGGACAC  
TGAAGGTGTATCGTTGGCCCTGCCAGCTGCAAGTGAACCTGCTTCTGATGAATTTAATAGGGAGAAAG  
AAGTATTTGCTAAGAAATGGCAATCTGATGCTCAGCCTTCAACTCATCTGTTATATAATACCAATCAAT  
ATCCATGAGGCTCATAAARCGAGTCTTTCTTCTTGGAAACATGACCAAGATTGGGCAACGTCCTCA  
ACATGACTTTCAGCAACCGAAAACTAAGAGTCARAGGCATTTATTACCGAATGCCGACATTTGCTCT  
CGACATCGCGTAACCTCAGCAGGCCCTAAGCTGACAGACCTTCACTATGGTGAATTTGAGGTCAGT  
GGCCAGAGGACAGATCCCGTCTACATTAAGTGAAGCGGAGAGCTACTGCAGGTTCTGAGCAGAGT  
CCTAATTTATATTTAGAAGAAATCATATGGCTCTTAGATTAGGAATAAAACGAAGGGGCCAGGGAT  
GGAAACGATGATCCAGTTGGGTTACTGCAAGATCCAGGCCAGAAATCCAGGCACAGTGGCACACAC  
CTGAGTCCAGATAATTCACCTACTGGTCTGCTCTGTGGCCACTGTTGGTCCGAGTCCAGCCCGACT  
GATTTCTGGGCTGTAATGCTAAAAACGCTCCCTGCTGATGTTTGCAGTACTGTTTACTTGA  
GGCAGTTCCTAGGATAAATAGTGCCTTTATC

FIG. 1B

WO 02/101069

PCT/US02/10513

3/5

MAILTSLQLILLIPISISHEAHTSLSSWKHDQDWANVSNMTFSNGKLRVKGIYYRNAD  
ICSRHRVTSAGLTLQDLQLWCNLRRIH

Domain Information

Signal peptide:  
1-19

N-glycosylation site.  
38-42  
41-45

**FIG.\_2A**

MAILMLSLQLILLIPISISHEAHTSLSSWKHDQDWANVSNMTFSNGKLRVKGIYYRNAD  
ICSRHRVTSAGLTLQDLQLWCNLRVARGQIPST

Domain Information

Signal peptide:  
1-19

N-glycosylation site.  
38-42  
41-45

N-myristoylation site.  
89-95

**FIG.\_2B**

MAILTSLQLILLIPISISHEAHTSLSSWKHDQDWANVSNMTFSNGKLRVKGIYYRNAD  
ICSRHRVTSAGLTLQDLQLWCNLRVARGQIPSTL

Domain Information

Signal peptide:  
1-19

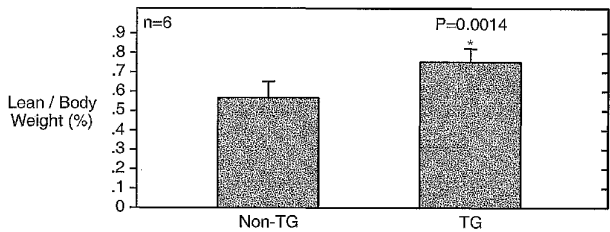
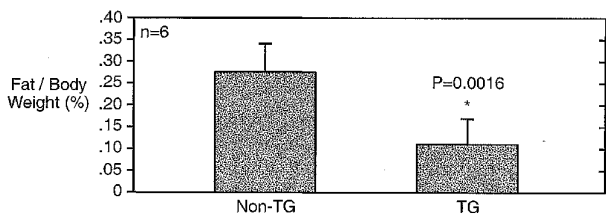
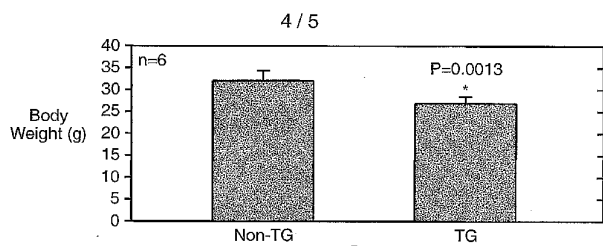
N-glycosylation sites  
38-42  
41-45

N-myristoylation sites  
89-95

**FIG.\_2C**

WO 02/101069

PCT/US02/10513



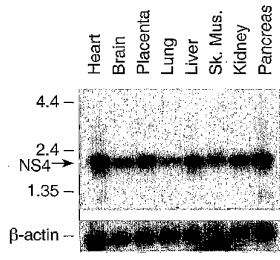
DNA146649	1	MAILTSLQLILLIIPISISHEAHKTSLSWKHDQDWANVSNMTFSGKLR
DNA149986	1	MAILMLSLQLILLIIPISISHEAHKTSLSWKHDQDWANVSNMTFSGKLR
DNA149995	1	MAILTSLQLILLIIPISISHEAHKTSLSWKHDQDWANVSNMTFSGKLR
DNA146649	51	VKGIYYRNADICSRHRVTSAGLTLQDLQWLCNLRRIH-----
DNA149986	51	VKGIYYRNADICSRHRVTSAGLTLQDLQWLCNLRVARGQIPSTL
DNA149995	51	VKGIYYRNADICSRHRVTSAGLTLQDLQWLCNLRVARGQIPSTL

**FIG. 4**

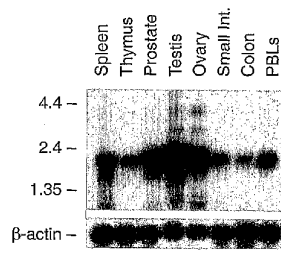
WO 02/101069

PCT/US02/10513

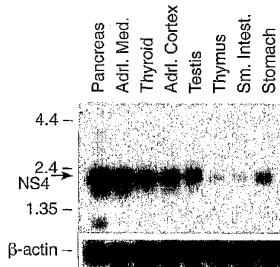
5 / 5



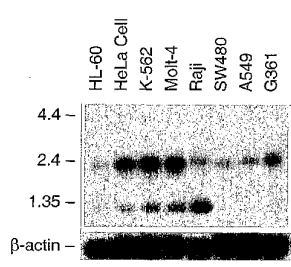
**FIG.\_5A**



**FIG.\_5B**



**FIG.\_5C**



**FIG.\_5D**

## 【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  
19 December 2002 (19.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/101069 A3

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/53**,  
C12N 15/00, 5/00, C07K 14/00, 16/46, A61K 38/00, 39/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/10513
- (22) International Filing Date: 3 April 2002 (03.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
09/880,457 12 June 2001 (12.06.2001) US
- (71) Applicant: GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way,  
South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
- (81) Designated States (*national*): AI, 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, GI,  
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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent  
(BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors: **GODDARD, Audrey**, 110 Congo Street, San  
Francisco, CA 94131 (US); **PAN, James**, 17 Tewsley  
Place, Fishlake, Ontario M9P 1N7 (CA); **WOOD,**  
**William, L.**, 35 Southdown Court, Hillsborough, CA  
94010 (US).

Published:  
with international search report

(88) Date of publication of the international search report:  
4 September 2003

(74) Agents: **SVOBODA, Craig, G.**, et al.: c/o Genentech, Inc.,  
MS49, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990  
(US).

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

WO 02/101069 A3

(54) Title: NS4 NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES AND METHODS OF USE FOR THE TREATMENT OF BODY WEIGHT DISORDERS

(57) Abstract: The present invention is directed to novel polypeptides NS4 and to nucleic acid molecules encoding those polypeptides. Also provided herein are vectors and host cells comprising those nucleic acid sequences, chimeric polypeptide molecules comprising the polypeptides of the present invention fused to heterologous polypeptide sequences, antibodies which bind to the polypeptides of the present invention and to methods for producing the polypeptides of the present invention. Furthermore, methods of treating body weight disorders (e.g., obesity, cachexia or anorexia) are provided.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/10513
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : G01N 33/53; C12N 15/00, 5/00; C07K 14/00, 16/46; A61K 38/00, 39/00 US CL : 435/6; 424/134.1, 185.1, 536/23.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6; 424/134.1, 185.1, 536/23.1; 435/7.1, 69-1, 323, 320.1; 530/350, 387.1; 514/2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Please See Continuation Sheet Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt, GenEmbl, Geneseq and EST		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	Database GenEmbl, Accession No. AC010969, SULSTON et al, 'Toward a complete human genome sequence', see Homo sapiens DNA(sequence query, appendix A), 07 November 2001.	1, 3
X,P	US 6,017,729 A (ANDERSON et al.) 25 January 2000 (25.01.2000), column 9, lines 10-26; column 11, line 26-column 12, line 67; column 13, line 20-column 14, line 40; column 14, line 42-column 15, line 45; column 17, line 16-46, column 18, line 12-67; column 15, line 47-column 16, line 34; column 20, line 49-column 22, line 30; column 19, lines 15-50 and column 21, lines 1-46.	1, 3 8-11, 13, 14, 16-17, 23, 26, 40, 43
X	US 6,344,441 B1 (BHAIN et al.) 05 February 2002 (05.02.2002), column 10, lines 23-30; column 2, line 65-column 3, line 19 and column 28, line 21-column 29, line 25.	37-39, 41, 42, 44, 46, 48
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle 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 considered 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 04 June 2003 (04.06.2003)		Date of mailing of the international search report 19 JUN 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Regina M. DeBerry Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US02/10513
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>	
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input type="checkbox"/> Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claim Nos.: 18, 24, and 25 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: Please See Continuation Sheet
3.	<input checked="" type="checkbox"/> Claim Nos.: 12, 45 and 47 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> 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.	<input type="checkbox"/> 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.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/10513

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable 1. because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:**  
Claims 12, 45 and 47 either refer back to themselves or do not refer back to a preceding claim. Claim 18, 24 and 25 depend from claims drawn to a complement of the DNA molecule. A polypeptide cannot be produced from the complement of an isolated nucleic acid molecule.

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 2:**  
WEST. key words methods of treating, methods of administering, reducing mass, reducing fat, reducing triglyceride, increasing metabolic rate.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 7/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/00	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 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	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	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	C 1 2 N 5/00	B
G 0 1 N 33/50	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 パン, ジェームス

カナダ国 オンタリオ M 9 P 1 N 7, エトピコーク, テウスレイ プレイス 1 7

(72)発明者 ウッド, ウィリアム アイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, ヒルスバラ, サウスダウン コート 3 5

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36  
 DA37 FB02 FB03  
 4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA01 CA07 DA02 DA05 DA12 GA11  
 HA11 HA17  
 4B063 QA05 QA18 QQ79 QQ91 QR77 QR84 QS15 QX01  
 4B064 AG01 CA02 CA06 CA10 CC24 DA01  
 4B065 AA01X AA72X AA91X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA25  
 CA44 CA46  
 4C084 AA02 BA01 BA02 BA08 BA19 BA20 BA22 NA14 ZA69 ZA70  
 ZC21 ZC33 ZC54  
 4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	NS4核酸和多肽以及用于治疗体重减轻的用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005500030A</a>	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2003503819	申请日	2002-04-03
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ゴッダードオードリー パンジェームス ウッドウィリアムアイ		
发明人	ゴッダード,オードリー パン,ジェームス ウッド,ウィリアム アイ.		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K39/395 A61P1/14 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P7/00 C07H21/04 C07K14/00 C07K14/435 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00 C12N5/06 C12N5/10 C12N9/00 C12N15/00 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/63 C12P21/02 C12P21/08 C12Q C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A61P1/14 A61P3/00 A61P3/04 C07K14/47 G01N33/6893 G01N2800/02		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61P1/14 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P7/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N5/00.B A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR77 4B063/QR84 4B063/QS15 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA72X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA22 4C084/NA14 4C084/ZA69 4C084/ZA70 4C084/ZC21 4C084/ZC33 4C084/ZC54 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	09/880457 2001-06-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及新型多肽NS4和编码这些多肽的核酸分子。 本文还提供了包含那些核酸序列的载体和宿主细胞，包含与异源多肽序列融合的本发明多肽的嵌合多肽分子，与本发明多肽结合的抗体以及产生本发明多肽的方法 发明。 此外，提供了治疗体重异常（例如，肥胖，恶病质或厌食症）的方法。

