



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК  
*C07K 14/47* (2006.01)  
*C12N 15/12* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*A61K 38/22* (2006.01)  
*C07K 16/00* (2006.01)  
*A01K 67/027* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2008102731/10, 23.06.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
23.06.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
24.06.2005 JP 2005-184441  
09.03.2006 JP 2006-064678

(43) Дата публикации заявки: 27.07.2009 Бюл. № 21

(45) Опубликовано: 10.05.2011 Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SATOH T. et al. "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible 153 gene in non-small cell lung carcinoma cells", *Oncogene*. 2002 Mar 28;21(14):2171-80. BARNIKOL-WATANABE S. et al. "Human protein NEFA, a novel DNA binding/EF-hand/leucine zipper protein. Molecular cloning and (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 24.01.2008

(86) Заявка РСТ:  
JP 2006/313041 (23.06.2006)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2006/137597 (28.12.2006)

Адрес для переписки:  
103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО  
"Союзпатент", пат. пов. А.Ю.Соболеву

(72) Автор(ы):

МОРИ Масатомо (JP),  
СИМИЗУ Хироюки (JP),  
ЕГУТИ Хирочи (JP),  
ЯМАМОТО Масанори (JP)

(73) Патентообладатель(и):

ТЕЙДЗИН ФАРМА ЛИМИТЕД (JP),  
НЭШНЛ ЮНИВЕРСИТИ КОРПОРЕЙШН  
ГУНМА ЮНИВЕРСИТИ (JP)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФАКТОРА, СВЯЗАННОГО С КОНТРОЛЕМ НАД ПОТРЕБЛЕНИЕМ ПИЩИ И/ИЛИ МАССОЙ ТЕЛА, ПОЛИПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ АКТИВНОСТЬЮ ПОДАВЛЕНИЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ ПИЩИ И/ИЛИ ПРИБАВЛЕНИЯ В ВЕСЕ, МОЛЕКУЛА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩАЯ ПОЛИПЕПТИД, СПОСОБЫ И ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИПЕПТИДА

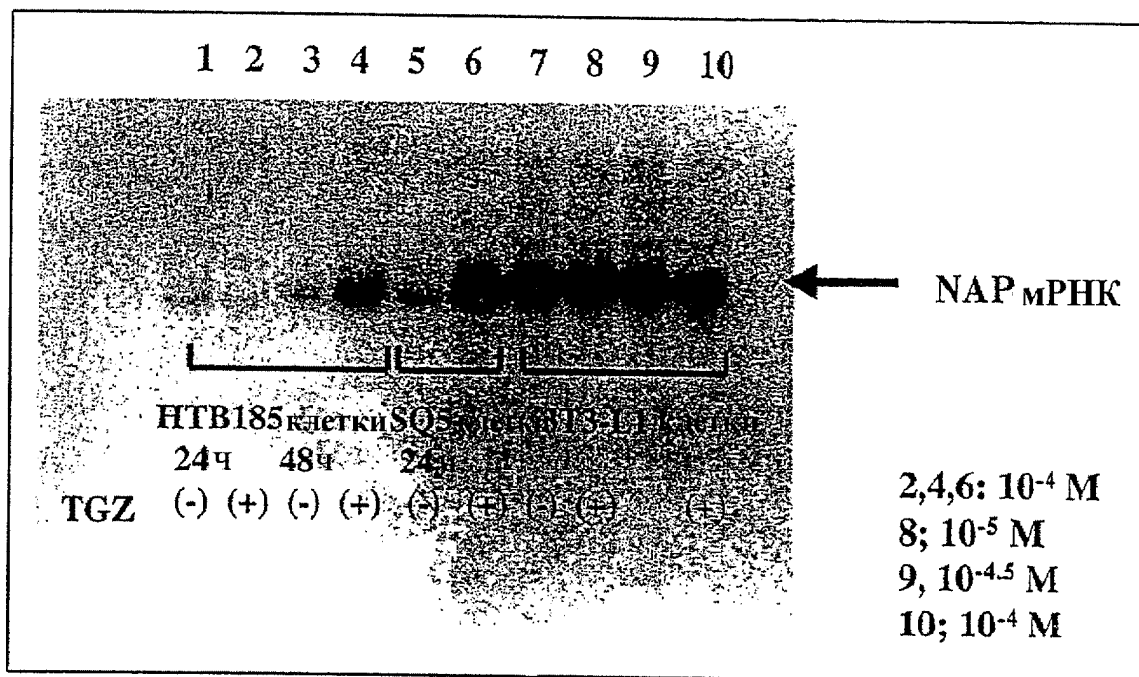
(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии. Разработан способ получения фактора, который участвует в процессе

контроля над аппетитом и/или массой тела. Также описаны гены, полученные указанным способом, полипептиды, кодируемые указанными генами, предназначенные для

лечения, контролирования или диагностики заболеваний, связанных с расстройствами пищевого поведения и/или контролированием массы тела. Также изобретение относится к веществам, которые ингибируют действия указанных генов или указанных полипептидов, предназначенных для лечения, контролирования или диагностики заболеваний, связанных с

процессом контролирования аппетита и/или массы тела. При использовании тиазолидиндионов, обладающих PPAR $\gamma$ -агонистической активностью, могут быть получены гены и полипептиды, вовлеченные в регуляцию аппетита и/или снижения массы тела. 18 н. и 9 з.п. ф-лы, 41 ил.



Фиг. 1

(56) (продолжение):

sequence analysis of the cDNA, isolation and characterization of the protein", Biol Chem Hoppe Seyler. 1994Aug;375(8):497-512. LOWELL B.B. et al. "PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function", Cell. 1999 Oct 29; 99 (3): 239-42.

RU 2418002 C2

RU 2418002 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.  
*C07K 14/47* (2006.01)  
*C12N 15/12* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*A61K 38/22* (2006.01)  
*C07K 16/00* (2006.01)  
*A01K 67/027* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2008102731/10, 23.06.2006

(24) Effective date for property rights:  
23.06.2006

Priority:

(30) Priority:  
24.06.2005 JP 2005-184441  
09.03.2006 JP 2006-064678

(43) Application published: 27.07.2009 Bull. 21

(45) Date of publication: 10.05.2011 Bull. 13

(85) Commencement of national phase: 24.01.2008

(86) PCT application:  
JP 2006/313041 (23.06.2006)

(87) PCT publication:  
WO 2006/137597 (28.12.2006)

Mail address:  
103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO  
"Sojuzpatent", pat.pov. A.Ju.Sobolevu

(72) Inventor(s):

**MORI Masatomo (JP),  
SIMIZU Khirojuki (JP),  
EGUTI Khirosi (JP),  
JaMAMOTO Masanori (JP)**

(73) Proprietor(s):

**TEJDZIN FARMA LIMITED (JP),  
NEhShNL JuNIVERSITI KORPOREJShN  
GUNMA JuNIVERSITI (JP)**

(54) **METHOD OF OBTAINING FACTOR ASSOCIATED WITH CONTROL OF FOOD CONSUMPTION AND/OR BODY WEIGHT, POLYPEPTIDE, POSSESSING ACTIVITY OF FOOD CONSUMPTION SUPPRESSION AND/OR WEIGHT GAIN, POLIPEPTIDE-CODING NUCLEIC ACID MOLECULE, METHODS AND POLYPEPTIDE APPLICATION**

(57) Abstract:

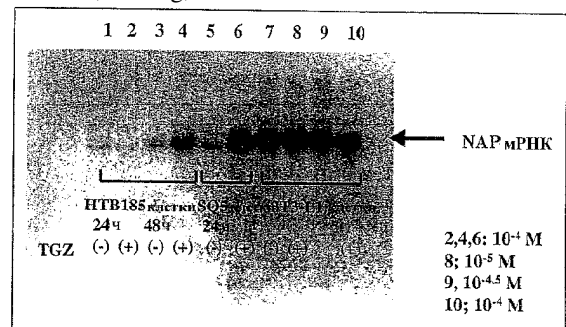
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: elaborated is method of obtaining factor, which takes part in process of control of appetite and/or body weight. Also described are genes, obtained by said method, polypeptides, coded by said genes, intended for treatment, control or diagnostics of diseases, associated with eating disorders and/or control of body weight. Invention also relates to substances, which inhibit activity of said genes or said polypeptides, intended for treatment, control or diagnostics of diseases, associated with process of appetite and/or body weight control.

EFFECT: using tiasolidindions, possessing

PPAR $\gamma$ -agonistic activity, it is possible to obtain genes and polypeptides, involved into regulation of appetite and/or body weight reduction.

27 cl, 41 dwg, 35 ex



Текст описания приведен в факсимильном виде.

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

5 Настоящее изобретение относится к новому способу получения фактора, который  
участвует в контроле над потреблением пищи и/или контроле над массой тела. Настоящее  
изобретение также относится к полипептиду, полученному указанным способом, при этом  
10 указанный полипептид участвует в контроле над потреблением пищи и/или контроле над  
массой тела, к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, а  
также к способам лечения, предохранения и диагностики заболеваний, связанных с  
уменьшением всасывания пищи и/или уменьшением прибавления в весе при  
использовании такого полипептида. Настоящее изобретение также относится к способам  
15 лечения, предохранения и диагностики заболеваний, связанных с повышенным аппетитом  
и/или повышенным прибавлением в весе при использовании субстанции, которая  
ингибирует действие указанного полипептида и указанного гена. Кроме того, настоящее  
изобретение относится к экспериментальным моделям заболеваний, связанных с  
20 нарушением контроля над потреблением пищи и/или контроля над массой тела,  
опосредованного указанным полипептидом, указанным геном и субстанцией, которая  
ингибирует их активности, и к способам скрининга соединений, которые контролируют  
действие или экспрессию указанного полипептида при использовании такой модели.  
25 Настоящее изобретение также относится к соединению, которое выбирается путем  
указанного скрининг-способа, и способам диагностики и терапевтическим агентам  
заболеваний при использовании указанного соединения.  
30

#### **Уровень техники**

35 Ожирение представляет собой состояние, при котором наблюдается избыточная  
масса тела, в особенности накопление белой жировой ткани, и, в общем,  
классифицируется по индексу массы тела (ВМТ), составляющему  $\geq 25 \text{ кг/м}^2$ , и по  
процентному содержанию жира в организме, составляющему 25% или более для мужчин  
40 и 30% или более для женщин. Из-за склонностей к потреблению продуктов с высоким  
содержанием жиров и отсутствием интереса к физической культуре в современном  
обществе растет процент людей, относящихся к тучным. По результатам национального  
исследования питания населения, проведенного Министерством здравоохранения, труда и  
45 социального обеспечения в 2000, количество людей, которым установлен диагноз  
50

ожирения, увеличилось за последние 10 и 20 лет и диагноз ожирения поставлен для около 30% мужчин в возрасте 40-69 лет и для около 30% женщин в возрасте 60-69.

5 В прошлом ожирение рассматривалось как эстетическая проблема, но на  
сегодняшний день, скорее, чем ожирение per se, расстройство здоровья, сопровождаемое  
(или потенциально сопровождаемое) ожирением, определяет основные клинические  
10 признаки, обеспечивающие медицинские показания для профилактики и лечения  
ожирения. При таких обстоятельствах, Японское Общество по Изучению Ожирения  
(JASSO) определило ожирение как "патологическое состояние, которое сопровождается  
или предполагается, что сопровождается, расстройствами здоровья, обусловленными или  
15 связанными с ожирением и которые требуют применения медицинских способов  
снижения массы тела", и вынесло на рассмотрение ожирение как нозологическую единицу.  
Расстройства здоровья, в используемом здесь значении, включают диабет 2 типа и  
нарушение толерантности к глюкозе, а также гипертензию, гиперлипидемию,  
20 гиперурикемию, жировую инфильтрацию печени, сердечно- и церебрососудистые  
заболевания, синдром апноэ во сне, ортопедические заболевания, такое как остеоартрит,  
нарушения менструального цикла и подобные (The Japanese Journal of Clinical Medicine  
(Nippon Rinsho), Supplement "Липоматоз", issued by Nippon Rinshosha Co., Ltd. on July 28,  
25 2003). В качестве заболеваний, обусловленных ожирением, указываются злокачественные  
опухоли, а именно, как сообщается, ожирение является фактором риска для развития рака  
молочной железы, рака матки, рака толстой кишки, рака почек, рака пищевода, рака  
30 поджелудочной железы, рака печени и рака мочевого пузыря (The Japanese Journal of  
Clinical Medicine (Nippon Rinsho), Supplement "Липоматоз", issued by Nippon Rinshosha Co.,  
Ltd. on July 28, 2003; Непатентный документ 1, Abu-Abid et al., Journal of Medicine (USA),  
January 1, 2002, Vol. 33, Nos. 1-4, pp. 73-86; и Nair et al., Hepatology (USA), July 1, 2002, Vol.  
35 36, No. 1, pp. 150-155). Кроме того, в последние годы предложен синдром множественных  
факторов риска, который повышает риск развития артериосклеротических заболеваний  
(инфаркт миокарда, церебральный инфаркт, др.), называемый "метаболическим  
40 синдромом", который привлекает внимание, поскольку церебрососудистые заболевания и  
сердечнососудистые заболевания составляют 30% от всех смертей в Японии. В связи с  
этим, Японское Общество по Изучению Ожирения, Японское Общество по изучению  
Атеросклероза, Японское Общество по изучению Гипертензии, Японское Общество по  
45 изучению Кровообращения, Японское Общество по изучению заболеваний почек,  
Японское Общество по изучению Тромбозов и Гемостаза, Японское Общество  
Внутренних Болезней совместно составили диагностические критерии и изложили их на  
50 пресс-конференции Сопределения Японского Общества Внутренних Болезней 8 апреля 2005.

В соответствии с критериями, с наличием висцерального жира (накопление жира во  
внутренних органах), установленным как основной критерий, мужчинам с окружностью  
талии 85 см и более и женщинам с окружностью талии 90 см и более, имеющим два или  
5 более показателей нарушения уровня липидов в сыворотке крови (один или два из  
показателей содержания триглицеридов, составляющих 150 мг/дл или более, и уровня  
HDL-холестерина, составляющего 40 мг/дл или более), высокое значение давления крови  
10 (одно или два из значений систолического давления 130 мм рт.ст. или более и  
диастолического давления 85 мм рт.ст.) и высокое содержание глюкозы в крови (уровень  
глюкозы на голодный желудок 110 мг/дл или более) ставится диагноз «метаболический  
15 синдром» (Journal of the Japanese Society of Internal Medicine, A research committee on the  
diagnostic criteria for metabolic syndrome, April, 2005 issue, Vol. 94, pp. 188-203). При  
использовании этих критериев, было установлено, что среди 290 взрослых мужчин, кто  
подвергался скринингу, 61 человеку (21%) был поставлен диагноз ожирение, тогда как 27  
20 (9%) были диагностированы как имеющие метаболический синдром, и 9 человек (3%) не  
были включены в группу с диагнозом ожирение, но были диагностированы как имеющие  
метаболический синдром (Igaku no Ayumi, Kazuo Takahashi and Yasushi Saito, 2005, Vol.  
25 213, No. 6, pp. 549-554).

Поскольку возможная причина ожирения заключается в практически постоянном  
избытке энергии (калорий), полученном при потреблении излишней энергии (калорий),  
для тучных людей или людей с ожирением рекомендуется проведение диетотерапии и/или  
30 лечебной физкультуры для снижения массы тела, особенно процентного содержания  
телесного жира. Однако, поскольку продолжительность таких терапий представляет  
значительный стресс, заключающийся в повышенном аппетите, адаптации к изменениям  
35 стиля жизни и выносливости к физической нагрузке, должны быть преодолены различные  
трудности для продолжения проведения лечения. Вероятно, что при сниженном  
потреблении калорий при диетотерапии может возникнуть так называемый «симптом  
40 отдачи», т.е., когда повышено кишечное всасывание питательных веществ, а метаболизм  
энергии снижен, и, следовательно, проведение диетотерапии может быть прекращено.  
Несмотря на то, что медицинское лечение ожирения включает применение основных  
анорексигенных средств, агентов, ускоряющих тепловой метаболизм, агентов,  
45 ингибирующих абсорбцию, агентов, ингибирующих липогенез, и др., только один агент  
может применяться в Японии в настоящее время в рамках системы медицинского  
страхования, которым является мазиндол и который относится к основному  
50 анорексигенному средству. Однако мазиндол является соединением, подобным  
стимулятору, и обладает побочными эффектами, заключающимися в возбуждении,

раздражении, нагрузке на сердечно-сосудистую систему, дизурии и др., и обладает ограниченным периодом применения - 3 месяца, и, следовательно, не рассматривается как лекарственное средство, которое может применяться без противопоказаний (Novartis Pharma КК, "Sanorex 0.5 mg tablet", листок-вкладыш в упаковке).

Чрезмерное снижение массы тела (так называемое "истощение") или потребления пищи (так называемая "анорексия"), относительно ожирения, является проблематичным, поскольку может вызывать развитие инфекционных процессов, обусловленных нарушением защитной реакции организма (иммунитета), гемопозитические нарушения, развитие аминоррии или нерегулярного менструального цикла, бесплодие, психические расстройства, параличи периферического нерва, пониженное кровяное давление, остеопороз и т.д. В целом, если ВМІ составляет  $<18,5 \text{ кг/м}^2$ , или если процентное содержание телесного жира составляет 10% или менее у мужчин и 15% или менее у женщин, то обследуемый классифицируется как истощенный. Согласно данным национального исследования питания населения, проведенного Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения, в 2000, процент женщин с ВМІ  $<18,5 \text{ кг/м}^2$  в 20-39-летней возрастной группе неуклонно увеличивается за последние 10 и 20 лет, и в 20-39-летней возрастной группе около 24% женщин классифицируются как "истощенные". Возможно, что это происходит вследствие преднамеренного снижения потребления пищи молодыми женщинами из-за их чрезмерного беспокойства по поводу лишнего веса. Однако, при нервно-психической анорексии (отвращение к пище), одного из основных нарушений потребления пищи, распространенного среди этой возрастной группы, по сути, чрезвычайно снижается аппетит и, в результате, усугубляются заболевания, связанные с питанием, что иногда приводит к смертельному исходу вследствие общего упадка сил. Также, к заболеваниям, обусловленным сниженным аппетитом, которые включают понятия, которые ранее имели название гастроптоз, гастроатония или нейрогенные гастриты, относится и заболевание, определенное как функциональная диспепсия, которое, согласно сообщениям, проявляется симптомами быстрого насыщения после еды и сниженного аппетита и др. (Talley et al., Gut 1999, 45, Suppl. 2:1137-42). Кроме того, как вызванные анорексией, могут указываться злокачественная опухоль, воспалительные заболевания, пониженная функция гипофиза, щитовидной железы или надпочечника и т.д., пост-операционный, чрезмерный стресс и подобные, при этом постоянная анорексия в течение долгого периода времени при таких заболеваниях может являться причиной ослабления организма.

При таких условиях, в последние годы, интенсивные исследования основываются на биологических факторах, которые контролируют потребление пищи, а также на

взаимосвязях факторов, таких как лептин, адипонектин и грелин, в отношении контроля над потреблением пищи. В настоящее время, однако, не сделано никаких выводов относительно факторов, которые играют главную роль в процессе контроля над потреблением пищи и/или контроля над массой тела, и факторов, которые описаны выше, уже применяющиеся при лечении. Таким образом, существует острая потребность в выявлении факторов, которые играют главную роль в контроле над потреблением пищи и/или в контроле над массой тела, и в применении этих факторов для лечения ожирения и липогенеза. Однако, некоторые факторы, которые, как сообщалось, включаются в процесс контроля над потреблением пищи и/или контроля над массой тела и для агониста PPAR $\gamma$ , широко используемого как терапевтический агент при лечении сахарного диабета, непосредственно не вовлекаются в процесс контролирования над потреблением пищи и/или над массой тела.

С другой стороны, нуклеарная жирная кислота, содержащая мотив EF-hand (NEFA), также называемая как нуклеобиндин II (NUCB 2), и полипептид, кодирующий ген NEFA, имеют кальцийсвязывающий домен (EF домен) и ДНК-связывающий домен (Biol Chem Hoppe Seyler 1994, Aug; 375(8):497-512). NEFA имеет высокую гомологию с нуклеобиндином и считается ДНК-связывающим фактором, членом так называемого суперсемейства EF-hand, обладающего реактивностью по отношению к кальцию (Karabinos et al., Mol Biol Evol 1996 Sep; 13(7):990-8). Несмотря на то, что NEFA исследовался относительно его кальцийсвязывающей способности, его связывания с некдином, фактором, регулирующим клеточный рост, и др. (Kroll et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 24, pp. 1-8 and Tanimura et al., J. Biol. Chem. 2000, Oct 13:275(41):31674-81), не существует сообщений о его точных функциях. NEFA изучалась относительно ее возможности являться причинным геном синдрома Ашера, офтальмологического заболевания, и рака желудка (Doucet et al., Biochim. Biophys. Acta. 1998 July 1; 1407(1):84-91 and Line et al., Br. J. Cancer 2002, June 5:86(11):1824-30). Кроме того, хотя продемонстрирована возможность полипептида NEFA секретироваться внеклеточно, поскольку он содержит сигнальную последовательность на аминоконцевой области (Непатентный документ 5), нет сообщений относительно его физиологической или фармакологической роли как результата его внеклеточной секреции. Также, не обнаружено сообщений, которые показывают взаимосвязь NEFA и процесса контроля над потреблением пищи и/или над массой тела.

### Раскрытие изобретения

Задачи, решаемые настоящим изобретением, заключаются в обеспечении нового



способа получения фактора, который включен в процесс контроля над потреблением  
пищи и/или над массой тела, в обеспечении гена, полученного указанным способом,  
5 полипептида, кодируемого указанным геном, и нового полипептида, полученного при  
использовании информации о полипептиде, который кодируется указанным геном,  
предназначенного для лечения, контролирования и диагностики нарушений, связанных с  
10 потреблением пищи, и/или заболеваний, связанных с контролем над массой тела. Также  
обеспечивается субстанция, которая ингибирует действие указанного гена или  
полипептида, предназначенная для лечения как контролирования и диагностики  
нарушений, связанных с контролем над потреблением пищи и/или контролем над массой  
15 тела. Кроме того, обеспечиваются экспериментальные модели болезней, связанных с  
контролем над потреблением пищи и/или контролем над массой тела, полученные при  
использовании указанного гена или полипептида, или субстанции, которая их ингибирует.  
Также, обеспечивается способ скрининга соединений, которые контролируют действие  
20 или экспрессию указанного полипептида, используя модель, соединения, выбранные  
указанным скрининг-способом, и диагностические способы и терапевтические агенты,  
использующие указанные соединения.

25 После интенсивного и обширного исследования по выявлению способа получения  
фактора, вовлеченного в процесс контроля над потреблением пищи и/или массой тела,  
настоящие изобретатели обнаружили, что при использовании тиазолидиндионов,  
обладающих PPAR $\gamma$ -агонистической активностью, могут быть получены гены и  
30 полипептиды, включенные в подавление потребления пищи и/или снижение массы тела.  
Кроме того, было обнаружено, что фактор, полученный указанным способом, являлся  
NEFA, чья функция не указывалась, и таким образом, указанный полипептидный фактор  
обозначался как несфатин. После получения сведений о несфатине, настоящие  
35 изобретатели обнаружили, что частичная последовательность, для которой не было  
обнаружено функциональных доменов по предыдущим сообщениям, имеет активность,  
закрывающуюся в подавлении потребления пищи и/или снижении массы тела, и,  
40 следовательно, раскрывает новые полипептиды несфатин-1, несфатин-1M30, несфатин-  
1M16, несфатин-1M14 и несфатин-1M10. В Нуклеобиндине I (NUCB1), имеющем  
высокую гомологию в аминокислотной последовательности и основной  
45 последовательности гена с NEFA/несфатином и принадлежащем к тому же семейству, что  
и NEFA/несфатин, было также обнаружено, что NUCB1-M30, который является участком,  
соответствующим несфатину-1M30 из NUCB1, проявляет аналогичную активность.

50 Кроме того, было обнаружено, что антитело, которое связывается с несфатином,  
несфатином-1 или несфатином-1M30, имеет активность, состоящую в повышении

потребления пищи и увеличении массы тела, и было подтверждено, что ингибирование активности несфатина, несфатина-1 или несфатина-1M30 является эффективным для повышения потребления пищи и увеличения массы тела.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает следующие:

(1) Способ получения фактора, связанного с контролем над потреблением пищи и/или массой тела, при этом указанный способ содержит следующие этапы:

воздействие соединения тиазолидиндиона, имеющего PPAR $\gamma$ -агонистическую активность, на клетку млекопитающего, и

идентификация гена, экспрессия которого индуцирована указанным соединением;

(2) Способ по (1), в котором указанное соединение тиазолидиндиона представляет собой троглитазон;

(3) Способ по (1) или (2), в котором указанная клетка млекопитающего представляет собой клетку клеточной линии немелкоклеточного рака легких, жировую клетку или клетку, полученную из черепно-мозгового нерва;

(4) Способ по (1), (2) или (3), в котором процесс контроля над потреблением пищи и/или массой тела является подавлением потребления пищи и/или снижением прибавления в весе;

(5) Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 65-73 или SEQ ID NO: 107-115;

(6) Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 39-41 или SEQ ID NO: 101-103;

(7) Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 13-15;

(8) Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, 6 и 9, указанный полипептид, имеющий активность, состоящую в подавлении потребления пищи и/или подавлении прибавления в весе;

(9) Полипептид, имеющий активность, состоящую в подавлении потребления пищи и/или подавлении прибавления в весе, указанный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую гомологию, по меньшей мере, в 60% с любой аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115; или аминокислотную последовательность, в которой некоторые из аминокислот удалены, включены или заменены на аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 или 107-115;

(10) Полипептид имеющий активность, состоящую в подавлении потребления пищи и/или подавлении прибавления в весе, указанный полипептид, содержащий

аминокислотную последовательность, имеющую гомологию, по меньшей мере, в 60% с  
любой аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 3, 6 и 9; или  
5 аминокислотную последовательность, в которой некоторые из аминокислот удалены,  
включены или заменены на аминокислотную последовательность, указанную в любой из  
SEQ ID NO: 3, 6 или 9; или в которой некоторые из аминокислот удалены, включены или  
10 заменены на любую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, 6 и  
9, указанный полипептид, содержащий, по меньшей мере, один сайт узнавания для  
расщепления энзима, содержащегося в живом организме в аминокислотной  
последовательности, соответствующей аминокислотным номерам 82-162 в SEQ ID NO: 3,  
15 6 или 9;

(11) Полипептид по любому из (5) - (10), в котором, по меньшей мере, одна  
аминокислота добавлена к N-концу или C-концу;

(12) Полипептид по любому из (5) - (10), в котором, по меньшей мере, один  
20 аминокислотный остаток модифицирован соединением или пептидом;

(13) Полипептид по любому из (5) - (10), в котором указанная активность,  
состоящая в подавлении прибавления в весе, является активностью, состоящей в  
25 подавлении прибавления телесного жира;

(14) Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, указанный в любом  
из (5) - (13);

(15) Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая base sequence, указанную в  
30 любой из SEQ ID NO: 74-82 и 116-124;

(16) Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную  
последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 44-46 и 104-106;

(17) Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную  
35 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18-20;

(18) Молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную  
последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10, 11 или 12 и которая кодирует  
40 полипептид, имеющий активность, состоящую в подавлении потребления пищи и/или  
подавлении прибавления в весе;

(19) Молекула нуклеиновой кислоты, которая гибридизируется с нуклеотидной  
45 последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106, или  
116-124, или ее частичной последовательностью при жестких условиях, и которая  
кодирует полипептид, имеющий активность, состоящую в подавлении потребления пищи  
и/или подавлении прибавления в весе;

(20) Молекула нуклеиновой кислоты по любому из (14) - (19), где указанная  
50

активность, состоящая в подавлении прибавления в весе, является активностью, заключающейся в подавлении накопления избыточной массы телесного жира;

5 (21) Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из (14) - (20);

(22) Вектор по (21), с которым функционально связана молекула нуклеиновой кислоты под контролем регуляторной молекулы нуклеиновой кислоты, которая контролирует экспрессию указанной молекулы нуклеиновой кислоты;

10 (23) Трансформант, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из (14) - (20);

(24) Трансформант по (23), который экспрессирует продукт транскрипции указанной молекулы нуклеиновой кислоты;

15 (25) Трансформант по (23) или (24), который экспрессирует полипептид, кодируемый указанной молекулой нуклеиновой кислоты;

(26) Трансформант по (23), (24) или (25), где трансформантом является микроорганизм;

20 (27) Трансформант по (26), где указанный микроорганизм представляет собой *Escherichia coli*;

25 (28) Трансформант по (23), (24) или (25), где трансформант представляет собой клетку млекопитающего;

(29) Трансформант по (23), (24) или (25), где трансформант представляет собой растительную клетку;

30 (30) Фармацевтическая композиция для подавления потребления пищи и/или подавления прибавления в весе, при этом указанная композиция, содержащая, в качестве активного ингредиента, полипептид по любому из (5) - (13) или пептид, который содержит некоторую аминокислотную последовательность указанного полипептида, вектор по (21) или (22), или трансформант по любому из (23) - (29);

35 (31) Фармацевтическая композиция по (30), где указанная активность, состоящая в подавлении прибавления в весе, является активностью, заключающейся в подавлении накопления избыточной массы телесного жира;

40 (32) Фармацевтическая композиция по (30) или (31) для пациентов с заболеваниями, выбранными из ожирения, сахарного диабета, гипертензии, гиперлипидемии, гиперурикемии, жировой инфильтрации печени, заболеваний сердца, цереброваскулярных заболеваний, синдрома апноэ во сне, ортопедических заболеваний, нарушений менструального цикла и злокачественных опухолей;

45 (33) Фармацевтическая композиция по (30) или (31), где злокачественной опухолью является любая из рака молочной железы, рака матки, рака толстой кишки, рака

почек, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака печени и рака мочевого пузыря;

(34) Фармацевтическая композиция по любому из (30) - (33), содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество;

(35) Антитело, которое связывается с любым полипептидом по (5) - (13);

(36) Антитело по (35), которое связывается с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, 32;

(37) Вещество, которое подавляет действие или продукцию полипептида по любому из (5) - (13);

(38) Вещество по (37), которое подавляет действие указанного полипептида путем связывания с указанным полипептидом;

(39) Вещество по (37), в котором указанное вещество, которое подавляет действие указанных полипептидов, является антителом по (35) или (36);

(40) Вещество, которое подавляет экспрессию гена, кодирующего полипептид по (5) - (13);

(41) Вещество, подавляющее экспрессию гена, по (40), где указанное вещество, подавляющее экспрессию гена, является антисмысловой олигонуклеотидной молекулой;

(42) Вещество, подавляющее экспрессию гена, по (41), где антисмысловая олигонуклеотидная молекула содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31;

(43) Вещество, подавляющее экспрессию гена, по (40), где указанное вещество, подавляющее экспрессию гена, является молекулой иРНК;

(44) Вектор для получения молекулы антисмыслового олигонуклеотида или молекулы иРНК, указанный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты молекулы антисмыслового олигонуклеотида по (41) или (42) или молекулы иРНК по (43);

(45) Фармацевтическая композиция для повышения аппетита или увеличения прибавления в весе, указанная композиция, содержащая вещество по любому из (37) - (43) или вектор по (44);

(46) Фармацевтическая композиция по (45), содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество;

(47) Трансгенный организм, не являющийся человеком, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из (14) - (20) или вектор по любому из (21) - (22);

(48) Трансгенный организм, не являющийся человеком, по (47), в котором экспрессируется молекула нуклеиновой кислоты по любому из (14) - (20);

(49) Трансгенный организм, не являющийся человеком, по (47) или (48), в который введен трансформант по любому из (23) - (28);

5 (50) Трансгенный организм, не являющийся человеком, по (47), (48) или (49), где указанный трансгенный организм, не являющийся человеком, является трансгенным животным, не являющийся человеком, который проявляет состояние пониженного потребления пищи или состояние сниженного прибавления в весе;

10 (51) Трансгенный организм, не являющийся человеком, по (47), (48) или (49), где указанный трансгенный организм, не являющийся человеком, является трансгенным растением;

15 (52) Трансгенный организм, не являющийся человеком, в который введено антитело по (35) или (36), подавляющее вещество по любому из (37) -(39), вещество, подавляющее экспрессию гена, по любому из (40) - (43) или вектор по (44), и который проявляет состояние, заключающееся в повышенном потреблении пищи или состояние

20 повышенного прибавления в весе;

(53) Нокаутированное животное, не являющееся человеком, в котором весь сегмент гена или его часть, содержащий нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, удален;

25

(54) Нокаутированное животное, не являющееся человеком, по (53), которое проявляет повышенный аппетит или повышенное прибавление в весе;

30 (55) Животное, не являющееся человеком, по (52), (53) или (54), которое может применяться в качестве экспериментальной животной модели болезни, выбранной из ожирения, сахарного диабета, гипертензии, гиперлипидемии, гиперурикемии, жировой инфильтрации печени, заболеваний сердца, цереброваскулярных заболеваний, синдрома апноэ во сне, ортопедических заболеваний, нарушения менструального цикла и злокачественных опухолей;

35

(56) Способ получения пептида по любому из (5) - (13) посредством способа синтеза бесклеточного белка или химического синтетического способа;

40

(57) Способ получения пептида по любому из (5) - (13) при использовании трансформанта по любому из (23) - (29), трансгенного организма, не относящегося к человеку, по любому из (47) - (51), или животного, не относящегося к человеку, по

45

любому из (52) - (55);

(58) Способ получения по (56) или (57), содержащий процесс очистки путем десорбции указанного пептида из антитела по (35) или (36);

50 (59) Способ получения по (56) или (57), содержащий процесс, в котором указанный пептид экспрессируется как слитый с GST белок и затем подвергается очистке при

использовании связанного с глутатионом носителя;

5 (60) Способ получения по (56) или (57), содержащий процесс, в котором указанный пептид экспрессируется как слитый с His-меткой белок и затем подвергается очистке при использовании хелатного носителя, заряженного ионами металла;

10 (61) Способ получения по (56) или (57), содержащий процесс, в котором указанного пептид экспрессируется как слитый с FLAG-меткой белок и затем подвергается очистке при использовании носителя, связанного антителом к FLAG-метке;

15 (62) Аналитический способ прогнозирования или диагностики состояния повышенного потребления пищи или повышенного прибавления в весе, содержащий стадию детектирования содержащегося количества молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, или полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-20 103 и 107-115 в биологическом образце из млекопитающего;

25 (63) Аналитический способ по (62), содержащий стадию сравнения содержащегося количества указанной молекулы нуклеиновой кислоты или указанного полипептида в биологическом образце из млекопитающего, а также в биологическом образце из нормального объекта;

30 (64) Аналитический способ по (62) или (63), содержащий стадию оценки состояния сниженного количества указанной молекулы нуклеиновой кислоты или указанного полипептида в биологическом образце из млекопитающего как заболевания, заключающегося в усиленном потреблении пищи или повышенном прибавлении в весе;

35 (65) Аналитический способ по любому из (62) - (64), содержащий стадию оценки состояния сниженного количества указанной молекулы нуклеиновой кислоты или указанного полипептида в биологическом образце из млекопитающего как заболевания или риска развития заболевания, выбранного из ожирения, сахарного диабета, гипертензии, гиперлипидемии, гиперурикемии, жировой инфильтрации печени, 40 заболеваний сердца, цереброваскулярных заболеваний, синдрома апноэ во сне, ортопедических заболеваний, нарушения менструального цикла и злокачественных опухолей;

45 (66) Аналитический способ по (62) или (63), содержащая содержащий стадию оценки состояния повышенного количества содержащейся указанной молекулы нуклеиновой кислоты или указанного полипептида в биологическом образце из млекопитающего как заболевания, связанного со сниженным потреблением пищи или 50 сниженным прибавлением в весе;

(67) Аналитический способ по любому из (62) - (66), в котором количество содержащегося указанного полипептида определяется при использовании антитела по (35) или (36);

(68) Аналитический способ по любому из (62) - (66), в котором количество содержащейся указанной молекулы нуклеиновой кислоты определяется при использовании, по меньшей мере, одного из праймера для ПЦР, зонда или ДНК-чипа для обнаружения молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124;

(69) Набор реактивов для применения в аналитическом способе по любому из (62) - (68), указанный набор, содержащий, по меньшей мере, один из: праймер для ПЦР, зонд или ДНК-чип для обнаружения молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124; или антитело, распознающее полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 или 107-115, стандартный пептид, или модифицированный пептид для связывания конкурирующей реакции;

(70) Способ скрининга терапевтического или профилактического агента, обладающего подавляющим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, указанный способ содержит следующие стадии:

взаимодействие исследуемого вещества с клеткой млекопитающего, и

обнаружение повышенной экспрессии гена в указанной клетке, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, или повышенного количества полипептида, внутриклеточно содержащегося в указанной клетке или внеклеточно секретированного, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115;

(71) Скрининг-способ по (70), в котором клеткой млекопитающего является такая, в которую введены регуляторная молекула нуклеиновой кислоты, которая контролирует экспрессию гена, содержащая нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, и молекула нуклеиновой кислоты репортерного гена, и индуцированная экспрессия гена, содержащего нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124 определяется путем индуцированной экспрессии репортерного гена;



(72) Способ скрининга терапевтического или профилактического агента, обладающего подавляющим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, указанный способ содержит следующие стадии:

5 взаимодействие исследуемого вещества с млекопитающим, и  
обнаружение повышенной экспрессии гена, содержащего нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106  
10 и 116-124, или повышенной продукции полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115, в биологическом образце из указанного исследуемого животного;

15 (73) Способ скрининга терапевтического или профилактического агента, обладающего подавляющим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, указанный способ содержит следующие стадии:

20 введение исследуемого вещества в трансгенный организм, не относящийся к человеку, по любому из (47) - (50) или животному, не относящегося к человеку, по любому из (52) - (55), и

25 определение подавления потребления пищи или подавления прибавления в весе в указанном трансгенном организме, не относящегося к человеку, или указанном животном, не относящегося к человеку;

30 (74) Скрининг-способ по любому из (70) - (73), в котором терапевтический или профилактический агент, обладающий подавляющим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, является терапевтическим или профилактическим агентом для заболевания, выбранного из ожирения, сахарного диабета, гипертензии, гиперлипидемии, гиперурикемии, жировой инфильтрации печени, заболеваний сердца, цереброваскулярных заболеваний, синдрома апноэ во сне,  
35 ортопедических заболеваний, нарушения менструального цикла и злокачественных опухолей;

40 (75) Терапевтический или профилактический агент, обладающий подавляющим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, при этом указанный агент получен в соответствие со способом по любому из (70) - (74);

45 (76) Терапевтический или профилактический агент по (75), где терапевтический или профилактический агент, обладающий подавляющим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, является терапевтическим или профилактическим агентом для заболевания, выбранного из ожирения, сахарного диабета, гипертензии, гиперлипидемии, гиперурикемии, жировой инфильтрации печени,  
50 заболеваний сердца, цереброваскулярных заболеваний, синдрома апноэ во сне,

ортопедических заболеваний, нарушения менструального цикла и злокачественных опухолей;

5 (77) Способ скрининга терапевтического или профилактического агента, обладающего усиливающим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, указанный способ содержит следующие стадии:

10 взаимодействие исследуемого вещества с клеткой млекопитающего, и обнаружение повышенной экспрессии гена, содержащего нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, в указанной клетке, или повышенное количество полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 15 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115, внутриклеточно содержащегося в указанной клетке или внеклеточно секретируемого;

20 (78) Скрининг-способ по (77), в котором клеткой млекопитающего является такая, в которую введены регуляторная молекула нуклеиновой кислоты, которая контролирует экспрессию гена, содержащая нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, и молекула нуклеиновой 25 кислоты репортерного гена, и пониженная экспрессия гена, содержащего нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, определяется путем пониженной экспрессии репортерного гена;

30 (79) Способ скрининга терапевтического или профилактического агента, обладающего усиливающим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, указанный способ содержит следующие стадии:

35 введение исследуемого вещества млекопитающему, и обнаружение пониженной экспрессии гена, содержащего нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, или пониженную продукцию полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101- 40 103 и 107-115, в биологическом образце из указанного исследуемого животного;

45 (80) Способ скрининга терапевтического или профилактического агента, обладающего усиливающим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, указанный способ содержит следующие стадии:

50 введение исследуемого вещества в трансгенный организм, не относящийся к человеку, по любому из (47) - (50) или животному, не относящегося к человеку, по любому из (52) - (55), и

определение повышения потребления пищи или повышения прибавления в весе в

указанном трансгенном организме, не относящегося к человеку, или указанном животном, не относящегося к человеку; и

5 (81) Терапевтический или профилактический агент, обладающий усиливающим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, при этом указанный агент получен в соответствии со способом по любому из (77) - (80).

### 10 Краткое описание чертежей

Фиг.1 представляет изображение Нозерн-блоттинг при использовании NEFA зонда, которое показывает, что экспрессия NEFA гена индуцирована троглитазоном и что NEFA ген постоянно экспрессируется в клетках 3T3-L1, которые дифференцируются в предшественники жировых клеток, в клетках клеточной линии HBT185 15 цереброспинальной бластоцитомы человека и клетках SQ-5.

Фиг.2, панель А представляет изображение, которое показывает схематическую диаграмму структуры NEFA полипептида, кодируемого NEFA геном, и фигуру 20 последовательности NAP пептида, используемого для получения анти-несфатинового антитела. Фиг.2, панель В представлено изображение вестерн-блоттинга при использовании поликлонального антитела, приготовленного с NAP пептидом, показывая, что полипептид, кодируемый NEFA геном, присутствует в экстракте крысиного мозга. 25

Фиг.3 представляет изображение иммуногистохимического окрашивания при использовании поликлонального антитела против NAP пептида, показывая, что NEFA ген экспрессируется в участках, связанных с контролем над потреблением пищи, таких как 30 дугообразное ядро (Arc), перивентрикулярное ядро (PVN), супраоптическое ядро гипоталамуса (SON) и латеральная гипоталамическая область (LH) гипоталамуса мозга крысы. 35

Фиг.4, панель А представляет изображение вестерн-блоттинга при использовании поликлонального антитела против NAP пептид, показывая экспрессию и чистоту GST-NEFA, который представляет связанную форму GST и мышинового зрелого несфатина. 40 Фиг.4, панель В, полосы 1-4 представляют маркер Rainbow, предварительно индуцированную бактерию, осадок после обработки ультразвуком и очищенный GSTNAP, соответственно. Также, Фиг.4, панель В, представляет изображение вестерн-блоттинга при использовании анти-несфатинового антитела, показывая процесс связывания GST-NEFA с 45 тромбином и чистоту. Фиг.4, панель В, полоса 1 представляет маркер, полоса 2 представляет образец после очистки, полосы 3-6 представляют образцы промывок, и полоса 7 - очищенный образец.

50 Фиг.5 представляет график, показывая, что поведение по потреблению пищи крыс

снижается при введении рекомбинантного несфатина в третий желудочек мозга крысы. На Фиг.5, \* и \*\* представляют достоверную разницу  $P < 0.05$  и  $P < 0.01$ , соответственно, относительно контрольной группы .

5 Фиг.6 представляет график показывая, что поведение по потреблению пищи крыс повышается путем введения анти-несфатинового антитела в третий желудочек мозга крысы. На Фиг.6, \* представляет достоверную разницу  $P < 0.001$  относительно  
10 контрольного IgG.

Фиг.7 показывает изображение гибридизации *in situ* в ткани мозга, показывая, что голодание может снижать экспрессию несфатинового гена в крысином гипоталамусе и восстановление питания может восстановить экспрессию. На Фиг.7, А представляет  
15 контрольную группу, В представляет голодающую группу и С представляет группу с восстановленным питанием, и верхние фигуры представляют 100-кратно увеличенные изображения и нижние фигуры представляют 400-кратно увеличенные изображения.

20 Фиг.8 показывает изображение иммуногистохимического окрашивания при использовании анти-несфатинового антитела, показывая, что голодание может снижать экспрессию несфатин в крысином гипоталамусе. На Фиг.8, А представляет контрольную  
25 группу и В представляет голодающую группу. Здесь также приведено изображение иммуногистохимического окрашивания (С) при использовании анти-С-Fos антитела, показывая, что сниженная экспрессия несфатин во время голодания происходит вследствие повышенного аппетита. На Фиг.8 верхние фигуры представляют  
30 перивентрикулярное ядро (PVN) и нижние фигуры представляют дугообразное ядро (Arc).

Фиг.9А представляет рисунок, который показывает аминокислотные последовательности человеческого и крысиного несфатина и предполагаемый сайт  
35 расщепления для прогормон-конвертазы. ▼ представляет предполагаемый сайт расщепления для прогормон-конвертазы.

Фиг.9В представляет схематическую диаграмму, показывающую положение пептидов в несфатине для приготовления антитела против несфатин-1, несфатин-2,  
40 несфатин-3, несфатин-2/3, а также несфатин-1, несфатин-2/3 и несфатин-3, который, как предполагается, образуется под действием прогормона-конвертазы.

Фиг.9С представляет рисунок вестерн-блоттинга, показывая, что антитело *per se* против несфатин-1 и несфатин-3 связывается с интересующим антигеном. На Фиг.9С,  
45 рисунок в левой части показывает результат эксперимента, в котором несфатин-1 пептид мигрировал и подвергнулся вестерн-блоттингу с несфатин-1 IgG, и рисунок в правой части показывает результат эксперимента, в котором несфатин-3 пептид мигрировал и  
50 подвергнулся вестерн-блоттингу с несфатин С2 IgG.

Фиг.10 представляет изображение двойного иммуногистохимического окрашивания при использовании анти-несфатин-1 антитела и анти-РС-1/3 антитела или анти-РС-2 антитела, показывая наличие клетки, которая одновременно экспрессирует несфатин-1 и прогормон-конвертазу (РС-1/3 или РС-2) в крысином мозге. Верхняя панель и нижняя панель в А на Фиг.10 представляют окрашенные изображения с несфатин-1 IgG в иммуногистохимическом изображении ткани гипоталамуса крысы, и верхняя панель в В на Фиг.10 представляет флуоресцентное изображение с РС-1/3 и нижняя панель в В на Фиг.10 представляет флуоресцентное изображение с РС-2.

Фиг.11 представляет график, показывающий, что введение несфатина-1 в третий желудочек крыс подавляет поведение по потреблению пищи крыс, но введение несфатина-2 или несфатина-3 не оказывает никаких изменений в поведении относительно потребления пищи.

Фиг.12 представляет график, показывающий, что непрерывное введение несфатина-1 в третий желудочек крыс приводит к устойчивому подавлению потребления пищи (А) и устойчивому подавлению прибавления в весе (В).

Фиг.13А представляет график, показывающий, что введение антитела против несфатина-1 в желудочек крыс повышает аппетит. На Фиг.13А, \* и \*\* представляют достоверную разницу  $P < 0.05$  и  $P < 0.001$ , соответственно, относительно контрольной группы с введением IgG.

Фиг.13В представляет график, показывающий, что введение мутанта, в котором несфатин-1 не может отделяться от несфатина в желудочке крыс, не вызывает повышение аппетита сравнительно с несфатином.

Фиг.14 представляет график, показывающий, что непрерывное введение антисмысловой РНК против несфатина в желудочек крыс приводит к подавлению потребления пищи (А) и подавлению прибавления в весе (В). На Фиг.14, \* и \*\* представляют достоверную разницу  $P < 0.05$  и  $P < 0.01$ , соответственно, относительно миссенса.

Фиг.15 представляет график, показывающий результат измерения количества потребленной пищи после введения несфатина-1 в желудочек Lean крыс и Zucker крыс, которые являются модельными животными экспериментального ожирения, устойчивого к лептину. У крыс линии Zucker, так же как и у крыс линии Lean (нормальные животные), подавление потребления пищи отмечается при интрацентрикулярном введении несфатина-1. На Фиг.15, \* и \*\* представляют достоверную разницу  $P < 0.05$  и  $P < 0.001$ , соответственно, относительно группы с введением физиологического раствора. Белые диаграммы и заштрихованные диаграммы представляют группы с введением

физиологического раствора и группу с введением несфатин-1, соответственно.

Фиг.16 представляет график, показывающий эффект интраперитонеального введения несфатина-1 мышам на количество потребления пищи. График демонстрирует, что активность несфатина-1 по подавлению потребления пищи может наблюдаться при интраперитонеальном введении мышам как такового (А). Также показан результат, когда несфатин-1 интраперитонеально вводили желтым мышам агути, которые являются модельными мышами экспериментального ожирения, и контрольным мышам. Показано, что интраперитонеальное введение несфатина-1 обеспечивает аналогичный эффект у контрольных мышей (В) и у желтых мышей агути (С) также.

Фиг.17 представляет график, показывающий эффект подкожного введения несфатина-1 мышам на количество потребления пищи. Несмотря на то, что несфатин-1 повышает эффект подавления потребления пищи как при интраперитонеальном введении (ip), так и при подкожном введении (sc), развитие эффекта имеет тенденцию к задержке при подкожном введении. На Фиг.17, \* и \*\* представляют достоверную разницу  $P < 0.05$  и  $P < 0.005$ , соответственно, относительно группы с введением физиологического раствора.

Фиг.18А представляет график, показывающий эффект количества потребления пищи при интраперитонеальном введении несфатина-1N23, несфатина-1M30 и несфатина-1C29 мышам. Среди частичных пептидов несфатина-1, только несфатин-1M30 демонстрировал значительный эффект подавления потребления пищи. На Фиг.18А, \* представляет достоверную разницу  $P < 0.02$  относительно группы с введением физиологического раствора.

Фиг.18В представляет рисунок, который показывает результат аминокислотного выпрямления человеческого, мышинного и крысиного несфатина-1 и участки несфатина-1N23, несфатина-1M30 и несфатина-1C29. Показано, что аминокислотные последовательности высоко консервативны между видами в участке несфатина-1M30.

Фиг.19А-1 представляет график (А-1), показывающий стандартную кривую в системе конкурентного ферментативного иммуноанализа (РИА), что демонстрирует концентрацию несфатина или несфатина-1 в образце, и представлена таблица (А-2), показывающая результат измерения цереброспинальной жидкости. Уравнение стандартной кривой:  $Y = D + (A - D) / (1 + (\text{Log}(X) / C)^B)$ . График #1 (стандартное значение: значение концентрации против измеряемого значения).  $A = 8.4672E-001$ ;  $B = 4.3850E+000$ ;  $C = 3.5938E+000$ ;  $D = -2.8957E-001$ ;  $R^2 = 0.9998$ .

Фиг.19А-2 представляет график (А-1), показывающий стандартную кривую в системе конкурентного РИА, что демонстрирует концентрацию несфатин или несфатина-1 в образце и представлена таблица (А-2), показывающая результат измерения в

цереброспинальной жидкости.

Фиг.19В представляет график (b-1 и b-2), показывающий результат анализа, в котором образцы пептидов, выделенных из ткани гипоталамуса и цереброспинальной жидкости фракционировали с помощью ВЭЖХ и несфатин-1 во фракциях определяли с помощью системы конкурентного РИА.

Фиг.20 представляет график, показывающий эффект количества потребления пищи при интраперитонеальном введении частичных пептидов несфатина-1М30 мышам. Во всех случаях при введении несфатина-1М16М (М16М), несфатина-1М10М (М10М) или несфатина-М14 (М14), наблюдался эффект подавления потребления пищи. На Фиг.20, \* и \*\* представляют достоверную разницу  $P<0.02$  и  $P<0.002$ , соответственно, относительно группы с введением физиологического раствора.

Фиг.21А представляет график, показывающий эффект количества потребления пищи при интраперитонеальном введении человеческого несфатин-1М30 и мышинового NUCB1-М30 мышам. Показано, что эффект подавленного потребления пищи может быть отмечен для человеческого несфатина-1М30 (человеческий/несфатин-1М30) и мышинового NUCB1-М30 (мышинный NUCB1), а также для мышинового несфатина-1М30 (мышинный/несфатин-1М30). На Фиг.20, \* представляет достоверную разницу  $P<0.02$  относительно группы с введением физиологического раствора.

Фиг.21В представляет рисунок, который показывает результат выравнивания аминокислотных последовательностей человеческого, крысиного и мышинового несфатина и человеческого, крысиного и мышинового NUCB1 и сайта, соответствующего несфатину-1, и сайта, соответствующего несфатин-1М30. Показано, что аминокислотные последовательности высоко консервативны в сайте, соответствующем несфатину и несфатину-1 NUCB2, в особенности несфатину-1М30.

Фиг.21С представляет рисунок, который показывает результат выравнивания аминокислотных последовательностей человеческого, крысиного и мышинового несфатина и человеческого, крысиного и мышинового NUCB1 и сайта, соответствующего несфатину-1, и сайта, соответствующего несфатину-1М30, и представляет продолжение Фиг.21В.

Фиг.22 показывает изображение гибридизации *in situ* при использовании NEFA зонда в различных тканях. Фиг.22, панель А представляет срез ткани, содержащий перивентрикулярное ядро (PVN) и супраоптическое ядро (SON). Фиг.22, панель В представляет срез ткани, содержащий неопределенную зону (*zona incerta*, Zi) и дугообразное ядро (Arc). Фиг.22, панель С представляет срез ткани, содержащий латеральную область гипоталамуса (LHA) гипоталамуса.

Фиг.23, панель А представляет график, показывая, что введение рекомбинантного

несфатина в третий желудочек мозга крысы может подавить количество потребляемой пищи крысами. Фиг.23, панель В представляет рисунок, который показывает количество потребляемой пищи в течение 0-1 часа, 1-3 часов, 3-6 часов и 6-12 часов в группе с введением несфатина (заштрихованный график), которым вводили 5 пмоль несфатина в третий желудочек мозга крыс, и контрольной группы (0 пмоль несфатина, белый график). На Фиг.23, панель А \* представляет достоверную разницу  $P < 0.01$  относительно 0 пмоль, и на Фиг.23, панель В \* представляет достоверную разницу  $P < 0.05$  и \*\* представляет достоверную разницу  $P < 0.01$ .

Фиг.24, панель А показывает результат анализа изображения при гибридизации *in situ* экспрессии мРНК несфатина в разных участках дугообразного ядра (Arc), перивентрикулярного ядра (PVN), латеральной области гипоталамуса (LHA) и супраоптического ядра (SON) в гипоталамической области мозга крыс в группе, где крысам давали питание вволю (контрольная группа), и в голодающей группе. Фиг.24, панель В показывает результат анализа изображения, при применении способа конкурентного РИА, экспрессии несфатин-1 пептидов в перивентрикулярном ядре (PVN) среди гипоталамической области крыс в группе, где крысам давали питание вволю (контрольная группа: белый график), и в голодающей группе (заштрихованный график).

Фиг.25 представляет рисунок, который показывает количество потребленной пищи в течение 0-1 часа, 1-3 часов, 3-6 часов и 6-12 часов для группы с введением несфатина (заштрихованный график), которым вводили 5 пмоль несфатина в третий желудочек мозга крыс, и контрольной группы (0 пмоль несфатина, белый график). \* представляет достоверную разницу  $P < 0.01$  относительно 0 пмоль.

Фиг.26 представляет график, показывающий количество потребленной пищи через 1 час после введения для контрольной группы, которые получали только физиологический раствор (несфатин-1 IgG/несфатин-1/лептин: -/-/-), группы, в которой получали только несфатин-1 (несфатин-1 IgG/несфатин-1/лептин: -/+/-), группы, в которой получали несфатин-1 и анти-несфатин-1 антитело (несфатин-1 IgG/несфатин-1/лептин: +/+/-), группы, в которой получали лептин только (несфатин-1 IgG/несфатин-1/лептин: -/-/+), и для группы, в которой получали лептин и анти-несфатин-1 антитело (несфатин-1 IgG/несфатин-1/лептин: +/-/+). \* представляет достоверную разницу  $P < 0.01$  относительно контрольной группы.

Фиг.27, панель А показывает изображение вестерн-блоттинга, осуществляемого с анти-несфатин-1 антителом при использовании белка, выделенного из мозга крыс. Фиг.27, панель В показывает изображение вестерн-блоттинга при около 47,5 кДа, осуществляемого после предыдущего взаимодействия анти-несфатин-1 антитела и



различных пептидов. Верхняя часть панели В на Фиг.27 - не обнаружено пептидов, реагирующих с анти-несфатин-1 антителом, NAP1-Ab пептид (сходный пептид), лептин,  $\alpha$ MSH и CART слева, и в нижней части панели В на Фиг.27 нет пептидов, NAP1-Ab пептид (сходный пептид) NPY, MCH и Orexin-A слева.

Фиг.28, панель А показывает изображение иммуногистохимического окрашивания при использовании антитела к NAP пептиду в ткани мозга, содержащей продолговатый мозг. Фиг.28, панель В показывает изображение иммуногистохимического окрашивания, выполненного после реакции антитела против NAP пептида с NAP пептидом (сходный пептид).

Фиг.29, панель А представляет график, показывающий массу тела группы (TGZ: +), в которой пища, содержащая троглитазон, давалась нормальным крысам (Lean) и крысам линии Zucker fa/fa (Zucker), и группы (TGZ: -), в которой крысам давали пищу без троглитазона. Фиг.29, панель В представляет график показывающий концентрацию лептина в крови группы (TGZ: +) в которой пища, содержащая троглитазон, давалась нормальным крысам (Lean) и крысам линии Zucker fa/fa (Zucker), и группы (TGZ: -), в которой крысам давали пищу без троглитазона. Фиг.29, панель С представляет график, показывающий концентрацию несфатина в мозге группы (TGZ: +), в которой пища, содержащая троглитазон, давалась нормальным крысам (Lean) и крысам линии Zucker fa/fa (Zucker), и группы (TGZ: -), в которой крысам давали пищу без троглитазона. На Фиг.29, \* и \*\* представляют достоверную разницу  $P<0.05$  и  $P<0.01$ , соответственно, относительно группы (TGZ: -) в которой пища, содержащая троглитазон, давалась нормальным крысам (Lean), и на Фиг.29 # и ## представляют достоверную разницу  $P<0.05$  и  $P<0.01$ , соответственно, относительно группы (TGZ: -), в которой пищу без троглитазона давали крысам линии Zucker fa/fa.

Фиг.30, панель А показывает изображение вестерн-блоттинга фракции No. 45, полученной путем фракционирования пептида, выделенного из крысиного гипоталамуса посредством ВЭЖХ. Фиг.30, панель В показывает изображение части с молекулярной массой приблизительно в 9,7 кДа в изображении вестерн-блоттинга фракций № 43-47, полученный путем фракционирования пептида, выделенного из крысиного гипоталамуса посредством ВЭЖХ.

Фиг.31, панель А показывает результат иммуногистохимического окрашивания при использовании антитела против несфатина-1 в ткани мозга крыс, содержащей дугообразное ядро, и результат иммуногистохимического окрашивания, выполненный после взаимодействия анти-несфатин-1 антитела с различными пептидами. На панели А на Фиг.31, а-1 представляет изображение иммунологического окрашивания с анти-

несфатин-1 антителом, а-2 - а-6 представляют изображения иммунологического окрашивания, когда анти-несфатин-1 антитело прежде взаимодействовало с несфатин-1 пептидом (а-2), лептином (а-3),  $\alpha$ MSH (а-4), CART (а-5) и NPY (а-6), соответственно.

Фиг.31, панель В показывает результат иммуногистохимического окрашивания при использовании анти-несфатин-1 антитела в ткани мозга крыс, содержащей перивентрикулярное ядро, и результат иммуногистохимического окрашивания, выполненный после взаимодействия анти-несфатин-1 антитела с различными пептидами. На панели В, b-1 представляет изображение иммунологического окрашивания с анти-несфатин-1 антителом, b-2 - b-6 представляют изображения иммунологического окрашивания, когда анти-несфатин-1 антитело прежде взаимодействовало с несфатин-1 пептидом (b-2), лептином (b-3),  $\alpha$ MSH (b-4), CART (b-5) и NPY (b-6), соответственно.

Фиг.32 представляет график результатов, показывающий индекс (масса ткани/масса тела, мг/г) массы ткани абдоминальной подкожной жировой ткани (А), эпидермальной жировой ткани (В), мезентериальной жировой ткани (С), ретроперитонеальной жировой ткани (D), бурой жировой ткани (Е) и икроножной мышцы (F), полученные от крыс, которым давали несфатин-1 или только физиологический раствор в течение 10 дней относительно массы тела каждого индивидуума. На Фиг.32 \* \*\* представляет достоверную разницу  $P < 0.05$  и  $P < 0.005$ , соответственно, относительно группы с введением физиологического раствора.

Фиг.33 представляет график результатов анализа количества потребленной пищи, глюкозы в крови, общего холестерина и триглицеридов, когда несфатин-1 или только физиологический раствор интраперитонеально вводили мышам. На Фиг.33, белая диаграмма и заштрихованная диаграмма представляет группу с введением физиологического раствора и группу с введением несфатин-1, соответственно.

В соответствии с настоящим изобретением, фактор, вовлеченный в контроль над потреблением пищи и массой тела, может быть получен при использовании агониста  $PPAR\gamma$ . Также, использование несфатина, несфатина-1, несфатина-1M30, несфатина-1M16, несфатина-1M14, несфатина-1M10M, NUCB1-M30, NUCB1-M16, NUCB1-M14 и NUCB1-M10M, может применяться для профилактики и лечения заболеваний, связанных с метаболическими нарушениями и нарушениями потребления пищи, таких как ожирение или липоматоз, нервная гиперфагия, сахарный диабет 2 типа, нарушение толерантности к глюкозе, гипертензия, гиперлипидемия, гиперурикемия, жировая инфильтрация печени, заболевания сердца, цереброваскулярные заболевания, синдром апноэ во сне, ортопедические заболевания, такие как остеоартриты, нарушения менструального цикла и заболеваний, связанных с липоматозом, таких как злокачественные опухоли. Кроме того,

использование вещества, такого как антитело, которое подавляет активность несфатина, несфатина-1 или несфатина-1M30, может применяться для профилактики и лечения заболеваний, связанных с нарушениями питания и потребления пищи, таких как анорексия и патологическое отвращение к пище в послеоперационный период и/или для раковых пациентов.

### Осуществление изобретения

<Способ получения фактора, вовлеченного в контроль потребления пищи и/или фактора контроля массы тела>.

Настоящее изобретение относится к способу получения фактора вовлеченного в контроль потребления пищи и/или фактора контроля массы тела, заключающий в себя этапы реагирования соединения, содержащего тиазолидиндион, обладающего PPARγ-агонистической активностью в отношении клеток живых существ, относящихся к млекопитающим, и идентификацией гена, экспрессия которого индуцируется упомянутым соединением.

В используемом здесь значении «контроль потребления пищи» имеется в виду контроль количества корма у животных или пищи у людей (оба значения здесь и в дальнейшем будут вместе называться питанием и др.) в течение определенного периода времени, или контроль общего количества калорий, полученных с питанием и др., в течение определенного периода времени. Контроль количества пищи также включает в себя такие события, как чувство аппетита или чувство насыщения, которое регулирует потребление пищи.

В используемом здесь значении «подавление потребления пищи» относится к состоянию, в котором количество питания и др. или общего количества калорий, полученных с питанием и др., уменьшается по сравнению с теми значениями, когда контроль над приемом пищи не осуществляется, или состоянию, в котором развивающаяся тенденция к увеличению количества питания и др. или общего количества калорий, полученных с питанием и др., снижается по сравнению с тем состоянием, когда контроль над приемом пищи не производился. Также, снижение потребления пищи включает в себя такие состояния, как снижение аппетита и усиление чувства насыщения.

С другой стороны, «увеличение потребления пищи» в используемом здесь значении относится к состоянию, при котором количество питания и др. или общего количества калорий, полученных с питанием и др., увеличивается по сравнению с тем состоянием, когда контроль над приемом пищи не производился или с тем состоянием, в котором развивающаяся тенденция к снижению количества питания и др. или общего

количества калорий, полученных с питанием и др., снижается по сравнению с тем состоянием, когда контроль над приемом пищи не производился. Также, усиленный аппетит включает в себя такие состояния, как увеличение аппетита и снижение чувства насыщения.

"Контроль массы тела" в используемом здесь значении имеется в виду контролирование абсолютной величины массы тела, индекса массы тела (индекс, который использует массу тела и длину тела) или процент содержания жира в организме. В используемом здесь значении «снижение прироста массы тела» относится к состоянию, при котором абсолютная величина массы тела, индекса массы тела (индекс, который использует массу тела и длину тела) или процент содержания жира в организме снижаются или сохраняются на прежнем уровне по сравнению с тем состоянием, когда контроль над весом тела не производился или с тем состоянием, в котором развивающаяся тенденция к увеличению величины массы тела, индекса массы тела (индекс, который использует массу тела и длину тела) или проценту содержания жира в организме, снижается по сравнению с тем состоянием, когда контроль над весом тела не производился.

"Снижение накопления жира в организме» в используемом здесь значении относится к состоянию, при котором процент жира в организме уменьшается или сохраняется на прежнем уровне по сравнению с тем состоянием, когда контроль над весом тела не производился или с тем состоянием, в котором развивающаяся тенденция к увеличению процента содержания жира в организме уменьшается по сравнению с тем состоянием, когда контроль над весом тела не производился.

"Усиление прироста массы тела» имеется в виду состояние, при котором абсолютная величина массы тела, индекс массы тела или процент содержания жира в организме увеличиваются или сохраняются на прежнем уровне по сравнению с тем состоянием, когда контроль над весом тела не производился, или с тем состоянием, при котором развивающаяся тенденция к увеличению абсолютной величины массы тела, индекса массы тела или процента содержания жира в организме уменьшается по сравнению с тем состоянием, когда контроль над весом тела не производился, и это также в сказанном здесь значении "подавление снижения массы тела". В случае людей, как типичный индекс массы тела используется высота ИМТ (индекс массы тела), которая вычисляется из массы тела (кг) ÷ рост (м) ÷ рост (м), и выражается в единицах кг/м<sup>2</sup>

Таким образом, эффект такого снижения в набории массы тела или такого увеличения в набории массы тела может быть выражен с использованием ИМТ как индекса. Также, процент содержания жира в организме обозначается, как процент веса

жира тела по отношению к весу тела и может быть определен с помощью способа измерения плотности тела, способа измерения влажности тела, способа измерения содержания калия, способа измерения сопротивления, способа измерения поглощения двойных рентгеновских лучей, способа активации нейтрона, способа инфракрасной микроскопии, способа измерения толщины кожи, способа видеоизображения и тому подобных способов (The Japanese Journal of Clinical Medicine (Nippon Rinsho) Vol. 61, Supplement 6, pp. 357-396, 2003, issued by Nippon Rinsho K.K.).

Контроль потребления пищи и/или фактора контроля массы тела, заключающий в себя этапы реагирования соединения, содержащего тиазолидиндион, обладающего PPAR $\gamma$ -агонистической активностью в отношении клеток живых существ, относящихся к млекопитающим, и идентификацией гена, экспрессия которого индуцируется упомянутым соединением.

В используемом здесь значении «соединение, содержащее тиазолидиндион, обладающее PPAR $\gamma$ -агонистической активностью» включает, например, троглитазон, пиоглитазон, росиглитазон, и робоглитазон и т.д., и троглитазон был первым введенным в клиническую практику.

Клетками, использованными в настоящем изобретении, могут быть клетки немелкоклеточного рака легкого, адипоциты, клетки, полученные из церебральной нервной ткани, и не только такие клетки, но любые клетки, экспрессирующие PPAR $\gamma$  могут быть использованы.

Как способ воздействия вышеупомянутого соединения на клетки млекопитающих, что будет описано ниже, используется способ, в котором вышеупомянутая клетка культивируется при стимуляции вышеупомянутого соединения. (Sato et al., Oncogene, England, 2002, Vol. 21, pp. 2171-2180). Ген, экспрессия которого индуцируется вышеупомянутым соединением, может быть идентифицирован с помощью, например, способа, в котором ген, экспрессия которого специфически индуцируется, подвергается удалению, или способа анализа структуры ДНК и прочих (Sato et al., Oncogene, England, 2002, Vol. 21, pp. 2171-2180). С целью выделения гена, кодирующего фактор, который секретируется экстрацеллюлярно, среди генов, которые специфически индуцируются активацией PPAR $\gamma$ , проанализирована нуклеотидная последовательность гена и может быть выделена, в зависимости от того, кодирует она секреторный сигнальный пептид или нет. Более того, в качестве способа выделения гена, вовлеченного в контроль потребления пищи и/или контроль массы тела среди других генов, могут быть использованы способ иммунологической детекции (проиллюстрированный в Демонстрационном Примере 3) или гистохимический способ (проиллюстрированный в

Демонстрационных Примерах 4 и 9) с образцами экстракта ткани мозга с гипоталамусом человека или животных и антителами, которые связываются с полипептидом, кодируемым вышеупомянутым геном, и способ, обнаруживающий экспрессию в гипоталамусе с помощью гибридизации *in situ* (проиллюстрировано в Демонстрационном Примере 8) и способ обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции.

Нуклеотидная последовательность для гена, вовлеченного в контроль потребления пищи и/или контроль массы тела, полученная таким образом, может быть проанализирована с целью определения аминокислотной последовательности кодируемого полипептида. Пептид или полипептид, имеющий полученную аминокислотную последовательность, или ее часть таким образом может быть синтезирован с помощью способа генной инженерии или способа химического синтеза.

Полипептид, полученный таким образом, либо молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вышеупомянутый пептид, в такой форме, которая позволяет экспрессироваться *in vivo* локально или системно в тестируемом животном и далее изучение изменений в количестве принимаемой пищи и/или массы тела этого животного, позволяет выделить полипептид или ген, вовлеченный в контроль потребления пищи и/или контроль массы тела, из полученного полипептида или гена, кодирующего этот полипептид.

С помощью другого способа можно ввести тестируемому животному местно или системно антитело, которое связывается с полипептидом, полученным таким образом или молекулу антисмыслового олигонуклеотида или молекулу иРНК, способную подавлять экспрессию гена, кодирующего вышеупомянутый полипептид, и затем путем регистрации изменений в количестве потребляемой пищи указанным животным и/или массы тела, полипептид или ген, вовлеченный в контроль над потреблением пищи и/или массы тела может быть выделен из полученного полипептида или гена, кодирующего этот полипептид.

<Полипептид, обладающий способностью подавлять потребление пищи и/или снижать вес тела>

Настоящее изобретение относится к полипептиду, полученному вышеописанным способом, обладающему способностью подавлять потребление пищи и/или снижать вес тела. В качестве такого полипептида может быть полипептид, кодируемый геном несфатина, функция которого не определена, и настоящими исследователями впервые показано, что указанный полипептид имеет вышеописанную функцию. В соответствии с настоящим изобретением было показано, что ген несфатина экспрессируется в гипоталамусе мозга, который, как уже было сказано, контролирует аппетит

(проиллюстрировано в Демонстрационных Примерах 4,8, 9, 24 и 26), и что полипептид несфатин при употреблении животными вызывает уменьшение количества потребляемой пищи и уменьшение массы тела (проиллюстрировано в Демонстрационных Примерах 6 и 25). Далее было продемонстрировано, что, при подавлении функции полипептида несфатина, или при ингибировании экспрессии гена несфатина, может происходить увеличение потребления пищи и увеличение веса животных (проиллюстрировано в Демонстрационном Примере 7 и Демонстрационном Примере 15).

В качестве примеров полипептида несфатина могут быть приведены те, которые содержат аминокислотные последовательности данные в SEQ ID под номерами: 3, 6 и 9. Предшественник полипептида несфатина содержащий сигнальный пептид человека дан в SEQ ID под номером 2. Сигнальный пептид отбрасывается, когда предшественник полипептида несфатина секретируется из клетки, и, таким образом, зрелый человеческий полипептид несфатин, обладающий значительной активностью, продуцирует форму, данную в SEQ ID под номером 3. В используемом здесь значении, полипептид несфатин просто называется несфатином.

Более того, продолжающееся интенсивное и экстенсивное изучение полипептида несфатина, имеющего вышеописанную способность подавлять потребление пищи и/или снижать массу тела привело к изобретению полипептида с новой структурой, обладающего способностью подавлять потребление пищи и/или снижать вес тела. Открытие этого полипептида с новой структурой было основано на исследовании различных пептидов, полученных из полипептида несфатина, путем определения способности полипептида несфатина подвергаться расщеплению протеолитическими ферментами когда они секретируются из клетки. В результате было установлено, что полипептид, имеющий 82 аминокислотных остатка и последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам с № 25 по №106 последовательности полипептида несфатина данной в SEQ ID под номером 5, имеет способность подавлять потребление пищи и/или снижать массу тела и снижать процент жира в организме (проиллюстрировано в Демонстрационном Примере 12, Демонстрационном Примере 13 и в Демонстрационном Примере 34), и что если заингибировать супрессорную функцию полипептида несфатина-1, происходит увеличение количества принимаемой пищи животными. Основываясь на вышеизложенном, указанный полипептид был назван несфатин-1 (SEQ ID под номером 14). Несмотря на то, что полипептид несфатин имеет кальцийсвязывающий домен и прочее в своей структуре, в последовательности полипептида несфатина-1 нет таких доменных структур, поэтому, чтобы получить этот полипептид несфатин-1 стандартных технологий недостаточно. Кроме того, известно, что

белковые гормоны экспрессируются в виде белков-предшественников, которые в дальнейшем расщепляются протеолитическими ферментами и прочими, и существует много сообщений о том, что конвертаза прогормона (или конвертаза пробелка: PC) имеет роль в активности. В полноразмерном человеческом полипептиде несфатине данном в SEQ ID под номером 2, в мышинном предшественнике полипептида несфатина, данного в SEQ ID под номером 5, и крысином предшественнике полипептида несфатина, данного в SEQ ID под номером 8, есть общий сайт (см. Демонстрационный Пример 10), который, по-видимому, отщепляется при действии подтипа прогормон-конвертазы, PC1/3 (EC 3.4.21.93, Seidahi et al., DNA and Cell Biology, USA, Vol. 9, 1990, pp. 415-424) или PC2 (EC 3.4.21.94, Seidah et al., DNA and Cell Biology, USA, Vol. 9, 1990, pp. 415-424), и также показано, что отщепляются полипептиды несфатинов-1, данные в SEQ ID под номерами 13 и 15 соответственно.

Кроме того, если ввести в желудочек мозга крысы несфатин (Mut), имеющий мутацию в сайте, отщепляемому прогормон-конвертазой, получается неожиданный результат – эффект супрессии потребления пищи не наблюдается (Демонстрационный Пример 14). Следовательно, это предполагает то, что полипептид несфатина-1 является функциональной молекулой, вовлеченной в контроль потребления пищи и/или контроль массы тела в живом организме, и важным является процессинг, осуществляемый протеазой, такой как прогормон-конвертаза.

Из всего вышесказанного остается неясной функция несфатина/NEFA как гормонального предшественника наподобие проинсулина, и, поэтому, впервые в настоящем изобретении после экспрессии сайта для несфатина/NEFA и экспрессии несфатина/NEFA в клетках, которые экспрессируют PC1/3 и PC2 были проанализированы и интенсивно изучены их активность и структура. Кроме того, так как существуют секреторные белки, которые не процессируются PC1/3 и PC2, несмотря на наличие последовательности Arg-Arg или Lys-Arg в сайте узнавания прогормон-конвертазы, нельзя высказать предположение, что несфатин-1 отщепляется от несфатина/NEFA и проявляет активность, выражающуюся в подавлении потребления пищи и/или уменьшении массы тела.

Из всего вышесказанного следует, что настоящее изобретение также относится к полипептидам несфатина-1 данным в SEQ ID под номерами: 13-15. Как описано выше, указанные полипептиды несфатина-1 обладают способностью снижать потребление пищи и/или снижать вес тела. Аминокислотная последовательность мышинного полипептида несфатина показана в под номером 14. Полипептид несфатина, имеющий такую последовательность, может быть получен путем отщепления от полипептида несфатина,



данного в SEQ ID под номером 14 с помощью прогормон-конвертазы с последующей очисткой способом обратно-фазовой хроматографии или с помощью антительного способа, описанного ниже, с использованием антитела к полипептиду несфатина-1.

5 Более того, после длительного интенсивного изучения структуры полипептида несфатина-1 и активности, подавляющей потребление пищи и/или уменьшающей вес тела, было показано, что новый полипептид, состоящий из 30 аминокислотный остатка и  
10 имеющий последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам с 24 по 53 полипептида несфатина, показанного в SEQ ID под номером 14 обладает активностью, подавляющей потребление пищи и/или уменьшающей вес тела (проиллюстрировано в  
15 Демонстрационном Примере 20), и вышеупомянутый полипептид был назван несфатин-1M30 (SEQ ID под номером 41). Открытие полипептида несфатин-1M30 означает, что если полипептид содержит часть, соответствующую несфатин-1M30 даже после того как полипептид несфатина или полипептид несфатина-1 был естественным или  
20 искусственным образом расщеплен или разложился, указанный полипептид сохраняет активность, уменьшающую потребление пищи и/или уменьшающую вес тела.

Более того, была исследована активность структуры сайта несфатина-1M30, содержащего 30 аминокислотных остатков, снижающая потребление пищи. Результаты  
25 показали, что несфатин-1M16, содержащий 16 аминокислотных остатков, являющийся пептидом, составной частью этого пептида, несфатин-1M14, содержащий 14 аминокислотных остатков, и несфатин-1M10, содержащий 10 аминокислотных остатков,  
30 имеют активность, снижающую потребление пищи и/или уменьшающую массу тела (Демонстрационный Пример 22).

При анализе последовательности несфатина-1, содержащего 82 аминокислотных  
35 остатка, приведенных в SEQ ID под номером 13, SEQ ID под номером 14 или в SEQ ID под номером 15 на предмет гомологии с аминокислотной последовательностью фактора, обладающего активностью контролировать потребление пищи, не было найдено  
40 высокомолекулярных последовательностей, и, поэтому было невозможно утверждать с использованием стандартных технологий, что эти несфатин-1M30, несфатин-1M16, несфатин -1M14 и несфатин -1M10M обладают активностью, снижающей потребление пищи и/или уменьшающей вес тела. Было также продемонстрировано, что эти несфатин-  
45 1M30, несфатин-1M16, несфатин -1M14 и несфатин -1M10M активны даже если они получены из неактивного человеческого несфатина или несфатина-1.

Таким образом, настоящее изобретение относится к полипептиду несфатина-1M30, приведенного в SEQ ID под номерами 39-41, полипептида несфатина-1M16, приведенного  
50 в SEQ ID под номерами 65, 68 или 71, полипептида несфатина-1M14, приведенного в SEQ

ID под номерами 66, 69 или 72, или полипептида несфатина-1M10M, приведенного в SEQ ID под номерами 68, 70 или 73. Как описано выше, указанные полипептид несфатина-1M30, полипептид несфатина-1M16, полипептид несфатина-1M14 и полипептид несфатина-1M10, обладают активностью, снижающей потребление пищи и/или уменьшающей вес тела. Также, аминокислотные последовательности человеческого полипептида несфатина-1M30 показаны в SEQ ID под номером 39. Также, полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID под номером 39, 40 или 41, за исключением полипептидов, содержащих аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID под номером 3, 6 или 9; 13, 14 или 15 входят в состав полипептида несфатина-1M30. В качестве примеров таких полипептидов могут служить такие полипептиды, которые естественным или искусственным образом расщепляются или разлагаются из полипептида несфатина или полипептида несфатина-1, и которые имеют последовательность, соответствующую несфатину-1M30.

Что касается Нуклеобиндина I(NUCB1), который имеет высокую гомологию с NEFA/несфатином в отношении аминокислотной последовательности и нуклеотидной последовательности гена и принадлежит к тому же семейству, была исследована способность NUCB1-M30, являющегося сайтом, соответствующим несфатину-1M30 NUCB1, обладать схожей активностью. Результаты показали, что NUCB1-M30 также обладает активностью, снижающей потребление пищи и/или уменьшающей массу тела (Демонстрационный Пример 23). При сравнении человеческого, крысиного и мышиного несфатинов было показано, что аминокислотные последовательности сайта, соответствующего несфатину-1 несфатина и NUCB1, имеют большое сходство, особенно сайта, соответствующего несфатину-1M30. Из всего вышесказанного остается неясным, обладает ли NUCB1-M16 содержащий 16 аминокислотных остатков NUCB1, NUCB1-M14 содержащий 14 аминокислотных остатков и NUCB1-M10M содержащий 10 аминокислотных остатков NUCB1, активностью, снижающей потребление пищи и/или уменьшающей вес тела, схожей с активностью полипептида несфатина-1M16, полипептида несфатина-1M14 и полипептида несфатина--1M10M.

Таким образом, настоящее изобретение касается полипептида NUCB1-M30, приведенного в SEQ ID под номерами 101-103, полипептида NUCB1-M16, приведенного в SEQ ID под номерами 107, 110 или 113, полипептида NUCB1-M14, приведенного в SEQ ID под номерами 108, 111 или 114, или полипептида NUCB1-M10M, приведенного в SEQ ID под номерами 109, 112 или 115. Вышеуказанные полипептиды NUCB1-M30, NUCB1-M16, NUCB1-M14 и NUCB1-M10 также обладают активностью, снижающей потребление пищи и/или уменьшающей вес тела, как описано выше.

Настоящее изобретение также касается полипептида, имеющего гомологию по крайней мере на 60% с любыми из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID под номером: 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115 и которые имеют активность, снижающую потребление пищи и/или уменьшающей вес тела. Гомология с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID под номером: 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115 составляет около 70% или выше, и более точно - 80% и выше. Таким образом, характерным примером является полипептид несфатина-1M30 животных (не человека). Например, в качестве полипептида, имеющего 60% гомологии или более с аминокислотной последовательностью человеческого полипептида несфатина-1M30 (SEQ ID под номером 39) и имеющего активность, снижающую потребление пищи и/или уменьшающей вес тела, может быть упомянут, и не только он - мышинный полипептид несфатина-1M30 (SEQ ID под номером 41) и крысиный полипептид несфатина-1M30 (SEQ ID под номером 40).

Среди полипептидов, содержащих аминокислотные последовательности, по крайней мере, на 60% гомологичные с любыми из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID под номерами: 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115, может быть проведена селекция полипептида, имеющего активность, снижающую потребление пищи и/или уменьшающей вес тела, путем введения тестируемому животному местно или системно полипептида или нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, и затем выделять полипептид, который обладает активностью, снижающей потребление пищи и/или уменьшающей вес тела. Другим способом селекция может быть осуществлена путем введения тестируемому животному местно или системно антитела против указанного полипептида или антисмыслового олигонуклеотида или молекулу иРНК, способную супрессировать экспрессию гена, кодирующего вышеупомянутый полипептид. К таким полипептидам относятся измененный несфатин-1M30, измененный несфатин-1M16, измененный несфатин-1M14, измененный несфатин-1M10M, измененный NUCB1-M30, измененный NUCB1-M16, измененный NUCB1-M14 и измененный NUCB1-M10M.

Более того, настоящее изобретение также касается полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, в которой некоторые аминокислотные остатки удалены, вставлены или замещены на любые из тех, что приведены в SEQ ID под номерами: 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115 и которые обладают активностью, снижающей потребление пищи и/или уменьшающей вес тела. Такие полипептиды могут быть получены путем замены одной или более аминокислот на аминокислоты, которые в химическом или структурном отношении схожи с теми, что приведены, например, в SEQ ID под номерами: 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 или 107-115. Специфические примеры

осуществления изобретения замен аминокислот, которые химически или структурно схожи, то есть замена высокогомологичных аминокислот, хорошо известны специалистам. Например, химически или структурно, глицин (Gly) похож на пролин (Pro), аланин (Ala) на валин (Val), лейцин (Leu) на изолейцин (Ile), глутамат (Glu) на глутамин (Gln), аспарат (Asp) на аспарагин (Asn), цистеин (Cys) на треонин (Thr), треонин на серин (Ser) и аланин, и лизин (Lys) на аргинин (Arg). Далее, в качестве альтернативного способа, специалисты могут с легкостью использовать аминокислотный матричный способ, который показывает, в какой мере может быть произведена замена аминокислот, как в таблице, описанной в (Wilbur, Molecular Biology and Evolution) (USA), 1985, Vol.2, pp.434-447), BLOSUM (Henikoff et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) (USA) 1992, Vol.89, pp.10915-10919, и с легкостью заменить аминокислоту, повышая тем самым свой уровень.

Кроме того, среди полипептидов, содержащих аминокислотные последовательности, в которых несколько аминокислотных остатков удалены, вставлены или заменены на любые из тех, что приведены в SEQ ID под номерами: 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115, можно выделить полипептид, который обладает активностью, снижающей потребление пищи и/или уменьшающей массу тела с помощью способа, аналогичного описанному выше способу выделения измененного несфатина. Здесь и далее, такой полипептид относится также к измененному несфатину -1M30.

Более того, настоящее изобретение также касается полипептида, имеющего гомологию по крайней мере на 60% с любыми из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID под номером: 3,6 и 9; или аминокислотными последовательностями, в которых одна или несколько аминокислот удалены, вставлены или заменены на любые из тех, что приведены в SEQ ID под номером: 3,6 и 9; и которые имеют активность, снижающую потребление пищи и/или уменьшающую вес тела. Так же как и вышеупомянутые измененные продукты, указанный полипептид относится к вышеупомянутому измененному несфатину-1M30 и т.д., предпочтительно, чтобы он имел гомологию 70% или более и даже более предпочтительно 80% и более с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID под номерами: 3, 6 или 9.

Как было сказано выше, настоящим изобретением продемонстрировано, что чтобы полипептид несфатин был функционально активен, необходимым и важным этапом является его процессинг протеазами, имеющимися в живом организме, такими как прогормон-конвертаза. С этой целью вышеупомянутый измененный несфатин предпочтительно должен быть полипептидом, который превращается в живом организме в несфатин-1, несфатин-1M30, несфатин-1M16, несфатин-1M14, несфатин-1M10M,

NUCB1-M30, NUCB1-M16, NUCB1-M14, или NUCB1-M10M (полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID под номером: 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 или 107-115), или другие измененные продукты. Для такого измененного несфатина важно, чтобы он содержал сайт узнавания в своей аминокислотной последовательности для расщепления ферментом, таким как протеаза, содержащаяся в живом организме. В качестве такого расщепляющего фермента может быть упомянута прогормон-конвертаза (proprotein convertase: PC), и в качестве такой прогормон-конвертазы может быть упомянут фурин (также известен как PC3), PC2, PACE4, PC4, PC6 (также известен как PC5) и LPC (также известный как PC7 или PC8) (The FASEB Journal, 1216, vol. 17, July 2003). Так как протеаза продуцирует несфатин-1 и др. на периферии или в желудочке мозга, тип протеазы может быть различен.

В виду различных причин, положение сайта узнавания для указанного расщепляющего фермента не ограничено специфически. Однако, основываясь на экспериментальных данных, полученных на мышинных несфатине-1, несфатине-2 несфатине-2/3 (Демонстрационный Пример 10), было показано, измененный несфатин, как правило, содержит как минимум один сайт узнавания для расщепляющего фермента в живом организме между 82 и 83 аминокислотными остатками (сайт узнавания для прогормон-конвертазы, продуцирующей несфатин-1) последовательности SEQ ID под номерами 3,6 или 9 и между 163 и 164 аминокислотными остатками (другой сайт узнавания для прогормон-конвертазы) последовательности SEQ ID под номерами 3,6 или 9, то есть в аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотным остаткам 82-162 SEQ ID под номерами 3,6 или 9, и что он не влияет на активность получающегося полипептида.

Кроме того, может быть получено подтверждение тому, что указанный измененный продукт имеет активность, снижающую потребление пищи и/или снижающую массу тела и превращается в активную форму в организме *in vivo*, как для селекции вышеуказанного измененного несфатина-1M30 и др. путем введения указанного полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, местно или системно тестируемому животному, и затем, выделяя полипептид, который будет имеет активность, снижающую потребление пищи и/или снижающую массу тела тестируемого животного.

Другим способом можно выделить полипептид путем введения антитела против указанного полипептида или антисмыслового олигонуклеотида или молекулы иРНК, которая может подавлять экспрессию гена, кодирующего указанный полипептид, местно или системно тестируемому животному, и затем выделяя полипептид, который будет

иметь активность, снижающую потребление пищи и/или снижающую массу тела тестируемого животного.

5 В настоящем изобретении полипептид несфатин-1, несфатин-1M30, несфатин-1M16, несфатин-1M14, несфатин-1M10M, NUCB1-M30, NUCB1-M16, NUCB1-M14, или NUCB1-M10M содержат, по крайней мере, одну дополнительную аминокислоту в N или C  
10 конце. Такие полипептиды несфатина содержат остаток метионина, остаток ацетильный или пироглутамат или подобные им, добавленный к N-концу аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID под номером 3, SEQ ID под номером 6 или SEQ ID под номером 9, и имеют последовательность-метку (обычно гистидиновая метка или FLAG-метка) в N- или C- конце. Полипептиды несфатина и др., имеющие такое  
15 строение, обладают тем преимуществом, что их можно легко очистить, используя хелаты металлов или антитела. Кроме того, когда несфатин продуцируется в живом организме прогормон-конвертазой, производится полипептид, в котором добавлен сайт узнавания для прогормон-конвертазы к C-концу несфатина-1, и такой полипептид также освещен в  
20 настоящем изобретении.

В настоящем изобретении полипептид несфатин-1, несфатин-1M30, несфатин-1M16, несфатин-1M14, несфатин-1M10M, NUCB1-M30, NUCB1-M16, NUCB1-M14, или NUCB1-M10M содержат, по крайней мере, один аминокислотный остаток, измененный на  
25 соединение или пептид. Такой полипептид несфатина включает помимо последовательности, данной в SEQ ID под номером 3, SEQ ID под номером 6 или SEQ ID под номером 9, полипептиды, полученные путем химического или ферментативного присоединения отличного от несфатина полипептида или флуоресцирующего вещества и др., известными способами (Hermanson et al., Bioconjugate Techniques, USA, 1996, issued by  
30 Academic Press), и содержит, например, такой в котором добавлены аминокислотная последовательность полученного из Aequorea флуоресцирующего белка или секреторная щелочная фосфатаза (так называемый слитый белок). Наличие таких слитых белков может быть легко определено; например, путем регистрации интенсивности флуоресценции  
35 слитого белка с полученным из Aequorea флуоресцирующего белка, или определяя интенсивность развития окраски, эмиссии или флуоресценции в результате реакции с указанным ферментом и его субстратом для слитого белка с секреторной щелочной фосфатазой. Активность, снижающую потребление пищи и/или снижающую массу тела для такого полипептида несфатина можно определить способом, описанном в  
40 Демонстрационном Примере 6 и др.

50 Настоящее изобретение касается фармацевтической композиции для снижения потребления пищи и/или снижения массы тела и эта композиция имеет в качестве

активного ингредиента содержит любой из полипептидов - несфатин, несфатин-1, несфатин-1M30, несфатин-1M16, несфатин-1M14, несфатин-1M10M, NUCB1-M30, NUCB1-M16, NUCB1-M14, или NUCB1-M10M, или измененные продукты (здесь и далее они будут все вместе называться «полипептид несфатина» и др.), или пептид, содержащий некоторые аминокислотные последовательности указанного несфатина. Пептид, содержащий некоторые аминокислотные последовательности указанного несфатина, относится к пептиду, в котором некоторые аминокислотные последовательности указанного полипептида удалены, но с сохраненной активностью, снижающей потребление пищи и/или снижающей вес тела.

<Фармацевтическая композиция для лечения или предотвращения болезни, при которой проблемой является повышенное потребление пищи и увеличение массы тела >

Настоящее изобретение касается фармацевтической композиции для лечения или предотвращения болезни, при которой проблемой является повышенное потребление пищи и увеличение массы тела, указанная композиция содержит в качестве активного ингредиента любой из вышеуказанных полипептидов несфатина и др. или пептида содержащего несколько аминокислотных последовательностей указанного полипептида.

Фармакологический эффект полипептида несфатина и др. настоящего изобретения продемонстрирован с помощью результатов полученных после введения полипептида несфатина в третий желудочек мозга крысы (Демонстрационные Примеры 6 и 25), введения полипептида несфатина-1 в третий желудочек мозга крысы (Демонстрационные Примеры 12, 13, 27 и 34), введения полипептида несфатина-1 внутривентрикулярно и подкожно мышам (Демонстрационные Примеры 18 и 19), введения полипептида несфатина-1M30 внутривентрикулярно и подкожно мышам (Демонстрационный Пример 20). Фармакологический эффект на моделях животных с патологией проиллюстрирован с помощью результатов полученных после введения полипептида несфатина-1 в третий желудочек мозга крысы с резистентностью к лептину, то есть крысам Zucker (fa/fa) (Демонстрационный Пример 17), и проиллюстрирован фармакологический эффект на патологию, связанную с резистентностью к лептину, которая также является проблемой при ожирении человека. Далее, было продемонстрировано фармакологически в экспериментах по введению желтым мышам Агути (Демонстрационный Пример 18). Проиллюстрированные данные показали, что полипептид несфатина и др. может быть использован в качестве фармацевтической композиции для лечения или предотвращения болезни, при которой проблемой является повышенное потребление пищи и увеличение массы тела.

К болезням, при которых проблемой является повышенное потребление пищи и

увеличение массы тела, относятся, например, ожирение, диабет, гипертензия, гиперлипидемия, гиперурицемия, ожирение печени, заболевания сердца, болезни мозгового кровообращения, синдром апное во сне, ортопедические заболевания, нарушения менструального цикла, злокачественные опухоли.

Ожирение включает также липоматоз, патологическое состояние, требующее снижения массы тела, и проблемы со здоровьем связаны с ожирением или усложняются ожирением. Ортопедические заболевания включают остеоартрит, связанный с излишним весом, жировые расстройства (спондилозные деформации), боли в нижней части спины (острая боль в спине) и др. Также злокачественные опухоли включают рак груди, рак матки, рак кишки, рак почки, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак печени и рак желчного пузыря.

Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может содержать любые фармацевтически допустимые добавки. Формулировки использования фармацевтических допустимых добавок могут быть приготовлены способом, описанным в "Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, University of the Sciences in Philadelphia, Williams & Wilkins, издана 15 декабря, 2000". Одна доза такой фармацевтической композиции представляется как жидкость, приготовленная путем растворения, суспендирования или эмульсирования их в водном или масляном растворе. Такие растворы включают, например, дистиллированную воду, физиологический раствор и др. для инъекций в качестве водной жидкости, и с добавлением осморегуляторного агента (например, D-глюкозы, D-сорбитола, D-маннитола или хлорида натрия), подходящего солюбилизирующего агента, такого, как спирты (например, этанол), полиалкоголи (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионизированных сурфактантов (например, полисорбат 80, полиоксиэтиленированное гидрогенированное касторовое масло 50) и прочее похожее может быть использовано. Кроме того, в качестве растворителя может быть использован масляный раствор, и указанный масляный раствор может включать масло кунжута, соевое масло и др., а в качестве солюбилизирующего агента – бензилбензоат и бензиловый спирт и др. в комбинации. В таких жидкостях могут использоваться подходящие буферы (такие как фосфатный буфер или ацетатный буфер), смягчающие агенты (такие как бензалкония хлорид и гидрохлорид прокаина), стабилизаторы (такие как сывороточный альбумин человека и полиэтиленгликоль), консерванты (такие как аскорбиновая кислота, эриторбиновая кислота, соли), красители (такие как медный хлорофилл, бета-каротин, Red No.2, и Blue No.1), антисептики (такие как эфир параоксибензоата, фенол, хлорид бензетония, бензалкония хлорид), загустители (такие как гидрокипропиловая целлюлоза, карбоксиметиловая целлюлоза, соли),



стабилизаторы (такие как сывороточный альбумин человека, маннитол, сорбитол) и корригенты (такие как ментол или цитрусовые экстракты). Другая доза такой фармацевтической композиции (с целью унифицирования представления о  
5 вышеизложенных нескольких «фармацевтических композиций») представлена твердыми формами, такими как порошки, таблетки, гранулы, капсулы, пилюли, суппозитории и ромбовидные таблетки. В случае твердых форм, назначаемых как препараты для перорального применения, в качестве добавок используют наполнители (такие как  
10 кристаллы целлюлозы, лактозы или сахара), смазочные МА

териалы (такие как стеарат магния и тальк), связующие вещества (такие как гидроксипропиловая целлюлоза, гидроксипропиловая метиловая целлюлоза и макрогель),  
15 разрыхлители (такие как сахар и кальций, связанный с карбоксиметилцеллюлозой) и тому подобное. Также, если необходимо, могут использоваться антисептики (такие как бензиловый спирт, хлорбутанол, метилпараоксибензоат и пропилпараоксибензоат), антиоксиданты, красители, подсластители и тому подобное. Более того, существует другая форма фармацевтической композиции для нанесения на слизистую, и для этой формы с целью увеличения абсорбирующей способности и остаточной намагниченности, дополнительно прибавляют вещества для повышения клейкости, загустители (такие как  
25 муцин, агар, желатин, пектин, каррагенан, алгинат натрия, смолу рожкового дерева, ксантановую смолу, трагакантовую камедь, гуммиарабик, хитозан, пуллулан, восковый сахар, сукралфат, целлюлозу и ее производные (такие как гидроксипропилметиловая целлюлоза, поиглицериновые эфиры жирных кислот, соли и сополимеры акрил(мет)акриловых алкилов. Однако, лекарственные формы фармацевтической композиции и растворители, и вспомогательные вещества, которые должны доставляться  
30 в живой организм, не ограничиваются перечисленными выше, и специалист сам может их выбрать.

С целью улучшения условий протекания болезни, фармацевтическая композиция может назначаться перорально или парентерально. В случае перорального введения  
40 подходят такие лекарственные формы, как порошки, таблетки, гранулы, капсулы, пилюли, жидкости, сиропы, эмульсии или суспензии, эликсиры. В случае парентерального введения подходят такие формы, как трансназальные агенты, жидкости, суспензии, твердые формы. Для парентерального введения могут использоваться и другие составы  
45 для инъекций, инъекции могут быть подкожными, внутривенными, для закапывания, внутримышечными, внутрижелудочковыми, внутрибрюшинными и т.д. Другими составами для парентерального применения могут быть препараты для введения через  
50 слизистую, отличные от суппозиториев, сублингвальные таблетки, трансдермальные

препараты, назальные препараты и тому подобное. Более того, может быть осуществлено локальное интраваскулярное введение, в примерах осуществления изобретения, они наносятся или вводятся в эндопротез сосуда или анти-интраваскулярно локально на закупорку кровеносного сосуда.

Дозы вышеупомянутой фармацевтической композиции могут варьироваться в зависимости от возраста, пола, массы тела пациента, условий, терапевтического эффекта, режима применения, периода лечения или типов активных ингредиентов, содержащихся в вышеупомянутой фармацевтической композиции, но одна доза обычно колеблется в пределах 0,1-500мг для взрослого, и предпочтительнее 0,5-20мг. Доза может варьироваться в зависимости от разных условий, и таким образом, даже меньшая доза чем вышеуказанная, может быть достаточной иногда, а иногда требуется доза выше, чем вышеуказанная.

Кроме того, в примерах осуществления изобретения в генной терапии может использоваться ген, кодирующий полипептид несфатин или полипептид несфатин-1. Такая генная терапия, например, может достигнуть терапевтического эффекта за счет введения в живой организм вышеуказанного гена. Техника введения вышеуказанного гена, кодирующего белок, обеспечивающий терапевтический эффект и позволяющая этому гену экспрессироваться чтобы излечить болезнь, известна. (Kaneda, Folia Pharmacologica Japonica, 2001, Vol. 117, pp. 299-306).

Более того, можно осуществить лечение полипептидом несфатина или полипептидом несфатина-1, продуцируемыми трансформантом, в форме которого хозяину вводится ген, кодирующий белок, обеспечивающий терапевтический эффект и позволяющая этому гену экспрессировать указанный полипептид.

<Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, обладающий способностью снижать потребление пищи и/или уменьшать вес тела>

Настоящее изобретение касается также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей любой из вышеперечисленных полипептидов несфатина. В качестве молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей любой из вышеперечисленных полипептидов несфатина, может быть названа молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 1), содержащая нуклеотидную последовательность гена, кодирующего человеческий предшественник полипептида несфатина, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 4), содержащая нуклеотидную последовательность гена, кодирующего мышинный предшественник полипептида несфатина, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 7) содержащая нуклеотидную последовательность гена, кодирующего крысиный предшественник полипептида несфатина, молекула нуклеиновой

кислоты (SEQ ID под номером 10), содержащая нуклеотидную последовательность гена, кодирующего зрелый полипептид несфатина, в котором часть сигнального пептида удалена, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 11), содержащая нуклеотидную последовательность гена, кодирующего зрелый мышинный полипептид несфатина, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 12), содержащая нуклеотидную последовательность гена, кодирующего зрелый крысиный полипептид несфатина и тому подобное.

В качестве молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеперечисленные полипептиды несфатина-1, может быть названа молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 18), кодирующая человеческий полипептид несфатина-1, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 19), кодирующая мышинный полипептид несфатина-1, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 20), кодирующая крысиный полипептид несфатина-1 и тому подобное.

В качестве молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеперечисленные полипептиды несфатина-1M30, может быть названа молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 44), кодирующая человеческий полипептид несфатина-1M30, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 46), кодирующая мышинный полипептид несфатина-1M30, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 45), кодирующая крысиный полипептид несфатина-1M30 и тому подобное.

В качестве молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеперечисленные полипептиды несфатина-1M16, может быть названа молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 74), кодирующая человеческий полипептид несфатина-1M16, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 80), кодирующая мышинный полипептид несфатина-1M30, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 77), кодирующая крысиный полипептид несфатина-1M16 и тому подобное.

В качестве молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеперечисленные полипептиды несфатина-1M14, может быть названа молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 75), кодирующая человеческий полипептид несфатина-1M14, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 81), кодирующая мышинный полипептид несфатина-1M14, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 78), кодирующая крысиный полипептид несфатина-1M16 и тому подобное.

В качестве молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеперечисленные полипептиды несфатина-1M10M, может быть названа молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 76), кодирующая человеческий полипептид несфатина-1M10M, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 82), кодирующая мышинный

полипептид несфатина-1M10M, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 79), кодирующая крысиный полипептид несфатина-1M16 и тому подобное.

5 В качестве молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеперечисленные полипептиды NUCB1-M30, может быть названа молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 104), кодирующая человеческий полипептид NUCB1-M30, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 106), кодирующая мышинный полипептид  
10 NUCB1-M30, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 105), кодирующая крысиный полипептид NUCB1-M30 и тому подобное.

В качестве молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеперечисленные полипептиды NUCB1-M16, может быть названа молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 116), кодирующая человеческий полипептид NUCB1-M16, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 122), кодирующая мышинный полипептид  
15 NUCB1-M16, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 119), кодирующая крысиный полипептид NUCB1-M16 и тому подобное.

В качестве молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеперечисленные полипептиды NUCB1-M14, может быть названа молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 117), кодирующая человеческий полипептид NUCB1-M14, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 123), кодирующая мышинный полипептид  
20 NUCB1-M14, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 120), кодирующая крысиный полипептид NUCB1-M14 и тому подобное.

В качестве молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеперечисленные полипептиды NUCB1-M10M, может быть названа молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 118), кодирующая человеческий полипептид NUCB1-M10M, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 124), кодирующая мышинный полипептид  
25 NUCB1-M10M, молекула нуклеиновой кислоты (SEQ ID под номером 121), кодирующая крысиный полипептид NUCB1-M10M и тому подобное.

В настоящее изобретение также входят полипептиды несфатина, в которых по  
30 крайней мере одна аминокислота добавлена к N или C концу, а также полипептиды несфатина, в которых по крайней мере одна аминокислота изменена на некую структуру или пептид. В качестве молекул нуклеиновых кислот, кодирующих такие полипептиды  
35 несфатина, в случае полипептида несфатина, например, может быть получена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, в котором добавлен дополнительный полипептид к N-концу последовательности, приведенной в SEQ ID под номером 3, в SEQ ID под номером 6 от SEQ ID под номером 9 путем добавления нуклеотидной  
40 последовательности имеющей нуклеотидную последовательность ATG и кодон,  
45  
50

5 кодирующий желаемую аминокислотную последовательность, за 5'-конец последовательности, приведенной в SEQ ID под номером 10, в SEQ ID под номером 11 or  
10 SEQ ID под номером 12. Также, в данном изобретении отображены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, в котором последовательность для сайта узнавания (расщепления) для протеаз, таких как прогормональная протеаза, добавлена к N и/или the C-концу аминокислотной последовательности полипептида несфатина и др. и не только они.

15 Помимо этого, в изобретение входят молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, в которой последовательность гена, кодирующего белок, полученный из флуоресцирующего *Aequorea* или секреторной щелочной фосфатазы, добавлена к 5'- или 3'-концу последовательности гена, кодирующего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID под номером 3, в SEQ ID под номером 6 или SEQ ID под номером 9 в такой форме, в  
20 которой аминокислотная последовательность каждого белка может быть транслирована.

25 К молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют вышеуказанный измененный несфатин и др., относятся молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по крайней мере на 60% гомологичную с любой из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID под номерами: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 или 107-115 и имеющие активность, снижающую потребление пищи и/или снижающую вес тела, и предпочтительно указанная  
30 гомология составляет 70% или выше и даже более предпочтительно 80% или выше.

35 В качестве типичного примера может быть упомянут, например, полипептид несфатина-1M30 из образцов ткани животных, не человека. Например, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по крайней мере, на 60% или более гомологичную с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID под номером 39 человеческого полипептида несфатина -1M30 и др. и имеющего активность, снижающую потребление пищи и/или  
40 снижающую вес тела, включают нуклеиновые кислоты (SEQ ID под номером 46), кодирующие мышинный полипептид несфатина -1M30, нуклеиновые кислоты (SEQ ID под номером 45), кодирующие крысиный полипептид несфатина, нуклеиновые кислоты (SEQ ID под номером 104), кодирующие человеческий полипептид NUCB1-M30, нуклеиновые кислоты (SEQ ID под номером 106), кодирующие мышинный полипептид NUCB1-M30, нуклеиновые кислоты (SEQ ID под номером 105), кодирующие крысиный полипептид NUCB1-M30, и тому подобное, и не только эти нуклеиновые кислоты.

50 Также, нуклеиновые кислоты, кодирующие вышеуказанные измененные несфатин

и др. включают молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой некоторые из аминокислот удалены, вставлены или замещены на любую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID под номерами: 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 или 107-115 и который имеет активность, снижающую потребление пищи и/или снижающую вес тела.

Более того, настоящее изобретение касается также нуклеиновых кислот, которые гибридизуются с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID под номерами: 4, 7, 11, 12, 18, 19, 20, 44-46, 74-82, 104-106 или 116-124, или с частью этих последовательностей при определенных условиях, которые кодируют полипептид, имеющий активность, снижающую потребление пищи и/или снижающую вес тела.

Такие нуклеиновые кислоты могут быть получены способом гибридизации с использованием нуклеотидных последовательностей, приведенных в SEQ ID под номерами: 4, 7, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 44-46, 74-82, 104-106 или 116-124, или их частей. Специально для этого создана культура, в которой плазмидный вектор или фаговый вектор содержат вставленные фрагменты кДНК или геномной ДНК, полученные от любого вида организма и внесены в хозяина, например, *Escherichia coli* (*E. coli*), и эта культура культивируется на плашках с агаром, с добавлением подходящего для селекции препарата. Затем получившийся рекомбинантный клон *E. coli* или клон фага переносится на нитроцеллюлозную мембрану и т.д. и затем клетки или фаг лизируются в щелочной среде или среде, содержащей сурфактант таким образом, чтобы иммобилизовать ДНК, содержащуюся в них на мембране. К мембране добавляется для реакции подходящий для гибридизации раствор при подходящей температуре, при которой растворяется полученная с помощью метки  $^{32}\text{P}$  линейаризованная проба ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID под номерами: 4, 7, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 44-46, 74-82, 104-106 или 116-124, или ее часть. После реакции мембрана промывается  $\times 2$  SSC для удаления избытка пробы, затем промывается в строго определенных условиях - с помощью  $\times 0.1$  SSC при  $65^\circ\text{C}$ , или с помощью  $\times 0.5$  SSC при  $65^\circ\text{C}$ , и затем мембрана подвергается обработке рентгеновскими лучами в темноте для получения изображения. После облучения рентгеновскими лучами в темноте и холоде в течение нескольких часов и до нескольких дней для проявления пятен, *E. coli* или клоны фага локализируются в местах, соответствующих тем оригинальным, что были на плашке, с которой производился перенос на мембрану, харвестированы и культивируются, и анализируются последовательности генов, которые были вставлены в вектор для получения генов, высокоомологичных с генами несфатина, несфатина-1 или несфатина-1M30. Также, благодаря полученным с помощью гибридизации ДНК или участка генома с

использованием последовательности или идентификации окружающих последовательностей способом удлинения праймеров клонам, может быть расшифрована структура гена, кодирующего белок, с целью получения молекул нуклеиновых кислот, 5 гомологичных несфатину, несфатину-1, несфатину-1M30, несфатину-1M16, несфатину-1M14, несфатину-1M10M, NUCB1-M30, NUCB1-M16, NUCB1-M14 или NUCB1-M10M. Более того, среди молекул нуклеиновых кислот, которые гибридизуются при строго 10 определенных условиях с нуклеотидными последовательностями, приведенными в SEQ ID под номерами: 4, 7, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 44-46, 74-82, 104-106 или 116-124 или с частями указанных нуклеотидных последовательностей, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, обладающий активностью, снижающей потребление пищи 15 и/или снижающей массу тела могут быть выделены путем введения локально или системно в организм тестируемого животного полипептида, кодируемого указанными нуклеиновыми кислотами, или самих указанных выше нуклеиновых кислот и путем 20 обнаружения молекул нуклеиновых кислот, которые снижают потребление пищи и/или снижают вес тела. Либо с помощью другого способа можно ввести антитело, которое связывается с полипептидом, кодируемым указанными нуклеиновыми кислотами или 25 молекулу антисмыслового олигонуклеотида или молекулу иРНК, которая может снижать экспрессию гена, кодируемого вышеуказанными молекулами нуклеиновых кислот в организм экспериментального животного системно или локально, и затем выделить молекулы нуклеиновых кислот, которые могут снижать потребление пищи и/или снижать 30 массу тела экспериментального животного.

#### <Вектор>

Настоящее изобретение касается также вектора, содержащего молекулы 35 нуклеиновых кислот, кодирующих любой из полипептидов несфатина и др. Путем создания рекомбинанта, являющегося клеткой хозяина, такого как микроорганизм с вставленным геном несфатина и др., с использованием вектора, содержащего молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих такой несфатин и др., указанный ген может быть 40 хорошо сохранен и реплицирован. Молекулы нуклеиновых кислот вышеупомянутого гена, кодирующего полипептид несфатина и др. интегрируются в вектор, способный реплицироваться в клетке хозяина и могут быть получены в большом количестве 45 благодаря культивированию рекомбинантных клеток в подходящей среде, благодаря росту клеток или благодаря амплификации копий гена, введенного в клетку.

Вышеупомянутые молекулы нуклеиновых кислот могут реально связываться под контролем регуляторных молекул нуклеиновых кислот, которые контролируют 50 экспрессию вышеупомянутых молекул нуклеиновых кислот. В качестве молекул

нуклеиновых кислот, которые контролируют экспрессию вышеупомянутых молекул нуклеиновых кислот, можно упомянуть молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих регуляторную последовательность для экспрессии введенного в клетку хозяина гена, такого как промоутерная последовательность или энхансерная последовательность, которые могут быть выделены специалистом. С помощью интегрирования молекул нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид несфатина и др. под контролем молекул нуклеиновых кислот, кодирующих такую регуляторную последовательность, полипептид несфатина и др. можно синтезировать в больших количествах в любой клетке-хозяине (таких как клетки микробов, клетки млекопитающих, насекомых и т.д.)

Также в качестве вектора, используемого в данном изобретении, можно предложить вектор, который имеет промотор спереди от гена, который необходимо экспрессировать, и имеет сайт полиаденилирования, и вдобавок последовательность терминальной транскрипции. В качестве такого вектора для позвоночных может быть упомянут pSV2dhfr (Mol. Cell. Biol., 854, 1981) имеющий ранний промотор SV40 pсDNA3.1(+) (Invitrogen Corp.), и pCAGGS (Gene 108:193-200, 1991) и тому подобные, и не только эти, но и другие, выбираемые специалистом. Такой вектор может быть также введен в клетку млекопитающих для лечения пониженного потребления пищи и/или сниженного массы тела.

При использовании в качестве клетки хозяина *E. coli*, можно взять pBR322 и более подходящие векторы, и также различные штаммы микробов и различные векторы. В качестве промоторов могут быть упомянуты такие, как лактозный промотор *E. coli* (*lac*), *trp* *E. coli* и прочие. Вышеупомянутые промоторы уже хорошо охарактеризованы и известны специалистам и могут быть получены синтетически или выделены из известных плазмид.

Демонстрационный Пример 5 в качестве специального примера демонстрирует, что путем введения молекул нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид несфатина, в вектор для создания рекомбинанта *E. coli*, можно получить полипептид несфатина, сохраняющий активность, снижающую потребление пищи и/или снижающую вес тела. Кроме того, Демонстрационный Пример 16 демонстрирует, что можно получить полипептид несфатина-1 с помощью рекомбинантных генных технологий, путем представления аминокислотной последовательности из SEQ ID под номерами с 13 по 15 в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST) и др., для того чтобы ее экспрессировать и затем очистить путем адсорбции на носителе с иммобилизированным глутатионом и десорбции с него, с последующим отщеплением глутатион-S-трансферазы.

Терапевтический эффект, снижающий потребление пищи и/или снижающий массу



тела может быть получен путем введения вектора настоящего изобретения в клетки млекопитающих с использованием технологий генной терапии. Известен способ лечения заболеваний, при котором в клетку млекопитающего вводят ген, кодирующий белок, обеспечивающий терапевтический эффект, то есть полипептид несфатина и др., и затем его экспрессируют (Kaneko, Folia Pharmacologica Japonica, issued in 2001, Vol. 117, pp. 299-306).

<Трансформант>

Настоящее изобретение касается также трансформанта, содержащего молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих любой из вышеназванных полипептидов несфатина и прочих. Такой трансформант может быть получен путем введения гена, кодирующего упомянутый полипептид в клетку хозяина и его трансформации. Способами трансформации могут служить биологические способы, физические способы, химические способы и другие. В качестве биологических способов могут быть упомянуты способы с использованием вирусных векторов, специфических, клеточного синтеза (вирус Sendai (HVJ), полиэтиленгликоль (PEG), электрическое слияние клеток, слияние микронуклеарных клеток (хромосомный перенос) и прочие. В качестве физических способов используют способ микроинъекций, способ электропорации, способ с использованием генной пушки. В качестве химических способов применяются способ преципитации фосфатом кальция, липосомальный способ, способ с использованием DEAE-декстрана, способ с использованием протопластов, способ с использованием теней эритроцитов, способ с использованием теней мембран эритроцитов, микрокапсулярный способ, которые могут быть выбраны и осуществлены специалистами, как следует. Полученный трансформант культивируется обычным способом и так синтезируется полипептид несфатина и др. В качестве среды для культивирования используются самые различные в зависимости от соответствующего типа клеток-хозяев, от условий, подходящих для роста клеток-хозяев.

В этой области науки известны различные способы экспрессии интересующего белка в клетках эукариот. Например, система для экспрессии в дрожжах описана в японской нерассмотренной патентной заявке (Kokai) № 57-159489 "The expression of protein in yeast", система для экспрессии в клетках растений описана в "An improved method and equipment for introducing a biological substance into a living cell" издании Патента №. 2517813 или в японской нерассмотренной патентной заявке "A method of introducing a gene into a plant cell and a plant cell-treatment equipment for gene introduction", (Kokai) № 2003-274953, система для экспрессии в клетках насекомых описана в японской нерассмотренной патентной заявке (Kokai) № 60-37988 "A method of producing a

рекомбинантного baculovirus expression vector" и а система для экспрессии в клетках  
млекопитающих описана в японской нерассмотренной патентной заявке (Kokai) № 2-  
171198 "Improvement in eukaryotic expression", и еще существует множество систем в  
5 дополнение к этим.

В качестве клетки-хозяина для трансформантов могут быть использованы как  
клетки прокариот, так и клетки эукариот. К эукариотическим клеткам-хозяинам относятся  
10 клетки позвоночных, дрожжей, растений, насекомых и прочих. В качестве клеток  
растений могут быть упомянуты ткани частей дикотиледонов и монокотиледонов, клетки,  
изолированные из ткани, клетки, полученные из наплывов, образованных тканями и  
15 прочие. К клеткам позвоночных относятся, например, клетки CHO, клетки 293Т, клетки  
COS7 и другие. К прокариотическим клеткам относятся, например, E. coli, Bacillus subtilis,  
Streptomyces, и часто используется штамм E. coli K12. При использовании клеток  
позвоночных в качестве клетки-хозяина, полученный трансформант может быть введен  
20 млекопитающему для клеточной терапии с целью снижения потребления пищи и/или  
снижения массы тела. В качестве таких трансформантов предпочтительны те, которые  
созданы для экспрессии гена, кодирующего полипептид несфатина и др. При применении  
указанных трансформантов предпочтительнее назначать их растворенными в различных  
25 буферах, физиологических растворах и др. (японская нерассмотренная патентная заявка  
(Kokai) № 2003-342201)

#### <Антитело>

Настоящее изобретение касается также антитела, которое связывается с любым из  
30 вышеперечисленных полипептидов несфатина и др. Такое антитело может быть получено  
способами, хорошо известными специалистам. Антитело в настоящем изобретении может  
быть поликлональным или моноклональным (Milstein et al., Nature (England), issued on  
35 October 6, 1983, Vol. 305, No. 5934, pp. 537-540). Например, поликлональное антитело  
против полипептида несфатина, полипептида несфатина-1, полипептида несфатина-1M30,  
полипептида несфатина-1M16, полипептида несфатина-1M14, полипептида несфатина-  
40 1M10M, NUCB1-M30, NUCB1-M16, NUCB1-M14 или NUCB1-M10M может быть  
получено из сыворотки млекопитающего, сенсibilизированного антигеном. Более того, в  
другом примере, антитело может быть получено из сыворотки млекопитающего,  
сенсibilизированного пептидом, содержащим последовательность с частью  
45 последовательности полипептида несфатина и др. В более конкретном примере, как  
показано в Демонстрационном Примере 3, антитело, связывающее полипептид несфатина  
и др., может быть получено путем связывания пептида (SEQ ID под номером 24),  
50 имеющего последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам с 141 по 152

SEQ ID под номером 8, связывается с белком-переносчиком и с использованием антигена для иммунизации животного. При введении животному это антитело проявляет активность, увеличивающую потребление пищи и увеличивающую массу тела этого животного (Демонстрационный Пример 7). И в другом примере, пептид (SEQ ID под номером 32), имеющий последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам с 48 по 62 SEQ ID под номером 8, связывается с белком-переносчиком, который используется в качестве антигена для иммунизации животного таким образом, чтобы продуцировались антитела, связывающиеся с полипептидом несфатина и др. (Демонстрационный Пример 10). Полипептид, приведенный в SEQ ID под номером 32 содержит аминокислотные последовательности, общие для полипептида несфатина, полипептида несфатина-1 и несфатина-1M30 человека, мыши или крысы, и, поэтому, полученные антитела связываются со всеми этими полипептидами. При введении животному это антитело проявляет активность, увеличивающую потребление пищи и увеличивающую массу тела этого животного (Демонстрационный Пример 14). В дополнение к ним, можно создать антитело с использованием пептида из раскрытой последовательности несфатина-1 в качестве антигена.

Моноклональные антитела против вышеупомянутого полипептида несфатина могут быть приготовлены из забранных иммунных клеток у иммунизированного антигеном животного, затем необходимо подвергнуть эти клетки клеточному синтезу с клетками миеломы и собрать антитела из культуры.

Такие антитела могут быть мечеными при необходимости, и могут использоваться для детекции полипептида несфатина и др. Кроме того, можно вместо самого антитела пометить вещество, которое специфически связывается с этим антителом, такое как белок А и белок G, и проводить непрямую детекцию. В качестве специфических способов детекции может быть упомянут, например, способ ELISA.

Для получения антигена с целью дальнейшего получения антитела, в настоящем изобретении интегрируются, например, ген, кодирующий полипептид несфатина, полипептида несфатина-1, полипептида несфатина-1M30, полипептида несфатина-1M16, полипептида несфатина-1M14, полипептида несфатина-1M10M, NUCB1-M30, NUCB1-M16, NUCB1-M14 или NUCB1-M10M, упомянутые выше, или измененные продукты, или их части в векторе экспрессии, вводят вектор экспрессии в подходящую клетку-хозяин для создания трансформанта, культивируют этот трансформант для экспрессии рекомбинантного белка и очищают экспрессированный рекомбинантный белок в культуре или клеточном супернатанте. В другом случае, можно химически синтезировать олигопептид, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую

упомянутым геном или часть аминокислотной последовательности, кодируемой полноразмерной кДНК и использовать его в качестве иммуногена. В качестве животных для иммунизации используют мышей, крыс, кроликов, коз, лошадей, хомяков и прочих, по усмотрению специалиста.

<Вещество, понижающее активность или экспрессию полипептида, обладающего способностью снижать потребление пищи и/или снижать контроль над весом тела>

При исследовании настоящего изобретения, когда приготовили и ввели в мозг животному антитело против полипептида несфатина, полипептида несфатина-1 и полипептида несфатина-1M30, наблюдалось повышение количества потребляемой животным пищи (Демонстрационные Примеры 7 и 14). Также увеличение потребления пищи и увеличение массы тела животного наблюдалось при введении в мозг животного антисмысловой РНК (олигонуклеотида), подавляющего экспрессию несфатина (Демонстрационный Пример 15). Это означает, что полипептид несфатина, полипептид несфатина-1 и полипептид несфатина-1M30 действительно задействованы в мозге в контроле над потреблением пищи и/или в контроле над весом тела. Более того, повышение концентрации полипептида несфатина, полипептида несфатина-1 и полипептида несфатина-1M30 в периферической крови и мозге вызывает снижение потребления пищи и/или снижение массы тела, и вещество, которое подавляет активность или экспрессию указанного полипептида, обладает способностью повышать потребление пищи и/или повышать вес тела, и, следовательно, полипептид несфатина, полипептид несфатина-1 и /или полипептид несфатина-1M30 являются центральными факторами, отвечающими за контроль потребления пищи и/или контроль над весом тела. Кроме того, вещество, ингибирующее активность или экспрессию полипептида несфатина, полипептида несфатина-1 и /или полипептида несфатина-1M30, можно использовать в лечении, диагностике и/или поиске терапевтических препаратов для подавления потребления пищи и/или уменьшения массы тела при таких заболеваниях и состояниях, при которых снижение потребления пищи и уменьшение массы тела является проблемой, это такие заболевания, как цибофобия, функциональная диспепсия, рак, болезни органов дыхания, пониженная функция гипофиза, щитовидной железы, коры надпочечников и т.д., послеоперационный или чрезмерный стресс и тому подобное.

Таким образом, настоящее изобретение касается вещества, ингибирующего активность или синтез полипептида несфатина-1, полипептида несфатина-1M30, полипептида несфатина-1M16, полипептида несфатина-1M14, полипептида несфатина-1M10M, NUCB1-M30, NUCB1-M16, NUCB1-M14 или NUCB1-M10M. Более конкретно оно касается вещества, обладающего активностью, увеличивающей потребление пищи

и/или увеличивающей вес тела. Вещества, снижающие активность полипептида несфатина и др. делятся на те, что связываются с полипептидом несфатина и др. и те, что не связываются с указанными полипептидами. Примером первого является антитело против полипептида несфатина и др., и в качестве такого антитела используется описанное выше антитело. Примером последнего является доминантный негативный полипептид против полипептида несфатина и др. «Доминантный негативный» означает мутант, который главным образом действует на дикий тип как качественно так и количественно так, что ингибирует функциональную активность дикого типа. «Доминантный негативный» белок может быть приготовлен путем удаления или конвертирования части аминокислотных остатков дикого типа.

Настоящее изобретение касается также вещества, снижающего экспрессию гена, кодирующего полипептид несфатина, полипептид несфатина-1, полипептид несфатина-1M30, полипептид несфатина-1M16, полипептид несфатина-1M14, полипептид несфатина-1M10M, NUCB1-M30, NUCB1-M16, NUCB1-M14 или NUCB1-M10M. К таким веществам относятся, например, антисмысловые олигонуклеотиды, молекулы иРНК и тому подобные. В используемом здесь значении полипептид несфатина и др. имеет отношение к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит полную нуклеотидную последовательность или часть нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид несфатина и др. как смежные или несмежные субъединицы. Кроме того, экспрессия гена включает в себя этап транскрипции гена, кодирующего полипептид несфатина и др., этап стабилизации транскрибируемой молекулы нуклеиновой кислоты и этап синтеза полипептида несфатина и др. путем трансляции с транскрипта молекулы нуклеиновой кислоты. Таким образом, подавление экспрессии гена имеет отношение к подавлению осуществления любой из стадий транскрипции с гена, кодирующего полипептид несфатина и др.; стабилизации; и трансляции.

Вышеупомянутые антисмысловые нуклеотиды могут быть сконструированы с помощью, например, последовательности гена, кодирующего полипептид несфатина. В качестве такого антисмыслового олигонуклеотида может быть упомянут антисмысловый олигонуклеотид морфолинового типа, имеющий структуру SEQ ID под номером 31. Как показано в Демонстрационном Примере 15, при введении животным указанный антисмысловый олигонуклеотид обладает эффектом, усиливающим потребление пищи и увеличивающим вес тела. При создании антисмысловых олигонуклеотидов используются различные модификации или связывающие форматы с целью избегания деструкции клетки, и специалисты могут подобрать структуру подходящего антисмыслового олигонуклеотида. (Curreck et al., European Journal of Biochemistry) (UK), 2003, Vol.270,

pp.1628-486). В качестве структуры может быть приведена в качестве иллюстрации природная форма (D-oligo), фосфоротиоатный тип (S-oligo), метилфосфонатный тип (M-oligo), фосфоамидатный тип (A-oligo), 2'-O-метильный тип (D-oligo), морфолидатный тип (Mo-oligo), полиамидные нуклеиновые кислоты и прочее подобное. Используемая  
5 длина составляет от 10 до 70 пар оснований, предпочтительнее от 15 до 30 пар оснований.

Интерференция РНК (РНКi) имеет отношение к феномену, в котором двойная  
10 закрученная спираль РНК 21-23 остатков расплетает РНК-мишень, содержащую такую же последовательность и поэтому сильно снижает ее экспрессию. Таким образом, РНК, содержащая в виде двойной закрученной спирали и имеющая такую же нуклеотидную  
15 последовательность, как и мРНК гена, кодирующего полипептид несфатина и др. может быть использована для подавления экспрессии гена, кодирующего полипептид несфатина и др. С целью обнаружения эффекта РНКi предпочтительнее использовать РНК в виде двойной закрученной спирали, имеющей в последовательности по крайней мере 20  
20 смежных нуклеотидов. Структура двойной закрученной спирали может состоять из различных цепей, а может и из двух цепей, образованных из петель одной РНК. Путем добавления довеска из двух пар оснований к 3'-концам каждой цепи, эффект снижения  
25 экспрессии гена может быть увеличен. Специалисты могут подобрать оптимальную иРНК для снижения генной экспрессии в зависимости от ее длины и структуры и различными способами ее модифицируя.

Вышеупомянутые молекулы антисмысловых нуклеотидов и молекулы иРНК могут  
30 быть синтезированы путем интегрирования молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности вышеупомянутой молекулы, в вектор, введения его в клетку хозяина для трансформации и  
35 культивирования трансформанта. Клетка хозяина и способ трансформации подбираются специалистом как описано выше в разделе <Трансформант>.

<Фармацевтический продукт для усиления потребления пищи или увеличения  
40 массы тела.>

Настоящее изобретение также связано с фармацевтической композицией для  
увеличения потребления пищи или увеличения массы тела, где вышеуказанная  
композиция является активным ингредиентом субстанции, которая ингибирует активность  
45 или продукцию несфатиновых полипептидов и т.п., или субстанцией, которая ингибирует экспрессию гена, кодирующего полипептид несфатин и т.п. Вышеуказанная фармацевтическая композиция может использоваться при заболеваниях и условиях, для которых уменьшение потребления пищи или массы тела является проблемой. Болезни и  
50 условия, для которых уменьшение потребления пищи или массы тела, являются

проблемой и включают, например, цибифобию, функциональную диспепсию или  
5 супрессию потребления пищи и/или уменьшение массы тела при раке, воспалительных  
заболеваниях, подавленных функций слизистой, тиреоидной, адреналиновой и т.д. систем,  
послеоперационных или чрезмерных стрессов и тому подобное.

Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может включать любые  
фармацевтически доступные добавки. Фармацевтические составы, использующие  
10 фармацевтически доступные добавки, могут быть приготовлены способом, описанным в  
"Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20 th edition, University of the Sciences in  
Philadelphia, Williams & Wilkins, 15 декабря 2000 года". Одна лекарственная форма такой  
15 фармацевтической композиции представляется как жидкость, приготовленная путем  
растворения, суспензирования или эмульгирования в водных или масляных растворах.  
Такие растворители используют, например, дистиллированную воду для инъекций,  
физиологический раствор и т.п. как водную среду, а дополнительно и как  
20 осморегуляторный агент (например, D-глюкоза, D-сорбитол, D-маннитол и хлорид  
натрия), пригодные солюбилизирующие агенты, такие, как спирт (например, этанол),  
полиспирты (например, полипропиленгликоль и полиэтиленгликоль), неионные  
25 сурфактанты (например, полисорбат 80, полиоксиэтиленированное гидрогенизированное  
касторовое масло 50) и подобные могут быть использованы. Также в качестве растворителей  
могут использоваться масляные растворы, и вышеуказанные растворы содержат  
кунжутное масло, соевое масло и т.п., а как солюбилизирующий агент, бензил бензоат,  
30 бензил алкоголь и т.д. могут использоваться в комбинации. В таких жидкостях могут  
применяться в качестве пригодных добавок буферы (такие, как фосфатные и ацетатные  
буферы), успокоительные агенты (такие, как бензалкония хлорид и прокаина  
гидрохлорид), стабилизаторы (такие, как сывороточный альбумин человека и  
35 полиэтиленгликоль), консерванты (такие, как аскорбиновая кислота, эриторбиновая  
кислота и их соли), красители (такие, как хлорофилл-медь,  $\beta$ -каротин, Красный № 2,  
Синий № 1), антисептики (такие, как параоксибензоатный сложный эфир, фенол,  
40 бензетониум хлорид и бензалкония хлорид), загустители (такие, как  
гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза и их соли), стабилизаторы (такие,  
как сывороточный альбумин человека, маннит и сорбит) и коррегаторы (такие, как ментол  
и цитрусовые ароматизаторы).

Другая лекарственная форма фармацевтических композиций (с целью соблюдения  
единства терминологии с упомянутыми выше несколькими «фармацевтическими  
50 композициями» включает твердые формы, такие, как пудры, таблетки, гранулы, капсулы,  
пилюли, суппозитории и лепешки. В случае твердых форм для введения в форме

оральных препаратов используемыми добавками могут быть наполнители (такие, как кристаллическая целлюлоза, лактоза и крахмал), смазочные материалы (такие, как магнезиум стеарат и тальк), связывающие вещества (такие, как гидроксипропил целлюлоза, гидроксипропил метилцеллюлоза и макрогол), дезинтеграторы (такие, как крахмал и карбоксиметил целлюлоза кальция) и подобные. Также при необходимости могут использоваться антисептики (такие, как бензил алкоголь, хлоробутанол, метил параоксибензоат и пропил параоксибензоат), антиоксиданты, красители, подсластители и тому подобное. Более того, другая форма также включает фармацевтическую композицию для применения на слизистую оболочку, и для этой формы с целью придания впитываемости в слизистую и остаточного действия могут комбинироваться добавки, такие, как клеящие вещества, усилители вязкости, клейкости, вяжущие агенты (такие, как муцин, агар, желатин, пектин, карагеллан, альгинат натрия, клей из рожкового дерева, клей ксантан, клей трагакан, арабский клей, цитозан, пуллулан, восковой крахмал, сукралфат, целлюлоза и их производные (такие, как гидроксипропил метил целлюлоза), сложные полиглицериновые эфиры жирных кислот, акрил-(мет)акрил алкильные сополимеры и их соли, полиглицериновые эфиры жирных кислот). Однако лекарственные формы фармацевтических композиций, сольвентов и добавок, вводимых в живое тело, не ограничиваются перечисленным и могут выбираться как пригодные персонами, имеющими навыки в этой области.

С целью облегчения состояния заболевания вышеуказанные фармацевтические композиции могут применяться орально или парентерально. При оральном применении могут выбираться такие лекарственные формы, как пудры, таблетки, гранулы, капсулы, пилюли, сиропы, эмульсии и эликсиры. При парентеральном применении это могут быть трансназальные агенты и жидкости, суспензии или твердые формы. Другими агентами для парентерального введения могут быть инъекции, такие, как подкожные инъекции, внутривенные инъекции, инъекции в виде капель, внутримышечные инъекции, внутрижелудочковые инъекции, внутривнутрибрюшинные инъекции и тому подобные. Другими формами парентерального введения могут быть, например, трансмукозальные препараты типа суппозиторий, подъязычных подкожных лекарств и тому подобное. Более того, локальные внутрисосудистые введения могут применяться в комплексе при эндопротезах сосудов и как антиэмболические внутрисосудистые агенты.

Дозы упомянутых фармацевтических композиций могут варьировать в зависимости от возраста, пола, массы тела пациента, условий, терапевтических эффектов, режимов применения, периода лечения или типов содержащихся активных ингредиентов, но одна доза обычно находится в пределах 0,1 - 500 мг на человека для взрослых и



предпочтительно в диапазоне 0,5 - 20 мг. Дозы могут варьировать в зависимости от разных условий, поэтому иногда меньшие указанных дозы могут быть достаточными, а в других случаях могут требоваться дозы больше указанных.

Указанный антисмысловой олигонуклеотид или иРНК молекула может интегрироваться вниз по течению в доступную промоторную последовательность и может вводиться как вектор РНК экспрессии, который производит эффект антисмыслового олигонуклеотида или иРНК. Когда вектор экспрессии вводится в форме, которая может достигнуть мозга пациента, эффект антисмыслового олигонуклеотида или иРНК эффект гена позволяет развиваться экспрессии полинуклеотида, который супрессирует экспрессию указанного гена, и пониженный уровень экспрессии этого гена может вызывать терапевтические эффекты в условиях пониженного потребления пищи и/или пониженного массы тела.

#### **<Трансгенные животные, экспериментальная модель ожирения/липоматоза на животном >**

Настоящее изобретение относится к трансгенному животному, не относящемуся к человеку, которое содержит ген, кодирующий вышеуказанный полипептид несфатин и др., или вектор, содержащий его. Более того, оно относится к трансгенному животному, не относящемуся к человеку, которое проявляет состояние подавленного потребления пищи или состояние подавленного прибавления в весе, где экспрессия указанного гена повышена системно, предпочтительно, в гипоталамусе. Трансгенное животное, не относящееся к человеку, в котором уровень экспрессии гена, кодирующего вышеуказанный полипептид, искусственно повышен, может использоваться в качестве модельного животного, которое проявляет подавленное потребление пищи и/или подавленное прибавление в весе.

Настоящее изобретение относится к трансгенному животному, не относящемуся к человеку, которому вводится вышеуказанное вещество (такое как антитело, антисмысловой олигонуклеотид и молекула иРНК), которое подавляет активность и экспрессию полипептида, обладающего активностью в отношении контроля над подавлением потребления пищи и/или подавлением массы тела, и которое проявляет активность в отношении повышения аппетита или повышения прибавления в весе. Трансгенное животное, не относящееся к человеку, получаемое путем введения гена кодирующего такое вещество, может использоваться в качестве модельного животного, которое проявляет повышенное потребление пищи или повышенное прибавление в весе. Также, указанное трансгенное животное, не относящееся к человеку, может использоваться в качестве модельного животного экспериментальных заболеваний, таких

как ожирение, сахарный диабет, гипертензия, гиперлипидемия, гиперурикемия, жировая инфильтрация печени, заболевания сердца, цереброваскулярные заболевания, синдром апноэ во сне, ортопедические заболевания, как остеоартрит, нарушения менструального цикла и злокачественные опухоли.

Способ получения трансгенных животных со специфическим геном в качестве мишени известны. Так, трансгенные животные могут быть получены с помощью способа, в котором ген и яйцеклетку смешивают и затем обрабатывают фосфатом кальция; способа, в котором ген вводят непосредственно в ядро яйцеклетки на стадии пронуклеуса с помощью микропипетки под фазово-контрастным микроскопом (микроинъекционный способ, патент США № 4873191); способ с использованием эмбриональной стволовой клетки (ЭС клетка), и подобные. В дополнении, разработан способ, в котором ген вводят в ретровирусный вектор и затем инфицируют яйцеклетку; сперматозоид-векторный способ, в котором ген вводят в яйцеклетку посредством сперматозоида, и подобные. Сперматозоид-векторный способ является ген-рекомбинантным способом, в котором чужеродный гена вводится в сперматозоид путем адгезии или электропорации и затем этот сперматозоид выполняет оплодотворение яйцеклетки с введением чужеродного гена (Lavitrano et al., Cell (1989) 57, 717-723).

Также, если промотор, транскрипция которого регулируется подходящим веществом, таким как лекарственное средство, используется в качестве промотора для применения в экспрессии вектора, введение указанного вещества может регулировать уровень экспрессии вещества, которое контролирует активность или экспрессию гена, кодирующего чужеродный несфатиновый полипептид и др. или указанный полипептид в трансгенном животном.

Кроме того, настоящее изобретение относится к нокаутированному животному, в котором удалена вся область или ее часть гена, кодирующего несфатиновый полипептид и др.; и животное knock-in, в котором указанный ген заменен другим геном, также охватывается в настоящем изобретении. Например, нокаутированное животное несфатиновым полипептидом и др. может использоваться в качестве модельного животного, которое проявляет повышенное потребление пищи и/или повышенное прибавление в весе.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к модельному животному, у которого потребление пищи и/или прибавление в весе подавлено, включая животного, не относящегося к человеку, которому вводили вышеуказанный несфатиновый полипептид и др. per se, или модельному животному, у которого повышено потребление пищи и/или прибавление в весе, включая животного, не относящегося к человеку, которому вводили

вещество, которое подавляет активность или экспрессию указанного полипептида. Животное, не относящееся к человеку, у которого повышено потребление пищи и/или прибавление в весе, может использоваться в качестве модельного животного экспериментальных заболеваний, таких как ожирение, сахарный диабет, гипертензия, гиперлипидемия, гиперурикемия, жировая инфильтрация печени, заболевания сердца, цереброваскулярные заболевания, синдром апноэ во сне, ортопедические заболевания, как остеоартрит, нарушения менструального цикла и злокачественные опухоли.

Виды животных настоящего изобретения для использования в качестве модельных животных могут быть получены использованием любых позвоночных, отличных от человека. А именно, для таких позвоночных как мыши, крысы, кролики, минисвинки, козы, овцы, обезьяны, собаки, кошки, и крупный рогатый скот, модельные животные могут быть получены путем введения гена или введения вещества.

**<Способ получения полипептида, обладающего подавляющим действием на потребление пищи и/или прибавление в весе >**

Настоящее изобретение относится к способу получения вышеуказанного несфатинового полипептида и др., используя вышеуказанный трансформант, который экспрессирует ген, кодирующий указанный несфатиновый полипептид и др., или вышеуказанное трансгенное животное, не относящееся к человеку, и трансгенное растение, содержащее ген, кодирующий указанный полипептид или вектор, содержащий ген.

В вышеуказанном способе получения указанных полипептидов настоящего изобретения, могут быть произведены различные модификации и изменения с вышеуказанной последовательностью ДНК, плазмидой и вирусом для согласования экспрессии, транскрипции, трансляции и др. в трансформанте или трансгенном животном, не относящегося к человеку. Например, вследствие вырожденности генетического кода, нуклеотиды могут быть замещены по всей кодирующей области белка. Такая последовательность может быть определена из аминокислотной последовательности несфатинового полипептида или полипептида несфатин-1, или из нуклеотидной последовательности гена, кодирующего указанный полипептид, и может быть собрана традиционным синтетическим способом, описанным ниже. Такой синтетический способ может осуществляться посредством способа Itakura et al. (Itakura et al., Science 198:1059, 1977) и способа Crea et al. (Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5765, 1978). Таким образом, ген, кодирующий вышеуказанный несфатиновый полипептид и др., для использования в способе получения полипептида настоящего изобретения не ограничивается тем, который использует конкретно проиллюстрированные нуклеотидную

последовательность, плазмиду или вирус.

Получение вышеуказанного полипептида при использовании трансформанта может осуществляться путем культивирования указанного трансформанта. В качестве питательных сред, применяющихся для культивирования, могут выбираться различные среды, обычно используемые, как подходящие в зависимости от выбранной клетки-хозяина, и культивирование может осуществляться при условии, пригодном для роста клетки-хозяина.

Также, вышеуказанный полипептид может продуцироваться в трансформант внутриклеточно или внеклеточно, или на клеточной мембране. В качестве иного способа получения полипептидов при использовании гена, кодирующего несфатиновый полипептид и др., можно упомянуть способ, основанный на синтез белков в бесклеточной системе, образцом которого является трансляционная реакционная система *in vitro*. В такой трансляционной реакционной системе *in vitro*, 5' обратного направления к гену, кодирующему несфатиновый полипептид и др., последовательность, которая контролирует транскрипцию, предпочтительно промотор SP6, промотор T3, промотор T7 и др., может быть добавлена, и ген трансформирован в клетку или *in vitro* для получения молекулы РНК, кодирующей несфатиновый полипептид и др., и клеточный экстракт для *in vitro* транскрипции, полученный из проростков пшеницы, *E. coli*, ретикулоцитов и др., для осуществления продукции. Один пример продукции может выполняться с помощью способа, описанного в Sawazaki et al., Protein, Nucleic acid and Enzyme, 2003, Vol. 48, pp. 549-554. Полипептиды, полученные с помощью такого трансформанта или синтеза белков в бесклеточной системе, могут быть разделены и очищены, по желанию, путем применения различных способов разделения, используя физические свойства, химические свойства и др. [см. The Japanese Biochemical Society ed., "Biochemistry Databook II", The First edition, the First print, issued by Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. on June 23, 1980, pp. 1175-1259; Arakawa et al., Biochemistry (USA), issued on December 16, 1986, Vol. 25, No. 25, pp. 8274-8277 (1986); Langley et al., European Journal of Biochemistry (Germany), опублик. March 2, 1987, Vol. 163, No. 2, pp. 313-321]. Указанные способы, в частности, включают, например, традиционную восстановительную обработку, обработку агентом, преципитирующим белки (высаливание), центрифугирование, способ осмотического удара, ультразвуковое разрушение, ультрафильтрацию, гель-фильтрацию, различные хроматографические способы, такие как адсорбционная хроматография, ионообменная хроматография, афинная хроматография, и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), диализ и их комбинации, и подобные. Для очистки при использовании аффинности с вышеуказанным полипептидом может применяться,

например, вышеуказанное антитело, которое связывается с вышеуказанным полипептидом, и может достигаться путем отделения указанного полипептида от указанного антитела.

5  
10  
15  
Вышеуказанный способ получения полипептида настоящего изобретения может также достигаться путем получения белка, в котором аффинная метка слита с указанным полипептидом в трансформанте или трансгенном животном, не относящемся к человеку, с последующим разделением и очисткой указанного аффинного слитого с аффинной меткой белка. Путем экспрессии указанного слитого с аффинной меткой белка, может выполняться аффинная очистка при использовании такой метки. В качестве указанной аффинной метки можно указать глутатион-S-трансферазу (GST), поли-Гистидин (His tag, Sisk et al., J. Virol. (USA), issued in February 1994, Vol. 68, No. 2, pp. 766-775) и FLAG метку (Hopp et al., Biotechnology, issued in 1988, Vol. 6, pp. 1204-1210).

20  
25  
В отношении GST-слитого белка, в котором вышеуказанный полипептид слит с GST, вышеуказанный полипептид может продуцироваться при использовании глутатион-иммобилизованного носителя, т.е. указанный полипептид может быть очищен путем абсорбции и десорбции GST от связанного с носителем глутатиона, с последующим отщеплением GST-фрагмента от GST-слитого белка и его очистки.

30  
В отношении белка, слитого с His-меткой, вышеуказанный полипептид может продуцироваться при использовании хелатного носителя, заряженного ионами металла, т.е. указанный полипептид может быть очищен путем абсорбции и десорбции His-метки и указанного хелатного носителя, заряженного ионами металла, с последующим отделением фрагмента His-метки от белка, слитого с His-меткой, и его очистки.

35  
40  
В отношении белка, слитого с FLAG - меткой, вышеуказанный полипептид может продуцироваться при использовании носителя, с которым связано антитело против FLAG-метки, т.е. указанный полипептид может быть очищен путем абсорбции и десорбции FLAG-метки и указанного хелатного носителя, заряженного ионами металла, с последующим отделением части FLAG - метки от белка, слитого с FLAG - меткой, и его очистки.

45  
Полипептид несфатин-1 может также продуцироваться с помощью обработки несфатинового полипептида, полученного вышеуказанным способом, протеолитическим ферментом, таким как белок-конвергаза, фракционируя расщепление при использовании хроматографии с обращённой фазой, и поддерживая и собирая фрагменты, содержащие полипептид несфатин-1 путем масс-спектрометрии и др. Измененный несфатин-1 может также быть получен аналогичным образом.

50  
Несфатиновый полипептид и др. настоящего изобретения, полученный таким

образом, может также быть модифицирован на N-конце после трансляции, и такие модифицированные полипептидные молекулы также входят в объем настоящего изобретения. Например, полипептид, чей N-конец конвертирован в пироглутамин, может  
5 быть получен путем экспрессии вышеуказанного несфатинового полипептида и др. настоящего изобретения, так, что N-конец становится глутаминовым остатком, и путем обработки полученного полипептида в кислотных условиях с использованием 5-10%  
10 раствора уксусной кислоты (Park et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA), issued in March 1991, pp. 2046-2050). Пептид, чей N-конец ацелирован, может быть получен путем экспрессии вышеуказанного  
15 несфатинового полипептида и др. настоящего изобретения, так, что N-конец становится любой аминокислотой, содержащей  $\alpha$ -аминогруппу, и путем обработки полученного полипептида сульфо-NHS-ацетатом или уксусным ангидридом. Такой способ модификации N-конца полипептида после трансляции является хорошо известным в  
20 уровне техники. В дополнении, несфатиновый полипептид и др. настоящего изобретения может также обрабатываться флуоресцентным веществом для модификации (Hermanson et al., Bioconjugate Techniques (USA) issued by Academic Press in 1996).

25 Трансгенное животное, не относящееся к человеку, может также быть использовано для получения вышеуказанного несфатинового полипептида и др. В соответствии с таким способом, например, фракции, содержащие интересующий пептид, могут быть собраны как жидкий компонент, отделенный от твердого компонента, или как  
30 жидкий компонент, экстрагированный с водным растворителем или органическим растворителем от переработанных продуктов, полученных путем культивирования, измельчения, или фракционирования органа, ткани, крови, молока и др., отобранных от  
35 трансгенного животного, не относящегося к человеку, содержащего ген, кодирующий вышеуказанный несфатиновый полипептид и др. или вектор, содержащий указанный ген. Интересующий пептид может быть отделен и очищен от указанных фракций путем  
40 способов разделения при использовании вышеупомянутых физических, химических и др. свойств.

Также является возможным применение трансгенного растения для получения вышеуказанного несфатинового полипептида и др. Способ может осуществляться со  
45 ссылкой на японскую нерассмотренную патентную заявку (Kokai) № 2003-116385 "A transgenic plant comprising a gene encoding Japanese encephalitis vaccine". Также, трансгенное растение может продуцироваться способом, указанным в японской нерассмотренной патентной заявке (Kokai) № 2002-17186 "Transgenic Plants". Из ткани  
50 листьев, стеблей, корней, плодов, кожуры, ростков и лепестков такого трансгенного

растения или сухой ткани, полученной из такой ткани, или необязательно из переработанных продуктов, полученных путем культивирования, измельчения или прессования указанной ткани, интересующий полипептид может быть собран в виде экстракта с водным или органическим растворителем, выжимки, полученной путем прессования, или масла, и в дальнейшем указанный полипептид может быть отделен и очищен путем различных процедур разделения при использовании вышеупомянутых физических, химических и др. свойств.

Вышеуказанный полипептид настоящего изобретения может также быть получен путем химического синтеза. В этом случае, может использоваться обычно применяемый способ синтеза пептидов, такой как твердофазный синтез или жидкофазный синтез. Для конденсации и защиты защитных групп аминокислоты в пептиде, синтеза и элиминация защитных групп после синтеза может применяться известный способ (Izumitani et al., "Basis and Experiment of Peptide Synthesis (PEPUTIDO GOSEINO KISOTO JIKKENN)", issued by Maruzen Co., Ltd. in 1975, Hitoshi Yajima - The Japanese Biochemical Society ed., "Biochemistry Experiment Series (SEIKAGAKU JIKKENN KOUZA) 1, Chemistry of Protein IV", issued by Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. in 1977). Также представляется возможным синтезирование полной последовательности пептида одновременно, несмотря на то, что способ, который может применяться, основан на раздельном синтезировании частичных пептидов указанного белка с последующей конденсацией частичных пептидов (The Japanese Biochemical Society ed., "New Biochemistry Experiment Series (SINSEIKAGAKU JIKKENN KOUZA), Protein IV, Synthesis and Expression", issued by Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. in 1991).

Несмотря на то, что  $\alpha$ -аминогруппа аминокислот, обычно используемая в синтезе пептидов, обычно защищена tBoc группой или Fmoc группой, пептид, который в итоге образуется, может сохранять защитную группу, или с него может быть снята защита. При необходимости, деблокированный аминоконец пептида может быть модифицирован пироглутаминовой кислотой, ацетильной группой или формильной группой (Hermanson et al., Bioconjugate Techniques (USA) issued by Academic Press in 1996). В специфичном примере, синтезирован вышеуказанный полипептид настоящего изобретения, содержащий глутамин на N-конце, и указанный пептид может быть циклизирован путем обработки его разбавленной кислотой, такой как 5-10% уксусной кислотой, с преобразованием в пироглутаминовую кислоту (Park et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA), issued in March 1991, pp. 2046-2050).

Также, при необходимости, могут быть получены синтетические пептиды, в которых после синтеза к C-концу полипептида присоединяются амидная группа или

флуоресцентное вещество. Например, для получения синтетического пептида, содержащего введенную в него амидную группу на С-конце путем твердофазного синтеза, может применяться коммерчески доступная смола, которая способствует амидированию С-конца, в реакции отделения пептида от твердофазного носителя (смоля). Также, известным способом может производиться модификация с флуоресцентными веществами и др. на С-конце (Hermanson et al., Bioconjugate Techniques (USA) issued by Academic Press in 1996).

**<Аналитический способ прогнозирования или диагностики состояния, обусловленного нарушением контроля над потреблением пищи и/или массой тела >**

Настоящее изобретение относится к способу диагностики для применения в оценке заболеваний, связанных с контролем над потреблением пищи и/или массой тела у млекопитающих, мониторинга и прогнозирования тяжести и течения болезненных состояний, оценки прогноза и применения вышеуказанной фармацевтической композиции и подобных. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу диагностики и прогнозирования состояния, обусловленного нарушением контроля над потреблением пищи и/или массой тела, при использовании образца, полученного от исследуемого млекопитающего, при этом способ включает сравнение количества, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты (молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124), кодирующую несфатин, несфатиновый полипептид и др. (полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115) в указанном образце, с таковым в образце, полученном от здорового индивидуума. Здоровый индивидуум относится здесь к здоровому или нелеченному индивидууму.

Специфично, настоящее изобретение относится к аналитическому способу прогнозирования или диагностики состояния, обусловленного нарушением контроля над потреблением пищи и/или массой тела, при этом способ включает стадии сравнения количества, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124 в образце, полученном из живого организма исследуемого млекопитающего с таковым в биологическом образце, полученном из здорового индивидуума, и обнаружения сниженной или повышенной экспрессии указанного гена.

В качестве биологических материалов для применения, могут быть указаны кровь, ткани, моча, цереброспинальная жидкость, слюна, ткани мозга, взятые путем биопсии и др., при этом кровь является наиболее предпочтительным материалом. Кровь для



использования в качестве образца включает цельную кровь, или плазму или сыворотку, полученную из цельной крови. Способы отбора этих биологических образцов известны. Препараты, такие как лизаты этих биологических образцов, также могут применяться в качестве образца. Альтернативно, мРНК, экстрагированная из препаратов, могут применяться в качестве образца для обнаружения мРНК, соответствующей вышеуказанному гену. Для экстракции лизатов биологических образцов или мРНК, могут применяться традиционные коммерчески доступные наборы. Альтернативно, жидкие биологические образцы, такие как кровь и цереброспинальная жидкость, могут разбавляться при необходимости буфером и др. для приготовления образцов для обнаружения белка или гена.

Количество, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, в биологическом образце млекопитающего, может определяться при использовании полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность указанной молекулы нуклеиновой кислоты, или олигонуклеотида длиной, по меньшей мере, в 18 оснований, содержащего нуклеотидную последовательность, комплементарную комплементарной цепи в качестве праймера для ПЦР или зонда. В этом случае, специалист в данной области может подобрать праймер или зонд, пригодный для применения, при использовании различных компьютерных программ. Такой полинуклеотид или олигонуклеотид может быть связан с пригодной меткой или иммобилизован к подходящей подложке в зависимости от формата анализа. Такой ПЦР праймер или зонд могут быть получены синтетическим или рекомбинантным образом, или могут быть получены любыми способами, доступными специалисту в данной области. Например, ПЦР праймер, который может быть применен в настоящем изобретении, включает, но не ограничивается, SEQ ID NO: 22 (прямой праймер) и SEQ ID NO: 23 (обратный праймер). В качестве зонда, который может быть применен в настоящем изобретении, включается, но не ограничивается, один из тех, который получен путем мечения амплифицированного фрагмента при использовании вышеуказанного праймера с последовательностью ДНК из SEQ ID NO: 21 в качестве темплата (см. Демонстрационный Пример 2).

Измеряемые значения уровня экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, может быть скорректирован при использовании известного способа. При осуществлении коррекции, уровень экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную в

любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, может сравниваться между тестируемым биологическим образцом и биологическим образцом от нормального индивидуума. Коррекция измеряемых значений может выполняться на основе

5 измеряемого значения уровня экспрессии гена (такого как облигатный ген), уровень экспрессии которого варьирует незначительно. Примеры гена, уровень экспрессии которого варьирует незначительно, включают, например,  $\beta$ -актин и GAPDH.

10 Если для определения уровня экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, используется мРНК, то соответствующий способ

15 диагностики может выполняться в зависимости от обстоятельств. Если, например, используется мРНК, экстрагированная из биологической ткани, может быть выбран способ ОТ-ПЦР или способ нозерн-блоттинга и др., и если используются препараты ткани, то может быть выбран способ гибридизации *in situ* или др. Например, Демонстрационный

20 пример 8 демонстрирует, что способ гибридизации *in situ* показывает, что экспрессия гена несфатина подавляется у крыс с повышенным аппетитом при голодовке, и экспрессия повышается в состоянии подавленного аппетита при приеме пищи.

25 Если определено, что экспрессия гена, содержащего нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, в исследуемом образце снижена по сравнению с биологическим образцом, полученном из нормального индивидуума, прогнозируется или диагностируется статус

30 повышенного потребления пищи или повышенного прибавления в весе, и, более того, может прогнозироваться или диагностироваться начало заболевания, выбранного из ожирения, сахарного диабета, гипертензии, гиперлипидемии, гиперурикемии, жировой

35 инфильтрации печени, заболеваний сердца, цереброваскулярных заболеваний, синдрома апноэ во сне, ортопедических заболеваний, нарушения менструального цикла и злокачественных опухолей. С другой стороны, если обнаружена повышенная экспрессия

40 указанного гена в биологическом образце, для исследуемого млекопитающего прогнозируется или диагностируется состояние сниженного потребления пищи или сниженного прибавления в весе, и, кроме того, может прогнозироваться или

45 диагностироваться патологическое отвращение к пище, функциональная диспепсия, или болезненные состояния, связанные с пониженным потреблением пищи или пониженным прибавлением в весе, являющиеся результатом злокачественных опухолей, воспалительных заболеваний, сниженных функций гипофиза, щитовидной железы, надпочечников и др., после операционного или чрезмерного стресса и подобных.

50 Кроме того, настоящее изобретение относится к способу прогнозирования или

5  
10  
15  
20  
25  
диагностики состояния, связанного с нарушением контроля над потреблением пищи и/или  
массой тела, при этом способ включает этап обнаружения сниженного состояния или  
повышенного состояния количества, содержащего несфатиновый полипептид и др.  
(полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID  
NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 или 107-115) путем сравнения количества,  
содержащего указанный полипептид в биологическом образце млекопитающего, с  
таковым в биологическом образце, полученном от нормального индивидуума. Указанный  
способ может выполняться путем определения несфатинового полипептида и др.

15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
В качестве используемых биологических образцов могут быть упомянуты кровь,  
моча, цереброспинальная жидкость, слюна, ткани мозга, взятые путем биопсии и др., при  
этом кровь является наиболее предпочтительной. Кровь для использования в качестве  
образца включает цельную кровь, или плазму или сыворотку, полученную из цельной  
крови. Способы отбора этих биологических образцов известны. Препараты, такие как  
лизаты этих биологических образцов, также могут применяться в качестве образца. Для  
приготовления лизатов биологических образцов, могут использоваться традиционные  
подходящие наборы. Альтернативно, жидкие биологические образцы, такие как кровь и  
цереброспинальная жидкость, могут разбавляться при необходимости буфером и др. для  
приготовления образцов для обнаружения белка или гена.

30  
35  
40  
45  
50  
Для определения несфатинового полипептида и др., может применяться  
иммунологический способ для указанного полипептида, в котором может использоваться  
антитело, которое связано с несфатиновым полипептидом и др.. Такое антитело включает  
то, которое указывалось выше, и, в частности, может упоминаться антитело, полученное  
путем иммунизации пептида, полученного несфатинового полипептида, полученного в  
Демонстрационных Примерах 3 и 10, или антитело, полученное путем иммунизации  
пептида, полученного полипептида несфатин-1 или полипептида несфатин-1M30. Такие  
антитела не ограничены, и любое поликлональное антитело или моноклональное антитело  
против несфатинового полипептида и др. может применяться без какого-либо  
специфичного ограничения.

45  
50  
Антитело для применения в настоящем изобретении может быть связано с  
подходящей меткой в зависимости от формата анализа, или указанное антитело может  
быть иммобилизовано к подходящей подложке в зависимости от формата анализа.

50  
Имунологический способ может осуществляться соответствующим образом в  
формате соответствующем способу диагностики. Например, если используются образцы  
крови или лизаты, могут быть выбраны способ ELISA, способ радиоиммуноанализа (RIA),  
способ вестерн-блоттинг и др., и если используются образцы ткани, то могут быть

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50

выбраны иммуногистохимические способы. В более специфичном примере, как показано в примерах, может быть упомянут иммуногистохимический способ, как показано в Демонстрационных Примерах 4 и 11, и является возможным составить аналитическую систему для несфатиновлшл полипептида и др. при использовании соответствующего при использовании антитела. Например, способ вестерн-блоттинг показан в Демонстрационном примере 3, иммуногистохимические способы в Демонстрационных примерах 4 и 9, и ELISA способ (конкурентный РИА способ) в Демонстрационном примере 21.

Если обнаружено, что количество, содержащее несфатиновый полипептид или несфатиновый полипептид и др., в биологическом образце снижено по сравнению с таковым в биологическом образце, полученном от нормального индивидуума, прогнозируется или диагностируется статус повышенного потребления пищи или повышенного прибавления в весе, и, более того, может прогнозироваться или диагностироваться начало заболевания, выбранного из ожирения, сахарного диабета, гипертензии, гиперлипидемии, гиперурикемии, жировой инфильтрации печени, заболеваний сердца, цереброваскулярных заболеваний, синдрома апноэ во сне, ортопедических заболеваний, нарушения менструального цикла и злокачественных опухолей. С другой стороны, если обнаружена повышенная экспрессия указанного гена в биологическом образце, для исследуемого млекопитающего прогнозируется или диагностируется состояние сниженного потребления пищи или сниженного прибавления в весе, и, кроме того, может прогнозироваться или диагностироваться патологическое отвращение к пище, функциональная диспепсия, или болезненные состояния, связанные с пониженным потреблением пищи или пониженным прибавлением в весе, являющиеся результатом злокачественных опухолей, воспалительных заболеваний, сниженных функций гипофиза, щитовидной железы, надпочечников и др., после операционного или чрезмерного стресса и подобных.

**<Набор для использования в способе прогнозирования или диагностики статуса, связанного с нарушением контроля над потреблением пищи и/или массой тела >**

Настоящее изобретение также относится к набору для применения в способе прогнозирования или диагностики вышеуказанного состояния, обусловленного нарушением контроля над потреблением пищи и/или массой тела. Такой набор включает, например, набор для определения количества экспрессированного гена, кодирующего несфатин и др. (гена, содержащего нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124) или набор для

определения количества, содержащего несфатиновый полипептид и др. (полипептид, содержащий аминокислотные последовательности, указанные в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115).

Набор для определения количества экспрессированного гена, кодирующего несфатин и др., включает, по меньшей мере, один из ПЦР праймера, зонда или ДНК чипа для определения указанного гена.

ПЦР праймер, входящий в состав набора настоящего изобретения, относится к олигонуклеотиду с длиной, по меньшей мере, в 18 оснований, содержащий нуклеотидную последовательность гена, кодирующего несфатин и др., или нуклеотидную последовательность, комплементарную комплементарной цепи этого гена, и будет приготавливаться соответствующим образом на основании нуклеотидной последовательности гена, кодирующего несфатин и др., описанном здесь, специалистом в данной области техники. Например, ПЦР праймеры, входящие в состав набора настоящего изобретения, могут включать, но не ограничиваться, SEQ ID NO: 22 (прямой праймер) и SEQ ID NO: 23 (обратный праймер). Зонд, входящий в состав набора настоящего изобретения, может включать, но не ограничиваться, один из тех, который получен путем мечения амплифицированного фрагмента при использовании вышеуказанного праймера, и DNA последовательность SEQ ID NO: 21 в качестве темплата. DNA чип, входящий в состав набора настоящего изобретения, может быть приготовлен путем иммобилизации вышеуказанного зонда к субстрату, например, к стеклу.

В дополнении, набор настоящего изобретения может включать, в качестве дополнительных компонентов, буфер для разбавления реагентов и биологические образцы, положительные контроли, отрицательные контроли, субстрат для определения метки, реакционный сосуд, инструкцию, описывающую протокол анализа и др. Эти элементы могут быть смешаны заранее, при необходимости. Также, при необходимости, могут быть добавлены консерванты и антисептики в каждый элемент.

Набор для определения количества, образованного несфатинового полипептида и др., включает антитело, которое распознает указанный полипептид, стандартный пептид и, по меньшей мере, один модифицированный пептид для реакции конкурентного связывания.

Антитело, входящее в состав набора настоящего изобретения, аналогичное антителу, используемому в вышеуказанном способе, может являться, но не ограничивается, антителом, которое распознает несфатиновый полипептид и др.

Стандартный пептид, входящий в состав набора настоящего изобретения,

используется для составления калибровочной кривой, которая отражает дозозависимое связывание вышеуказанного антитела с несфатиновым полипептидом и др. Такой стандартный полипептид включает, например, полипептид, распознаваемый вышеуказанным антителом, такой как несфатиновый полипептид и др.

Модифицированный пептид для реакции конкурентного связывания, входящий в состав набора настоящего изобретения, относится к пептиду, распознаваемому вышеуказанным антителом, где пептид обладает способностью конкурирования с несфатиновым полипептидом или подобными в биологических образцах для определения связывания с указанным антителом. Также, модифицированный пептид для реакции конкурентного связывания обычно применяется путем мечения его соответствующим образом.

Набор настоящего изобретения может определять количество несфатинового полипептида и др., входящих в состав биологического образца, путем, например, (1) составления калибровочной кривой, полученной с использованием стандартного пептида и вышеуказанного антитела в присутствии вышеуказанного модифицированного пептида для реакции конкурентного связывания, (2) добавления вышеуказанного антитела в присутствии вышеуказанного модифицированного пептида для реакции конкурентного связывания в биологический образец, и (3) определение количества связывания модифицированного пептида для реакции конкурентного связывания и антитела при использовании стандартной калибровочной кривой.

Также является возможным определение количества несфатинового полипептида и др. при использовании двух видов антител, которые распознают несфатиновый полипептид или подобные и которые не ингибируют друг друга. В этом случае, первичное антитело обычно иммобилизуют на твердой фазе, а вторичное антитело подходящим образом метят для применения.

Набор настоящего изобретения может определять количество несфатинового полипептида и др., входящих в состав биологического образца, путем, например, (1) составления калибровочной кривой путем добавления стандартного пептида к иммобилизованному первичному антителу и взаимодействия пептида с праймером, с последующим добавлением меченного вторичного антитела, (2) добавления и взаимодействия биологического образца с аналогичным иммобилизованным первичным антителом с последующим добавлением меченного вторичного антитела, и (3) определения количества связывания вторичного антитела в реакции с биологическим образцом при использовании калибровочной кривой.

В дополнении, набор настоящего изобретения может включать, в качестве

дополнительных компонентов, буфер для разбавления реагентов и биологические образцы, положительные контроли, отрицательные контроли, субстрат для определения метки, реакционный сосуд, инструкцию, описывающую протокол анализа и др. Эти элементы  
5 могут быть смешены заранее, при необходимости. Также, при необходимости, могут быть добавлены консерванты и антисептики в каждый элемент.

**<Способ скрининга подходящего терапевтического соединения>**

10 Настоящее изобретение относится к способу скрининга возможного терапевтического и профилактического соединения для заболеваний или состояний, связанных с нарушением контроля над потреблением пищи и/или массой тела, при этом  
15 указанное соединение обладает действием в отношении контроля над потреблением пищи и/или массой тела.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу скрининга терапевтического и профилактического агента, обладающего действием по подавлению  
20 потребления пищи и/или подавлению прибавления в весе, указанный способ содержит стадии контактирования исследуемого вещества с клеткой млекопитающего, и определением индуцированной экспрессии гена (гена, содержащего нуклеотидную  
25 последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124), кодирующего несфатин и др. в указанной клетке, или повышения количества несфатинового пептида и др. (полипептида, содержащего аминокислотную  
30 последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115), входящего в состав указанной клетки или внеклеточно секретлируемого вне клетки. Было показано, что подавление потребления пищи или подавление прибавления в  
35 весе является необходимым при ожирении, сахарном диабете, гипертензии, гиперлипидемии, гиперурикемии, жировой инфильтрации печени, заболеваниях сердца, цереброваскулярных заболеваниях, синдроме апноэ во сне, ортопедических заболеваниях, нарушениях менструального цикла и злокачественных опухолях. С помощью  
40 вышеуказанного скрининг-способа, может быть получен терапевтический и профилактический агент для указанных заболеваний.

С другой стороны, настоящее изобретение также относится к способу скрининга терапевтического и профилактического агента, обладающего действием по повышению  
45 потребления пищи и/или повышению прибавления в весе, при этом указанный способ содержит стадии контактирования исследуемого вещества с клеткой млекопитающего, и обнаружения подавленной экспрессии гена, кодирующего несфатин и др. в указанной  
50 клетке, или пониженного количества несфатинового пептида и др., входящих в состав указанной клетки, или внеклеточно секретированных вне клетки. Было

5 продемонстрировано, что повышение потребления пищи или повышение прибавления в весе является необходимым при патологическом отвращении к пище, функциональной диспепсии, или состоянию сниженного потребления пищи или сниженного прибавления в  
10 весе, что является результатом рака, воспалительных заболеваний, сниженных функций гипофиза, щитовидной железы, надпочечников и др., постоперационном или чрезмерном стрессе и подобных. С помощью вышеуказанного скрининг-способа, может быть получен терапевтический и профилактический агент для указанных заболеваний.

15 Соединения которые либо повышают, либо понижают уровень экспрессии указанного полипептида или гена, кодирующего его, являются соединениями, которые действуют стимулирующим или подавляющим образом на любой стадии транскрипции гена, стабилизации или трансляции и секреции, активностной экспрессии или стабилизации белка. В используемом здесь значении, соединениями, которые снижают  
20 уровень экспрессии гена, являются соединения, которые обладают ингибиторным действием на любой из этих стадиях.

25 Способ скрининга возможного терапевтического соединения настоящего изобретения для заболеваний или состояний, связанных с нарушением контроля над потреблением пищи и/или массой тела, может осуществляться *in vivo* или *in vitro*. В случае скрининга *in vivo*, например, способ может выполняться в соответствии со следующими стадиями:

30 (1) стадия введения возможного соединения исследуемому животному;

35 (2) стадия определения интенсивности экспрессии несфатинового полипептида и др. или гена, кодирующего указанный полипептид, в биологическом образце из вышеуказанного исследуемого животного; и

40 (3) стадия выбора соединения, которое повышает, или соединения, которое снижает, интенсивность экспрессии несфатинового полипептида и др. или гена, кодирующего указанный полипептид, по сравнению с контролем, который не получал возможное соединение.

45 Соединение, которое повышает продукцию несфатинового полипептида и др. и интенсивность экспрессии гена, кодирующего указанный полипептид, может являться кандидатом терапевтического агента для подавления потребления пищи и/или прибавления в весе Вещества, обладающие такой активностью, включают, но не ограничиваются, агонисты PPAR $\gamma$  и подобные. С другой стороны, соединения, которые  
50 подавляют продукцию несфатинового полипептида и др. или снижают интенсивность экспрессии гена, кодирующего указанный полипептид, могут являться кандидатами терапевтического агента для повышения потребления пищи и/или повышения



прибавления в весе. Вещества, обладающие такой активностью, включают, но не ограничиваются, антитело, которое связывается с несфатиновым полипептидом и др., антисмысловой олигонуклеотид против гена, кодирующего указанный полипептид, антагонист PPAR $\gamma$  и подобные.

В качестве исследуемого животного для применения в скрининг-способе настоящего изобретения, могут быть использованы нормальные животные и патологические экспериментальные животные для модельных заболеваний, связанных с нарушением контроля над потреблением пищи и/или массой тела, также могут использоваться соответствующим образом. В качестве примера таких патологических модельных животных, могут быть указаны C57BL/6L Ham Slc<sup>Ay</sup> тучные мыши, Zucker-fa/fa тучные крысы и подобные. Также могут использоваться трансгенные животные настоящего изобретения или модельные животные, которые получали несфатиновый полипептид и др. или вещество, которое подавляет активность или экспрессию указанного полипептида.

Определение интенсивности экспрессии несфатинового полипептида и др. или гена, кодирующего указанный полипептид, может осуществляться путем иммунологического способа или путем определения мРНК. В иммунологическом способе, формат, соответствующий цели определения, или биологический образец могут быть использованы соответствующим образом. Например, если образцы крови или лизаты биологических тканей используются в качестве биологического образца, то могут быть выбраны ELISA способ, RIA способ, вестерн-блоттинг способ и др., и если используются гистологические препараты, могут быть выбраны иммуногистохимические способы и др. Если определяется мРНК, то формат, соответствующий цели определения, или биологический образец может использоваться соответствующим образом. Если, например, используется мРНК, экстрагированная из биологической ткани, то могут быть выбраны ОТ-ПЦР или нозерн-блоттинг и др., и если используются гистологические препараты, может быть выбран способ гибридизации *in situ* и др.

Пример скрининга *in vitro* может осуществляться в соответствии со следующими стадиями:

(1) стадия контактирования возможного соединения с клеткой или тканью, полученной от млекопитающего;

(2) стадия определения интенсивности экспрессии несфатинового полипептида и др. или гена, кодирующего указанный полипептид в вышеуказанном клеточном образце или образце ткани; и

(3) стадия выбора соединения, которое увеличивает, или соединения, которое

уменьшает интенсивность экспрессии несфатинового полипептида и др. или гена, кодирующего указанный полипептид, по сравнению с контролем, который не получал возможное соединение.

5 В этом случае, соединение, которое повышает продукцию несфатинового полипептида и др. и интенсивность экспрессии гена, кодирующего указанный полипептид, может быть возможным кандидатом в качестве терапевтического агента для подавления  
10 потребления пищи и/или подавления прибавления в весе. Вещества, обладающие такой активностью, включают, но не ограничиваются, агонист PPAR $\gamma$  и подобные. С другой стороны, соединение, которое подавляет продукцию несфатинового полипептида и др.  
15 или снижают интенсивность экспрессии гена, кодирующего указанный полипептид, может являться возможным кандидатом терапевтического агента для повышения потребления пищи и/или повышения прибавления в весе. Вещества, обладающие такой активностью, включают, но не ограничиваются, антитело, которое связывается с  
20 несфатиновым полипептидом и др., антисмысловой олигонуклеотид против гена, кодирующего указанный полипептид, антагонист PPAR $\gamma$  и подобные.

В качестве исследуемой клетки для применения в скрининг-способе настоящего  
25 изобретения, может упоминаться клетка, выделенная соответствующим образом из животного, или клеточная линия, в случае клеток, полученных из животных. Такие примеры включают клеточную линию немелкоклеточного рака легких, жировую клетку или клетку, полученную из черепно-мозгового нерва, клеточную линию или подобные. В  
30 качестве ткани, полученной из животных, могут использоваться органы или ткани, взятые соответствующим образом из животных, и в качестве примера ткани мозга может использоваться гистологический срез, содержащий гипоталамус.

35 Определение интенсивности экспрессии несфатинового полипептида и др. или гена, кодирующего указанный полипептид может выполняться с помощью иммунологического способа или путем определения мРНК. В иммунологическом способе, формат, соответствующий цели определения, или биологический образец могут использоваться  
40 соответствующим образом. Например, если образец представляет собой клетку, полученную из животного, может использоваться проточная цитометрия или цитоиммунологическое окрашивание и др., и если применяются гистологические препараты, полученные из животных, то могут быть выбраны иммуногистохимические  
45 способы и др. Если используются препараты, такие как лизаты из образцов, то могут быть выбраны способ ELISA, способ радио-иммунного анализа, способ вестерн-блоттинга и др. Если определяется мРНК, то формат, соответствующий цели определения, или  
50 биологический образец могут использоваться соответствующим образом. Если, например,

используются клеточные образцы, полученные от животных, или образцы тканей, если они сохраняют морфологию, может быть выбран способ гибридизации *in situ* или др., и если применяется мРНК, экстрагированная из указанных образцов, могут выбираться способ ОТ-ПЦР, способ нозерн-блоттинга и др.

Настоящее изобретение описывает, что PPAR $\gamma$  агонист повышает экспрессию несфатинового полипептида и др. и гена, его кодирующего. Таким образом, в вышеуказанной стадии "контактирования возможного соединения с клеткой или тканью, полученной из млекопитающего", может быть проведен скрининг соединений, которые подавляют экспрессию несфатинового полипептида и др. или гена, кодирующего указанный полипептид, экспрессия которого повышена, путем контактирования PPAR $\gamma$ , такого как троглитазон, с образцом одновременно с, перед или после контактирования возможного соединения с образцом, и может быть проведен скрининг соединений, которые повышают экспрессию указанного полипептида или гена, кодирующего его, в механизме, который не включает вовлечения PPAR $\gamma$ .

Соединение может также быть отобрано путем определения реакции клетки, которая происходит, когда несфатиновый полипептид и др. взаимодействуют с клеткой. В качестве примера такого скрининга, можно указать такой, который включают следующие стадии:

(1) стадия контактирования возможного соединения с клеткой или тканью, полученной из млекопитающего;

(2) стадия контактирования несфатинового полипептида и др. с указанной клеткой или образцом ткани; и

(3) стадия определения присутствия или отсутствия реакции клетки или ее интенсивности с помощью несфатинового полипептида и др., по сравнению с контролем, который не контактировал с возможным кандидатом соединения.

В этом случае, соединение, которое повышает реактивную интенсивность клетки, контактирующей с несфатиновым полипептидом и др., может являться кандидатным терапевтическим агентом в качестве супрессора потребления пищи и/или прибавления в весе. Также, соединение, которое снижает реактивную интенсивность клетки, вызванную несфатиновым полипептидом и др., может являться кандидатным терапевтическим агентом в качестве агента, повышающего потребление пищи и/или прибавление в весе. Вещества, обладающие последней активностью, включают, но не ограничиваются, антитело, которое связывается с несфатиновым полипептидом и др.

В качестве исследуемой клетки, может упоминаться клетка, выделенная соответствующим образом из животного, или клеточная линия, в случае клеток,

полученных из животных. Такие примеры включают клеточную линию немелкоклеточного рака легких, жировую клетку или клетку, полученную из черепно-мозгового нерва, клеточную линию или подобные. В качестве ткани, полученной из животных, могут использоваться органы или ткани, взятые соответствующим образом из животных, и в качестве примера ткани мозга может использоваться гистологический срез, содержащий гипоталамус.

Реакция в вышеуказанной клетке относится к физическому или химическому изменению, вызванному действием несфатинового полипептида и др. в клетке, и включает, например, изменения в клеточной морфологии, мембранного потенциала, клеточного роста, концентрации внутриклеточного кальция, реакции миграции, концентрации молекулы внутриклеточного вторичного мессенжера (сAMP, dGMP и др.) и подобные.

Кроме того, в скрининг-способе настоящего изобретения, образуется участок, регулирующий транскрипцию, который находится в геноме несфатина и который контролирует экспрессию указанного гена, и может использоваться в репортерной аналитической системе, в которой используется молекула нуклеиновой кислоты указанного участка, регулирующего транскрипцию. Репортерная аналитическая система относится к аналитической системе, в которой фактор, регулирующий транскрипцию, который действует в указанном участке, регулирующем транскрипцию, подвергается скринингу с количеством экспрессированного репортерного гена, расположенный в прямом направлении к участку, регулирующему транскрипцию, в качестве показателя.

В качестве примера такого скрининга, может быть указан тот, который включает следующие стадии (1) - (3):

(1) стадия контактирования возможного соединения с клеткой, в которую введен вектор, содержащий регулирующий транскрипцию участок гена, кодирующего несфатиновый полипептид, и репортерный ген, под контролем регулирующего транскрипцию участка;

(2) стадия определения активности указанного репортерного гена; и

(3) стадия выбора соединения, которое снижает, или соединения, которое повышает уровень экспрессии указанного репортерного гена при сравнении с контролем, который не контактировал с кандидатным соединением.

В этом случае, соединение, которое повышает интенсивность экспрессии репортерного гена, может быть кандидатом в качестве терапевтического агента для подавления потребления пищи и/или подавления прибавления в весе. Вещества, обладающие такой активностью, включают, но не ограничиваются, агонист PPAR $\gamma$  и подобные. Также, соединение, которое снижает интенсивность экспрессии репортерного

гена, может являться кандидатом терапевтического агента для повышения потребления  
пищи и/или повышения прибавления в весе. Вещества, обладающие такой активностью,  
включают, но не ограничиваются, антитело, которое связывается с несфатиновым  
5 полипептидом и др., антисмысловой олигонуклеотид против гена, кодирующего  
указанный полипептид, антагонист PPAR $\gamma$  и подобные.

В качестве участка, регулирующего транскрипцию, может упоминаться промотор,  
10 энхансер, CAAT-бокс, обычно присутствующая в промоторной области, или TATA-бокс.  
В качестве репортерного гена могут использоваться хлорамфеникол-  
ацетилтрансферазный (CAT) ген, люциферазный ген, ген гормона роста и подобные.

В качестве клетки, в которую введен вектор, содержащий репортерный ген, могут  
15 упоминаться клеточная линия, выделенная или подученная из животных, клетки,  
полученные не от млекопитающих, таких как дрожжи, и подобные.

В качестве способа введения вектора, содержащего репортерный ген, в хозяина,  
20 могут быть проиллюстрированы биологический способ, физический способ, химический  
способ и подобные. В качестве биологического способа могут быть указаны способ, в  
котором используется вирусный вектор, способ, в котором используются специфичный  
25 рецептор, слияние клеток (Sendai virus (HVJ)), полиэтиленгликоль (PEG), электрическое  
слияние клеток, микронуклеарное слияние клеток (хромосомный перенос)), и подобные.  
Физический способ включает микроинъекционный способ, способ электропорации,  
способ бомбардировки клеток микрочастицами. Химический способ включает способ  
30 преципитации фосфатом кальция, способ с использованием липосом, способ с  
использованием DEAE-декстрана, способ с использованием протопластов, способ с  
теньями эритроцитов, способ с теньями мембран эритроцитов и микрокапсульный способ .

Полинуклеотиды, антитела, клеточные линии, или модели животных, требуемые  
35 для различных скрининг-способов настоящего изобретения, могут быть объединены  
предварительно для создания наборов. Эти наборы могут содержать, в качестве  
дополнительных элементов, субстратные соединения для применения в маркировании,  
40 среду или сосуд для культивирования клеток, положительный или отрицательный  
стандартный образец, и инструкции, описывающие способ при использовании набора.  
Элементы могут быть предварительно смешаны, при необходимости, и каждый элемент  
45 может содержать консерванты и/или антисептики, при необходимости.

Ниже приводится более детальное объяснение настоящего изобретения  
50 посредством Демонстрационных Примеров, однако необходимо отметить, что эти  
Примеры, во всяком случае, не ограничивают настоящее изобретение. В следующих  
Демонстрационных Примерах, если иное не указано, каждая процедура была выполнена в

соответствии со способами, описанными в "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., issued by Cold Spring Harbor Laboratory Press in 1989), или при использовании коммерчески доступных реагентов или наборов, они применялись, как описывается в инструкциях, приложенных к коммерчески доступным продуктам. В экспериментах с использованием животных, если иное не указано, животные (самцы крыс) содержались при освещении в течение 12 часового светового периода с 6 часов утра до 6 часов вечера и в течение 12 часового темного периода с 6 часов вечера до 6 часов следующего утра при 22°C, и эксперимент осуществляли в виварии Gunma University.

### ДЕМОНСТРАЦИОННЫЕ ПРИМЕРЫ

#### **Демонстрационный пример 1**

#### **Клонирование гена, индуцированного стимуляцией агониста PPAR $\gamma$**

Для идентификации гена, который вовлечен в контроль над потреблением пищи и/или массой тела, среди генов, чья экспрессия регулируется посредством PPAR $\gamma$ , клонировали гены, которые специфично индуцируются при стимуляции клеток линии SQ-5 (главным образом полученные из человека) агонистом PPAR $\gamma$ , и из них, выбирали гены, которые способны функционировать в качестве секреторного фактора.

Способ получения генов, чья экспрессия специфично индуцирована PPAR $\gamma$  при немелкоклеточном раке легких, был осуществлен в соответствии со способом Satoh et al., Oncogene (England), 2002, Vol. 21, pp. 2171-2180. Способ кратко описан ниже. Из каждой культуры SQ-5 (Riken BioResource Center RBC0110), культивированных в течение 48 часов при стимуляции  $10^{-4}$  М троглитазоном (Sankyo Co., Ltd.), агонистом PPAR $\gamma$ , и SQ-5 клеток, не стимулированных троглитазоном, получали poly(A)+РНК (мРНК), и подвергали реакции обратной транскрипции с получением двуспиральной кДНК. Выполняли субстракционный способ, в котором ген, экспрессированный совместно с кДНК («driver») при использовании клеток, которые экспрессированы в нестимулированных клетках, вычитается из кДНК («tester»), приготовленной из клеток, стимулированных троглитазоном при использовании полученной двуспиральной cDNA. Субстракционный способ осуществлялся при использовании фрагментов, полученных путем расщепления «tester» и «driver» кДНК рестрикционным ферментом RsaI и посредством набора для клонирования Clontech's на основе ПЦР в соответствии с приложенным протоколом. Остаточную кДНК после вычитания подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле в TAE буфере (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA), и затем собирали кДНК с длиной 0,5-2,0 т.п.о. и лигировали с вектором pGEM<sup>(R)</sup>-T Easy при использовании системы pGEM<sup>(R)</sup>-T Easy Vector System I (Promega Corp., Cat. No. A1360) в соответствии с приложенным протоколом. Лигированный вектор вводили в штамм DH5 $\alpha$  E. coli и обеспечивали

образование колоний на агаризованной среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, и отбирали полученные колонии для получения клонов, содержащих кДНК гена, экспрессия которого специфично индуцировалась посредством стимуляции троглитазоном.

Каждый клон был идентифицирован с помощью анализа нуклеотидной последовательности клонированной кДНК. *E. coli* каждого полученного клона культивировали в 10 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, с получением плазмиды из клеток при использовании набора QIAGEN's QIAprep<sup>(R)</sup> Spin Miniprep в соответствии с прилагаемым протоколом.

Для полученной плазмиды каждого клона, приготавливали реагент для анализа нуклеотидной последовательности при использовании T7 праймера (Promega Corp., Cat. No. Q5021) и набора BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (Cat. No. 4303149) от Applied Biosystems в соответствии с прилагаемым протоколом, и ее нуклеотидная последовательность анализировалась при использовании секвенатора DNA Sequencer типа ABI337 (Perkin-Elmer).

Путем представления нуклеотидной последовательности кДНК каждого клона в качестве запроса для метода BLAST с последовательностями в EMBL и базе данных нуклеиновых кислот Genbank, последовательность была получена для каждой известной последовательности полноразмерной кДНК.

Из последовательности полноразмерной кДНК, полученной в вышеуказанном процессе, анализировали кДНК, кодирующую белок, содержащий сигнальный пептид, с помощью программного обеспечения Signal P software с выбором секреторных факторов.

<Результат >

Клоны, полученные вычитанием кДНК клеток SQ-5, не стимулированных троглитазоном, при использовании кДНК, полученной из клеток SQ-5, стимулированных троглитазоном, составляли 596 клонов. Среди них для 213 клонов была отмечена заметная гомология с зарегистрированными последовательностями в последовательностях нуклеиновых кислот из EMBL и Genbank. Кроме того, при анализе сигнальных пептидов, предполагалось, что 9 клонов содержали сигнальную пептидную последовательность. Один из 9 клонов являлся человеческим геном NEFA, для которого не идентифицирована функция (SEQ ID NO: 1).

#### **Демонстрационный пример 2**

**Индукция экспрессии NEFA гена в культивированной клеточной линии посредством стимуляции агонистом PPAR $\gamma$**

Для проведения индукции экспрессии гена NEFA троглитазоном, клеточные линии HTB185 и SQ5, экспрессирующие PPAR $\gamma$ , и линия клеток жировой ткани 3T3-L1

анализировались на предмет экспрессии гена NEFA с помощью нозерн-блоттинга.

5 SQ-5 (Riken BioResource Center RBC0110) субкультивировали в среде ОБ/МИНИ  
 1640 (Invitrogen-BRL, Cat. No. 11875-085), содержащей 10% бычьей фетальную сыворотку  
 (Invitrogen-GIBCO). Клетки клеточной линии цереброспинальной бластоцитомы человека  
 НТВ185 (D283 Med: ATCC НТВ185) и клетки клеточной линии мышечных фетальных  
 10 фибробластов (предшественник жировой клеточной линии) 3Т3-L1 (ATCC CL-173), чья  
 дифференциация индуцировалась инсулином, дексаметазоном и IBMX, были  
 субкультивированы в среде DMEM (Invitrogen-GIBCO, Cat. No. 11955-040), содержащей  
 10% бычьей фетальную сыворотку.  $10^6$  клеток из каждой линии, суспендированных в 10  
 15 мл среды, помещали в чашку Петри диаметром 10 см. После прилипания клеток к  
 субстрату, добавляли только DMSO (контроль) или троглитазон (Sankyo Co., Ltd.) в  
 концентрации  $10^{-4}$  М,  $10^{-4.5}$  М или  $10^{-5}$  М, и культивировали при условии 5% CO<sub>2</sub> при 37  
 °С в течение 24 часов или 48 часов. Для каждой экспериментальной группы, клетки,  
 20 обработанные в 5 чашках, отскабливали от субстрата после определенного периода, и  
 экстрагировали общую РНК и собирали при использовании ISOGEN (Nippon Гена, Cat.  
 No. 317-02503) в соответствии со способом, описанным в протоколе.

25 Зонд для определения гена NEFA получали при использовании фрагмента ДНК с  
 565 п.о., указанным в SEQ ID NO: 21 путем мучения и транскрипции *in vitro* при  
 использовании полимеразы SP6. При использовании плазмиды, экстрагированной из  
 30 библиотеки кДНК, полученной из мозговых клеток мышей (Invitrogen Corp., Cat. No.  
 10655-25), в качестве темплата и нижеследующих праймеров в концентрации 0,2 мкМ,  
 получали амплифицированную ДНК путем 35 цикловой реакции, включающей  
 денатурацию при 94°C в течение 1,5 минут, отжиг при 58°C в течение одной минуты и  
 35 амплификацию при 72°C в течение 2 минут (Takara Bio Inc., Takara Ex Taq™ polymerase, с  
 использованием Cat. No. RR001A 2.5U).

ПЦР праймеры для получения зонда NEFA:

40 Прямой праймер : 5-CCAGTGGAAAATGCAAGGAT-3 (SEQ ID NO: 22)

Reverse праймер: 5-ТСТТТГСТТССГГГГАТГАТТА-3 (SEQ ID NO: 23)

После очистки полученного амплифицированного ДНК продукта, выполненной  
 при электрофорезе в 2% агарозном геле при использовании TAE буфера, продукт  
 45 субклонировали в вектор pGEM<sup>(R)</sup>-T Easy при использовании системы pGEM<sup>(R)</sup>-T Easy  
 Vector System I (Promega Corp., Cat. No. A1360) в соответствии с прилагаемым протоколом,  
 и вводили в DH5α E. coli формированием колоний на агарной среде, приготовленной со  
 50 средой LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Некоторые полученные колонии  
 изымали и E. coli культивировали в течение ночи в 10 мл среды LB, содержащей 50



мкг/мл ампициллина. Из клеток приготавливали плазмиду при использовании набора QIAGEN's QIAprep(R) Spin Miniprep в соответствии с прилагаемым протоколом. Реагент для анализа нуклеотидной последовательности приготавливали при использовании праймера T7 (Promega Corp., Cat. No. Q5021) или праймера SP6 (Promega Corp., Cat. No. Q5011) и набора BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (Cat. No. 4303149) от Applied Biosystems в соответствии с прилагаемым протоколом, и эту нуклеотидную последовательность анализировали при использовании ABI337 DNA Sequencer (Perkin-Elmer). Был получен клон, имеющий последовательность, соответствующую ожидаемой последовательности, и у которого 5'-конец амплифицированного гена, полученного из NEFA, обращен в сторону промотора T7 вектора, с получением плазмиды для приготовления зонда. Полученный клон культивировали в течение всей ночи в 10 мл среды LB содержащей 50 мкг/мл ампициллина, и плазмиду приготавливали из клеток при использовании набора QIAGEN's Plasmid Mini в соответствии с прилагаемым протоколом. Приготовленную плазмиду расщепляли рестрикционным ферментом NcoI, экстрагировали фенолом, очищали посредством фенол/СIАА экстракции, и после преципитации этанолом растворяли в 1 мкг/мл ТЕ буфере, свободном от рибонуклеаз (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, pH 8,0) с приготовлением теплатной плазмидной ДНК для приготовления зонда. Меченный РНК зонд приготавливали из 1 мкг теплатной плазмидной ДНК при использовании Promega's Riboprobe<sup>(R)</sup> System-SP6 с 2,5 мкМ [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (Amersham Biosciences Inc., Cat. No. PB10203, 3000 Ки/мМ, 10 мКи/мл) и 20 мкг РНК синтазы SP6 (входящей в состав набора) в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору.

Для электрофореза при нозерн-блоттинге, общая РНК, полученная из каждой клетки подвергалась электрофорезу при использовании 1,2% агарозного геля, приготовленного в MOPS буфере (20 мМ 3-(N-морфолин)-пропансульфоновой кислоты, 5 мМ ацетата натрия, 0,5 мМ EDTA), содержащего деионизированного 0,66 М формальдегида при 100 В в течение 2 часов. При использовании 10-кратной концентрации SSC (150 мМ NaCl, 15 мМ ацетата натрия), РНК переносили из геля после электрофореза на нейлоновую мембрану (Perkin-Elmer Inc., Gene Screen Plus<sup>(R)</sup> Hybridisation Transfer Membrane). РНК иммобилизовали к перенесенной мембране при помощи УФ при использовании Stratalinker фирмы Stratagene. Затем, нейлоновая мембрана подвергалась предварительной гибридизации в прегибридизационном растворе (0,25 М NaCl, 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 2,5 мМ EDTA, 1% SDS, 0,5% бычий сывороточный альбумин, 0,5% поливинилпирролидон, 0,5% Фиколл, 50% деионизированного формамида) при 43°C в течение 3 часов, и гибридизации в гибридизационном растворе (0,25 М NaCl, 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 2,5 мМ EDTA, 1% SDS, 0,5% бычий сывороточный альбумин, 0,5%

поливинилпирролидон, 0,5% Фиколл, 50% деионизированного формамида, 10% сульфата декстрана), содержащем 1000000 имп. в мин/мл меченого РНК зонда, при 43°C в течение  
 5 ночи. После промывания найлоновой мембраны двухкратным SSC после гибридизации,  
 дважды проводили промывание при жестких условиях 0,2-кратной концентрацией SSC,  
 содержащего 0,1% SDS, при 60°C в течение 30 минут. Найлоновая мембрана после  
 10 промывания экспонировалась в течение всей ночи на рентгеновский снимок (Kodak, XAR  
 film) в присутствии усиливающего экрана (Cronex, Lightning Plus), и детектировали  
 меченый РНК зонд, который гибридизовался.

<Результат >

15 Результат индикации гена NEFA в клеточной линии с помощью анализа нозерн-  
 блоттинга при использовании троглитазона (TGZ) показан на Фиг.1. Полосы 1-4  
 представляют результаты для клеток клеточной линии человеческого медуллобластомы  
 человека HTB185, которые экспрессируют PPAR $\gamma$ . Полосы 1 и 3 показывают определение  
 20 экспрессии NEFA гена с РНК клеток, культивированных (24 часа и 48 часов,  
 соответственно) без стимуляции клеток HTB185 TGZ, тогда как полосы 2 и 4 показывают  
 определение экспрессии NEFA гена с РНК клеток, стимулированных 10<sup>-4</sup> М  
 25 троглитазоном в течение 24 и 48 часов, соответственно. Как результат, только слабая  
 экспрессия NEFA гена была отмечена в клетках, не стимулированных TGZ (полосы 1 и 3),  
 при этом заметная индукция была отмечена в клетках, стимулированных TGZ в течение  
 48 часов (полоса 4). Полосы 5 и 6 на Фигуре представляют результат, полученный с  
 30 клетками линии SQ-5, которые экспрессируют PPAR $\gamma$ . Полоса 5 показывает определение  
 экспрессии гена NEFA с РНК SQ-5 клеток, культивированных без стимуляции TGZ, тогда  
 как 6 показывает определение экспрессии гена NEFA с РНК клеток, стимулированных 10<sup>-4</sup>  
 35 М TGZ в течение 24 часов. Как результат, низкий уровень экспрессии был отмечен для  
 клеток, не стимулированных TGZ (полоса 5), при этом заметная индукция экспрессии гена  
 NEFA была отмечена для клеток, стимулированных TGZ в течение 24 часов (полоса 6).  
 40 Кроме того, полосы 7-10 на Фиг.1 демонстрируют результаты для клеток клеточная линии  
 мышечных ветальных фибробластов (предшественника жировой клеточной линии) 3T3-L1,  
 которые экспрессируют PPAR $\gamma$ . Полоса 7 показывает определение экспрессии гена NEFA  
 с РНК клеток 3T3-L1, культивированных без TGZ стимуляции, тогда как полосы 8-10  
 45 показывают определение экспрессии гена NEFA с РНК клеток 3T3-L1, стимулированных  
 10<sup>-5</sup> М, 10<sup>-4.5</sup> М и 10<sup>-4</sup> М TGZ, соответственно, в течение часов. Как результат,  
 значительный уровень экспрессии гена NEFA был отмечен в отсутствие TGZ стимуляции  
 50 (полоса 7), и аналогичная экспрессия была получена при стимулировании 10<sup>-5</sup> М - 10<sup>-4</sup> М  
 TGZ, показывая, что NEFA ген экспрессируется постоянно, независимо от стимуляции

PPAR $\gamma$ .

### Демонстрационный пример 3

#### Приготовление антитела против NEFA и обнаружение экспрессии в мозге крыс

Секреторный белок, экспрессированный в жировых клетках, также экспрессируется в мозге и, вследствие чего, предложен в качестве мозговой жировой системы, которая способна оказывать действие при контроле над потреблением пищи (Masatomo Mori: Adipose Research (Shibou Kenkyu), 2004, Vol. 10, pp. 117-119, Shimizu H. and Mori M.: Nutritional Neurosci 8:7-20, 2005). Таким образом, антитело против NEFA, которое экспрессируется в жировых клетках и клетках опухоли мозга, способствует изучению локализованной экспрессии NEFA в гипоталамусе.

Для приготовления антитела против NEFA, в качестве антигена используется синтетический пептид (SEQ ID NO: 24: синтезированная на АТР К.К.), в котором Cys прикреплен к С-концу последовательности между His в положении 141 до Ser в положении 152 аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 8), предшественника крысиного полипептида NEFA (указанный пептид далее указывается как NAP пептид). NAP пептид: N-HisLeuAsnHisGlnAsnProAspThrPheGluSerCys-C (SEQ ID NO: 24).

Указанный синтетический NAP пептид был конъюгирован с гемоцианином лимфы моллюска (KLH) при использовании Imject<sup>(R)</sup> Maleimide Activated Mariculture Keyhole Limpet Hemocyanin от Pierce Inc. в соответствии с прилагаемым протоколом. Использовали 0,2 мг полученного пептида для одной процедуры иммунизации на кролика. Для иммунизации смешивали 0,25 мл конъюгатного раствора (концентрация конъюгат: 1 мг/мл) и эквивалентное количество полного адьюванта Фрейнда H-37 Ra (Wako Pure Chemical - Difco, Cat. No. 528-00031), и внутривенно инъецировали 50 мкл этой смеси в 8 разных местах на выбритой спине Новозеландских белых кроликов (купленных в Imai Experimental Animal Testing Site). Аналогично иммунизацию выполняли дополнительно 4 раза каждые две недели. Через одну неделю после последней иммунизации собирали часть крови и определяли титр антител в сыворотке с помощью анализа ELISA, используя иммобилизованный пептидный конъюгат. На следующий день животных умерщвляли, собирая при этом всю кровь. Из полученной крови приготавливали сыворотку. Из сыворотки выделяли кроличий IgG при использовании DEAE Sepharose FF (Amersham Biosciences Inc., Cat. No. 17-0709-10) в соответствии со стандартным способом. Выделенный кроличий IgG аффинно очищали при использовании колонки с иммобилизованным пептидом, которая приготавливалась из 1 мг NAP пептида при использовании набора SulfoLink (Pierce Inc., Cat. No. 44895) в соответствии с протоколом,

приложенным к набору.

При использовании полученного антитела (анти-NAP поликлональное антитело) против NAP пептида, анализировали экспрессию NEFA полипептида в мозгу крыс путем анализа вестерн-блоттинг.

Экстракты белка из мозга крыс приготавливали путем гомогенизации гипоталамуса (1,7 г) 8 недельных крыс Wistar (Nippan Charles River) в 5 мл экстракционного буфера (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40). Полученный лизат мозга крыс смешивали с эквивалентным количеством образцы буфера Laemmli (Bio-Rad Inc., Cat. No. 161-0737), содержащего 5%  $\beta$ -меркаптоэтанола, для проведения электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и нагревали при 100°C в течение 5 минут, и затем центрифугировали на микроцентрифуге при обычной температуре при 15000 об/мин в течение 10 минут, после чего собирали супернатант. 20 мкл супернатанта подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле (Bio-Rad Inc., Ready gel 10-20%, Cat. No. 161-J390V) при использовании буфера Tris-глицин/SDS (25 mM Tris, 192 mM глицин, 0,1% SDS, pH 8,3) при 100В в течение 1 часа, и затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану блокировали 3% раствором желатин/TBS при комнатной температуре в течение 1 часа, и washed трижды в TBS-0,05% Tween и однократно в TBS. Затем оставляли для взаимодействия в течение всей ночи при комнатной температуре в 1% растворе желатин/TBS, содержащем 1 мкг/мл анти-NAP поликлонального антитела. На следующий день, промывали трижды в TBS-0,05% Tween и однократно в TBS, и затем вносили конъюгат козье поликлональное антитело против IgG кролика - пероксидаза (Cappel Inc., Cat. No. 674371), разведенный до 1 мкг/мл в 1% растворе желатин/TBS при комнатной температуре течение 1 часа. Затем промывали трижды в TBS-0,05% Tween и дважды в TBS, и осуществляли окрашивание с использованием набора «HRP color development» (Bio-Rad Inc., Cat. No. 170-64631) при комнатной температуре в течение пяти минут и определяли полосы.

<Результат >

Фиг.2 А показывает схематическую диаграмму структуры NEFA полипептида и положение пептида, который применялся для приготовления антитела, в NEFA, и Фиг.2 В показывает результат вестерн-блоттинга экстрактов белка из мозга крыс с поликлональным антителом, приготовленным путем иммунизации с NAP пептидом. В вестерн-блоттинге экстрактов белка из мозга крыс с приготовленным поликлональным антителом против NAP пептида, единичная полоса определялась при молекулярной массе около 47,5 кДа (Фиг.2 В). Это означает, что антитело против NAP распознает

полноразмерный NEFA и что NEFA экспрессируется в мозге крыс.

#### Демонстрационный пример 4

##### Изучение участка экспрессии несфатина в гипоталамусе крыс

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Для анализа экспрессионного участка NEFA в гипоталамусе крыс, связанного с контролем потребления пищи, осуществляли иммуногистохимический анализ среза мозга крыс. Восьминедельным крысам Wistar (купленные у Nippon SLC) проводили анестезию путем интраперитонеального введения пентобарбитала натрия в дозе 40 мг/кг и затем осуществляли торакотомию с введением 50 мл физиологического раствора (0,85% NaCl) в сердце с последующим введением PBS, содержащего 4% параформальдегида (20 мМ фосфатного буфера, 150 мМ NaCl, pH 7,2), и прокачивали, используя 400 мл перистaltическую помпу, для перфузионного закрепления мозга. Затем мозг экстрагировали и удаленную часть, содержащую гипоталамус, фиксировали в течение всей ночи при 4°C в PBS, содержащем 4% параформальдегида. Образец фиксированного мозга погружали в PBS, содержащий 10% сахарозу в течение 4 часов, PBS, содержащий 10% сахарозу в течение 4 часов, и в PBS, содержащий 20% сахарозу в течение всей ночи при 4°C. Затем образец мозга погружали в компаунд OCT и замораживали в сухом ледяном ацетоне для приготовления залитого блока. Из приготовленного блока приготавливали срезы по 6 мкм толщиной при -20°C при использовании криостата, и затем высушивали на воздухе на стекле, покрытом силаном (MAS coat slide, приготовленный Matsunami). Тканевые срезы на стекле обрабатывали 3% раствором перекиси водорода в течение 5 минут и затем промывали дважды в PBS в течение 5 минут. Кроме того, тканевые срезы блокировали путем обработки 10% нормальной сывороткой козла (Nichirei Corp., Cat. No. 426042) при комнатной температуре в течение 10 минут, и затем вносили 1 мкг/мл поликлонального антитела (Демонстрационный пример 3) против NAP пептида, разведенного в PBS, содержащем 0,5% BSA, при комнатной температуре в течение 1 часа (Ab группа). После промывания стекла в PBS, стекло реагировало с Histofine Simple Stain Rat MAX PO (Nichirei Corp., Cat. No. 414181), и после трехкратного промывания в PBS в течение 5 минут каждое, осуществляли окрашивание при использовании раствора Simple Окрашивания DAB (Nichirei Corp., Cat. No. 415172). Стекло после окрашивания промывали в воде, и затем пропитывали Meyer-Hematoxylin (Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Cat. No. 3000), промывали водой, обезвоживали спиртом и просветляли в ксилоле, затем заключали при использовании безводного агента для заключения (Nichirei Corp., Cat. No. 415141) под покровным стеклом. Срез мозга на стекле после заключения изучали под микроскопом.

<Результат >

Фиг.3 показывает микроснимок (200 × увеличение) иммуногистохимического окрашивания антителом к NAR пептиду в срезе ткани гипоталамуса и участках третьего желудочка (3V) мозга крысы. Специфичное окрашивание наблюдается в Arc: дугообразном ядре, PVN: перивентрикулярном ядре, LH: латеральной гипоталамической области, SON: супраоптическом ядре гипоталамуса на фигуре, показывающей экспрессию NEFA в этих участках. Из вышесказанного, продемонстрировано, что NEFA полипептид экспрессируется в гипоталамусе крыс, а именно в дугообразном ядре, перивентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области и в супраоптическом ядре.

Поскольку экспрессия NEFA полипептида, кодируемого NEFA геном, отмечалась на участках, связанных с контролем над потреблением пищи в гипоталамусе, указанный полипептид был назван несфатин.

### **Демонстрационный пример 5**

#### **Приготовление рекомбинантного несфатина**

Для подтверждения свойств несфатина, экспрессируемого в нервном ядре гипоталамуса, связанных с потреблением пищи, приготавливали рекомбинантный несфатин в *E. coli*. Рекомбинантный зрелый мышинный несфатин (SEQ ID NO: 26) очищали путем экспрессии слитого белка (рекомбинантный мышинный GST-NEFA: SEQ ID NO: 25), в котором глутатион-S-трансфераза (GST) связана с N-концом мышинного зрелого несфатина (SEQ ID NO: 6), и обрабатывали слитой белок протеазой. Уровень гомологии аминокислотного уровня крысиного несфатина и мышинного несфатина составлял до 96,5%.

Ген для экспрессии рекомбинантного мышинного GST-NEFA приготавливали при использовании плазмиды, экстрагированной из библиотеки кДНК, полученной из мышинного мозга (Invitrogen Corp., Cat. No. 10655-25), в качестве матрицы и при использовании праймеров, приведенных ниже (0,25 мкМ каждого) в реакции денатурации при 94°C в течение 1,5 минут, с последующими пятью циклами реакции, включающей денатурацию при 94°C в течение 0,5 минут, отжиг при 60°C в течение 0,5 минут и удлинения при 72°C в течение 2 минут с последующими 30 циклами реакции, включающей денатурацию при 94°C в течение 0,5 минут, отжиг и удлинение при 72°C в течение 2 минут, для приготовления амплифицированной ДНК (полимераза PfuTurbo<sup>(R)</sup> Stratagene, Cat. No. 600250).

ПЦР праймеры для приготовления кДНК рекомбинантного зрелого мышинного NEFA

Прямой праймер: 5-TTGGATCCGTTCCSTATCGATGTGGACAAGAC-3 (SEQ ID

NO: 27)

Обратный праймер: 5-TTGCGGCCGCTTATGTGTGTGGCTCAAACCTTCAG-3 (SEQ ID NO: 28)

5 Полученный продукт ПЦР очищали при применении набора QIAGEN's MinElute PCR Purification Kit, расщепляли рестрикционными ферментами *Vam*HI и *Not*I, и полоса  
10 около 1,3 т.п.о. была разделена путем электрофореза в 2% агарозном геле сTAE и фрагмент ДНК был собран (QIAGEN's MinElute Gel Extraction kit , Cat. No. 28604).  
Фрагмент ДНК в 1,3 т.п.о. DNA лигировали с вектором pGEM-11Zf(+) (Promega, P2411),  
15 который расщеплялся рестрикционными ферментами *Vam*HI и *Not*I, который был перенесен в штамм *E. coli* DH5 $\alpha$  (Takara Bio Inc., Cat. No. 9057), и использовали для образования колоний на агаризованной среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина.

Некоторые полученные колонии отбирали, и для плазмиды, приготовленной из  
каждого клона, анализировали нуклеотидную последовательность при использовании  
20 прямого праймера pUC/M13 (Promega Corp., Cat. No. Q5391), обратного праймера pUC/M13 (Promega Corp., Cat. No. Q5401), двух типов праймеров mSQ1 (5-CCTGAACCACCAGAAATCC-3: SEQ ID NO: 29) и mSQ2 (5-AGACTGATGGATTGGACC-3:  
25 SEQ ID NO: 30) в последовательности мышиноного NEFA гена, и при использовании набора BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Cat. No. 4303149) от Applied Biosystems и ДНК секвенатора ABI337 (Perkin-Elmer). Клоны, которые демонстрировали,  
30 что содержат нуклеотидную последовательность соответствующую SEQ ID NO: 11 посредством анализа нуклеотидной последовательности, культивировали в течение всей ночи в 10 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, и плазмиды приготавливали из клеток при использовании набора QIAGEN's QIAprep<sup>(R)</sup> Spin Miniprep Kit в соответствии с прилагаемым протоколом.

35 Плазмиды, расщепленные рестрикционными ферментами *Vam*HI и *Not*I, подвергали электрофорезу в 2% агарозном геле с TAE, полоса в 1,2 т.п.о. разделялась с получением ДНК. Полученные фрагменты ДНК лигировали с вектором pGEX-4T-1  
40 (Amersham Biosciences Inc., Cat. No. 27-4580-01), который расщеплялся рестрикционными ферментами *Vam*HI и *Not*I, и который трансформировали в штамм *E. coli* BL21 (Amersham Biosciences Inc., Cat. No. 27-1542-01) при использовании системы для электропорации Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Inc., Cat. No. 165-2660J1) для образования колоний на агарной  
45 среде, приготовленной с LB средой, содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Полученную путем трансформации рекомбинантную *E. coli* подтверждали на предмет присутствия или отсутствия инсерции путем ПЦР при использовании последовательности праймера pGEX5' и последовательности праймера pGEX3' (Amersham Biosciences Inc., Cat. No. 27-  
50

1410-01 и 27-1411-01), и NEFA гена подтверждали путем PCR при использовании набора ПЦР праймеров для приготовления зонда NEFA, использующегося в Демонстрационном примере 2. Клоны, для которых было подтверждено, что зрелая NEFA кДНК интегрирована в вектор pGEX-4T-1, использовали для экспрессии рекомбинантного мышиного белка GST-NEFA. Клоны культивировали в течение всей ночи при 37°C с 10 мл LB среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и 5 мл из этого добавляли к 500 мл LB среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и культивировали при перемешивании при 37°C до тех пор пока поглощение при длине волны 600 нм не составит 0,6 (отделяли некоторые бактерии: преиндуцированные бактерии). К среде добавляли изопропил-β-D-тиогалакто-пиранозид (IPTG: Gibco BRL) до конечной концентрации 1 мМ, и затем культивировали при перемешивании при 37°C в течение 3 часов. После культивирования, среду, содержащую клетки, центрифугировали при 5000g при 4°C в течение 15 минут для сбора клеток, которые были суспендировали в 25 мл PBS. Суспензию замораживали при -80°C в течение 1 часа, с последующим размораживанием при 37°C, и клетки обрабатывали ультразвуком в течение 30 секунд x пять раз для разрушения клеток. Затем осуществляли центрифугирование при 10000g при 4°C в течение 30 минут со сбором супернатанта (отбирали осажденную фракцию: осадки, после обработки ультразвуком).

Супернатант применяли для 5 мл-размерной колонки GSTrapFF (Amersham Biosciences Inc., Cat. No. 17-5131-01), уравновешенной PBS при использовании системы для жидкостной хроматографии АКТА-FPLC (Amersham Biosciences Inc.), и затем колонку промывали 50 мл PBS (скорость потока : 1 мл/мин). Затем элюционный буфер (10 мМ восстановленного глутатиона, 0,4 М Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 М NaCl) пропускали при скорости потока 1 мл/мин с получением 1 мл фракций, и были получены фракции, содержащие белок, как было выявлено при определении поглощения при длине волны 280 нм, (фракция, имеющая наибольшее поглощение при 280 нм: очищенная GST-NEFA). Часть из каждой предварительно инкубированной бактериальной фракции, фракции из пеллеты, после обработки ультразвуком и очищенной GST-NEFA фракции разбавляли в буфере для образцов Laemmli (Bio-Rad Inc., Cat. No. 161-0737), содержащем 5% β-меркаптоэтанол, обрабатывали при 100°C в течение 5 минут и центрифугировали в микроцентрифуге при 15000 об/мин в течение 5 минут с получением супернатанта, который подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле (Bio-Rad Inc., Ready gel 10-20%, Cat. No. 161-J390V) при 100 В в течение 1 часа при использовании буфера Tris-глицин/SDS и затем окрашивали в кумасси бриллиантовом голубом (Bio-Rad Inc., Bio-Safe CBV G-250, Cat. No. 161-0786). Для большинства очищенной GST-NEFA фракции,



восстановленный глутатион удаляли из образца при использовании колонки для жидкостной хроматографии HiTrap Desalting (Amersham Biosciences Inc., Cat. No. 17-1408-01), уравновешенной PBS, и образец использовался снова в 5 мл колонке GSTrapFF, уравновешенной PBS. Затем колонку промывали 25 мл PBS при скорости потока 1 мл/мин, с пропуском через колонку 15 мл протеазного реакционного буфера (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, mM DTT), и добавляли 4,6 мл протеазного реакционного буфера, содержащего 20 мкг/мл тромбина (Amersham Biosciences Inc., Cat. No. 27-0846-01). Когда весь объем внесли в колонку, остановили насос для жидкостной хроматографии и реакция с протеазой выполнялась при комнатной температуре (22°C) в течение всей ночи. На следующий день, 15 мл PBS пропускали через колонку при скорости потока 1 мл/мин с получением фракций, и полученные фракции пропускались через колонку HiTrap Benzamidin FF (Amersham Biosciences Inc., Cat. No. 17-5143-02) с получением фракции, в которой тромбин был удален (предварительно очищенный образец). Фракцию фракционировали с помощью хроматографии с анионообменной смолой для очистки рекомбинантного зрелого мышечного NEFA полипептида. Предварительно очищенный образец (20 мл) был разбавлен 5-кратным Буфером А (20 mM bis-Tris, pH 6,5, 0,1 M NaCl, 0,1% CHAPS), и использовался в колонке HiTrap Q HP (Amersham Biosciences Inc., Cat. No. 17-1153-01), уравновешенной Буфером А, с последующим промыванием Буфером А при скорости потока 1 мл/мин (1 мл фракции было собрано: Промывочный образец). Промытую колонку элюировали при использовании Буфера А и Буфера В (20 mM bis-Tris, pH 6,5, 1M NaCl, 0,1% CHAPS) с линейным градиентом концентрации 0-50%/60 минут Буфера В при скорости потока 0,5 мл/мин. В это время собирали фракции 0,5 мл, и были собраны фракции, содержащие белок, как определено поглощением при длине волны 280 нм (Очищенный образец). Часть каждого из образцов (предварительно очищенный образец, промывочный образец, очищенный образец), полученная при таком процессе очистки, была взята, и была смешана с равным количеством буфера для образцов Laemmli, содержащего 5% β-меркаптоэтанол, с последующим нагреванием до 100°C в течение 5 минут, и затем осуществляли анализ вестерн-блоттинг таким же образом, как описано в Демонстрационном примере 3. Фракцию подвергали с получением очищенного зрелого мышечного полипептида NEFA.

#### <Результат >

Панель А на Фиг.4 показывает окрашенное изображение SDS-PAGE образца, полученного в результате экспрессии GST-NEFA слитого белка в рекомбинантной E. coli и очистки GST-NEFA слитого белка с применением колонки GSTrapFF. Панель В

показывает результат вестерн-блоттинга образца, полученного путем вырезания зрелого мышинового полипептида NEFA из GST-NEFA слитого белка при помощи тромбина и очистки с помощью колонки HiTrap Q HP, при использовании анти-NAP поликлонального антитела. На панели А на Фиг.4 отмечено значительное повышение продукта с молекулярной массой 65 кДа в осадке, образованном после обработки ультразвуком, где клетки были разрушены после индукции экспрессии с IPTG (дорожка 3), по отношению к образцу предварительно инкубированной бактерии (дорожка 2). Так как продукт с 65 кДа также отмечен во фракции (очищенный образец), очищенной при использовании колонки GSTrapFF, то это показывает, что рекомбинантный мышинный GST-NEFA слитой белок экспрессировался в рекомбинантной E. coli. На панели В на Фиг.4 некоторые полосы были отмечены в образце перед очисткой (Предварительно очищенный образец) в дополнение к полосе зрелого мышинового NEFA полипептида с молекулярной массой 47,5 кДа, расщепляемого тромбином, и полосе рекомбинантного мышинового GST-NEFA слитого белка с молекулярной массой 65 кДа. С другой стороны, в очищенном образце, были отмечены основная полоса с молекулярной массой 47,5 кДа и более слабая полоса с молекулярной массой 65 кДа, указывающие что был получен практически чистый рекомбинантный зрелый мышинный полипептид NEFA.

#### **Демонстрационный пример 6**

#### **Изучение эффекта внутрижелудочкового введения несфатина на пищевое поведение**

Для иллюстрации эффекта полученного рекомбинантного несфатина на пищевое поведение животных был проведен эксперимент, в котором крысам, не подвергнутым анестезии, вводили его интравентрикулярно в третий желудочек.

Используемые крысы являлись крысами линии Wistar (купленные у Nippon SLC), и животные содержались при освещении в течение 12 часового светового периода с 6 часов утра до 6 часов вечера и в течение 12 часового темного периода с 6 часов вечера до 6 часов следующего утра и питались порошком (Nippon Clea, CE-2) при 22°C, и такие условия поддерживались при проведении всего эксперимента. Для эксперимента, среди 8-9 недельных самцов крыс Wistar использовались те индивидуумы, чей вес составлял 200-250 г. Для введения, вводили на одного индивидуума 5 мкл раствора хлорида натрия (контроль) или рекомбинантного несфатина, приготовленного в Демонстрационном Примере 5, растворенного до 0,2 пмоль, 0,6 пмоль и 3,0 пмоль в 5 мкл PBS (N=5 для каждой группы). Крысы получали интраперитонеальное введение пентобарбитала натрия в концентрации 40 мг/кг массы тела для анестезии. После того, как волосы были убраны с головы, их фиксировали в стереотаксическом аппарате для исследования мозга (David

Kopf Instruments, Model 962), снимали скальп и вводили иглу размером 23G (игла-проводник) до достижения третьего желудочка (2,5 мм от темя, 9,5 мм от поверхности).  
5 Через одну неделю после введения иглы-проводника, животные подвергались исследованию. После восстановления от операции, 29G канюля для инъекций вводилась в иглу-проводник под анестезией, и вводили 5 мкл PBS или раствора зрелого мышиног  
10 несфатина в PBS при скорости 1 мкл/секунду. После фиксации канюли на том же месте в течение 2 -3 минут после введения, канюлю убрали и животных возвращали в индивидуальные клетки. Через один, три и шесть часов, определяли вес корма для подсчета количества потребленной пищи, что использовали в качестве показателя  
15 пищевого поведения. Для изучения значимой разницы, применяли дисперсионный анализ.

#### <Результат >

Количество потребленной пищи через 0-1 часа после введения 0 (PBS только), 1, 4  
20 и 20 пмоль рекомбинантного несфатина в третий желудочек показано графически на панели А на Фиг.5, количество потребления пищи через 1-3 часа после введения показано графически на панели В на Фиг.5, и количество потребления пищи через 3-6 часов после введения показано графически на панели С на Фиг.5. Для любого из 0-1, 1-3 и 3-6 часов,  
25 было отмечено снижение в количестве потребления пищи дозозависимым образом в группе, которой вводили рекомбинантный несфатин, по сравнению с крысами, которым вводили только раствор хлорида натрия. А именно, в группе, которой вводили 20 пмоль рекомбинантного несфатина, отмечалась значительное снижение активности потребления  
30 пищи в каждом из 0-1 часа/1-3 часов /3-6 часов (для каждого  $P < 0.01$ ) по сравнению с контрольной группой. Эти данные показывают, что несфатин в мозге обладает эффектом по подавлению пищевого поведения.

#### Демонстрационный Пример 7

##### **Изучение эффекта интравентрикулярного введения анти-несфатинового антитела на пищевое поведение**

40 Для иллюстрации эффекта несфатина на контроль над потреблением пищи, был изучен эффект на пищевое поведение при введении антитела против несфатина в третий желудочек.

Используемое антитело являлось антителом к NAP пептиду (NAP IgG),  
45 приготовленным в Демонстрационном примере 4, и 5 мкл антитела, растворенного в растворе хлорида натрия вводили крысам (доза 5 мкг). В качестве контроля, вводили IgG в аналогичном количестве и концентрации (контрольный IgG), выделенный из неиммунизированных кроликов. Используемые крысы являлись крысами линии Wistar  
50 (купленные у Nippon SLC), и содержались так же, как указано в Демонстрационном

5 примере 6. Среди 8-9 недельных самцов крыс Wistar выбирались те индивидуумы, чей вес составлял 200-250 г. Время введения было перед началом светового периода, когда наблюдается невысокое пищевое поведение, и способ введения аналогичен таковому, 5  
указанному в Демонстрационном примере 6. В течение периода 0 -3 часов , 3-6 часов, или 6-9 часов после внутри-церебровентрикулярного введения, определяли вес порошкового корма. Для изучения значимой разницы, применяли дисперсионный анализ.

10 <Результат >

Для крыс, получившим интравентрикулярное введение контрольного IgG или анти-несфатинового антитела (NAP IgG), количество потребления пищи в период 0-3 часов 15  
после введения графически показан на панели А на Фиг.6, количество потребления пищи в период 3-6 часов после введения графически показан на панели В на Фиг.6 и количество потребления пищи в период 6-12 часов после введения графически показан на панели С на Фиг.6. Было продемонстрировано, что у индивидуумов, которые получали интра- 20  
церебровентрикулярное введение анти-несфатинового антитела, потребление пищи в течение 0-3 часов (А на Фиг. 6) и 3-6 часов (В на Фиг.6) повышалось статистически значимым образом (для каждого  $P < 0.001$ ). Количество потребляемой пищи крысами из 25  
группы, которым вводили анти-несфатиновое антитело, увеличилось в 9 раз в течение периода 0-3 часов (А на Фиг.6), и в 10 раз в течение 3-6 часов, соответственно, по сравнению с группой с введением контрольного IgG в течение соответствующих периодов. Однако, поскольку период 6-9 часов приходился на темный период и потребление пищи 30  
начиналось в группе с введением контрольного IgG-administакрысion группу , то значимых различий не отмечалось. Таким образом, поскольку введение анти-несфатинового антитела повышает потребление пищи крысами, то было показано, что 35  
анти-несфатиновое антитело подавляет действие эндогенного несфатина и что несфатин вовлечен в пищевое поведение.

#### Демонстрационный пример 8

#### 40 Изучение экспрессии гена NEFA в гипоталамусе крыс и действие голодания на экспрессию

Проводили гибридизацию *in situ* для определения действия голодания на изменения экспрессии эндогенного NEFA гена.

45 Зонд, используемый для гибридизации *in situ* в ткани мозга, являлся плазмидой для приготовления NEFA зонда, которую получали в Демонстрационном примере 2. При использовании 1 мкг указанной плазмиды, расщепленной рестрикционным ферментом NcoI и очищенной, приготавливали зонд кРНК, меченный DIG, путем взаимодействия 50  
SP6-РНК транскриптазы с использованием набора для мечения Digoxigenin (DIG) РНК

labelling kit (Roche Diagnostics K.K., Cat. No. 1175025). Реакция cSP6-РНК транскриптазы осуществлялась при 40°C в течение 2 часов. После завершения, 2 мкл 0,2 М EDTA (рН 7,0) добавляли к 20 мкл реакционной смеси для остановки реакции. Затем добавляли 2,5 мкл 3М LiCl и 75 мкл этанола, охлажденного при -20°C, и смешивали, оставляли при -20°C в течение центрифугировали всей ночи. На следующий день, реакционную смесь в микроцентрифуге при 4°C и 15000 об/мин в течение 2 0 минут и удаляли супернатант. После добавления 50 мкл 70% этанола к осадку и центрифугирования, супернатант удаляли и осадок высушивали. Осадок растворяли в воде, обработанной DEPC- (Nippon Gene K.K., Cat. No. 314-90205), и определяли количество РНК путем электрофореза вагарозном геле, затем разбавляли в DEPC-обработанной воде до концентрации РНК около 0,1 мг/мл. Для сокращения длины (около 450 оснований) полученного кРНК зонда , добавляли 10 мкл DEPC-обработанной воды и 40 мкл карбонатного буфера (60 мМ карбоната натрия, 40 мМ бикарбоната натрия, рН 10,2) к 10 мкл раствора РНК при 0,1 мг/мл, и оставляли для взаимодействия при 60°C в течение 30 минут. К реакционной смеси добавляли 60 мкл раствора для нейтрализации (3 М ацетата натрия, 1% раствор уксусной кислоты, рН 6,0), и затем добавляли 360 мкл этанола, охлажденного до -20°C, и перемешивали, затем осуществляли центрифугирование на микроцентрифуге при 4°C и 15000 об/мин в течение 20 минут, которая предварительно была охлаждена до -70°C в течение 30 минут до установки 4°C, и супернатант убирала для получения осадка. После добавления 100 мкл 70% этанола (-20°C) к осадку и последующего центрифугирования, супернатант удаляли и преципитат высушивали. Сухой преципитат разбавляли 100 мкл DEPC-обработанной водой, и определяли концентрацию с помощью электрофореза в агарозном геле. Концентрация полученного зонда составляла около 50 мкг/мл. DIG-меченный NEFAsРНК зонд, полученный таким образом, использовался для гибридизации in situ.

8 - недельные самцы крыс Wistar (купленные у Nippon SLC) (массой тела 220-250 г) были сгруппированы по индивидуумам (Normal), которые могут принимать порошковую пищу вволю, индивидуумам (Starvation), которые принимали 48 часов питьевую воду без какой-либо еды, индивидуумам (Re-feeding), которые не принимали еду в течение 36 часов и затем им давали еду без ограничений в течение 12 часов, и мозг каждого перфузионно фиксировали в PBS, содержащем 4% параформальдегид, способом, аналогичным описанному в Демонстрационном примере 5 и мозг экстрагировали. Из экстрагированного мозга отделяли часть, которая содержала гипоталамус, которую в дальнейшем фиксировали в PBS содержащем 4% параформальдегиде при 4°C в течение

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50

всей ночи. Фиксированный мозг обрабатывали криостатом способом, аналогичным описанному в Демонстрационном примере 4, для приготовления срезов толщиной 10 мкм, которые помещали на стекло, покрытое силаном. Стекло со срезом ткани мозга помещали в инкубатор и обрабатывали при 50°C в течение 2 минут, и затем срезы высушивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Срезы фиксировали снова в PBS, содержащем 4% параформальдегид, при комнатной температуре в течение 7 минут, и затем промывали в PBS в течение 3 минут и в 2-кратном концентрированном SSC дважды в течение 5 минут.

Раствор для гибридизации *in situ* (4-кратный концентрированный SSC, 10% сульфат декстрана, 1-кратный раствор Денхардта, 2 мМ EDTA, 50% деионизованный формамид, 500 мкг/мл ДНК спермы лосося) доставлялся для покрытия среза мозговой ткани на стекле и предварительно гибридизировали при 37°C в течение 1 часа. После завершения прегибридизации, доставленная жидкость удалялась, и раствор для гибридизации *in situ*, содержащий 200 нг/мл DIG-меченного NEFA кРНК зонда доставлялось для покрытия ткани, и затем осуществляли гибридизацию во влажной камере при 37°C в течение 16 часов. Стекло, содержащее помещенный в на него срез ткани мозга, после гибридизации промывали в 2-кратном концентрированном SSC при 37°C в течение 5 минут, и затем промывали при 37°C трижды в течение 5 минут в 0,2-кратном концентрированном SSC, содержащем 60% формамид, и затем при комнатной температуре дважды в течение 5 минут в 2-кратном концентрированном SSC.

Зонд, который гибридизировали в ткани мозга, после промывания определяли при использовании набора DIG Nucleic Acid Detection kit (Roche Diagnostics K.K., Cat. No. 11175041), и описание способа следует ниже. Стекло, содержащее помещенный в на него срез ткани мозга, промывали в 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5) буфере, содержащем 150 мМ NaCl, при комнатной температуре в течение 5 минут и блокировали при использовании того же буфера (блокирующий буфера), насыщенного с блокирующим реагентом, входящим в состав набора, при комнатной температуре в течение 30 минут. На стекло помещали конъюгат антитело к DIG-щелочная фосфатаза, входящий в состав набора, разбавленный до концентрации 1/200 в блокирующем буфере, и оставляли для протекания реакции при комнатной температуре в течение 2 часов. Стекло после реакции промывали дважды в 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5) буфере, содержащем 150 мМ NaCl, в течение 5 минут, и затем промывали в детектирующем буфера (100 Tris-HCl, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>) в течение 10 минут. Затем, помещали детектирующий буфер, содержащий 0,18 мг/мл BCIP и 0,34 мг/мл NBT, и оставляли для реакции при комнатной температуре в течение 16 часов для проявления цвета. Стекло промывали в 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 1мМ EDTA, в течение 5 минут для остановки реакции развития окраски.

Затем стекло промывали в дистиллированной воде в течение 5 минут, и окрашивали 1% метиленовым зеленым в течение 5 минут, промывали в дистиллированной воде обезжировали в спирте и просветляли в ксилоле, и заключали при использовании безводного заключающего агента (Nichirei Corp., Cat. No. 415141) под покровным стеклом. Затем изучали под микроскопом.

<Результат >

Относительно контрольной группы, показанной на панели А на Фиг.7, наблюдалось значительное снижение экспрессии несфатиновой мРНК в перивентрикулярном ядре (PVN) в случае 48 часового голодания, что показано на панели В на Фиг.7, и как показано на панели С на Фиг.7, продемонстрировано, что экспрессия несфатинового мРНК гена восстанавливалась при возобновлении питания после голодания. Эти результаты показывают, что эндогенный несфатин вовлечен в контроль над потреблением пищи.

#### **Демонстрационный пример 9**

##### **Изучение экспрессии несфатина в мозге голодающих крыс**

Изменения эндогенного несфатина при голодании изучали путем иммуногистологического окрашивания.

8-недельные самцы крыс Wistar (купленные у Nippon SLC) (массой тела 220-250 г) были сгруппированы в контрольную группу, которые могли принимать порошковую пищу вволю, и голодающую группу, которые голодали в течение 24 часов, и срез ткани мозга этих крыс приготавливали для анализа путем иммуногистохимического окрашивания при использовании анти-несфатинового антитела. Приготовление тканевых срезов и иммуногистологическое окрашивание осуществляли таким же способом, который описан в Демонстрационном примере 4. Кроме того, для изучения состояния активации нервных клеток в участках мозга, связанных с потреблением пищи, иммуногистохимический анализ осуществляли на ткани мозга голодающей группы при использовании антитела против c-Fos. Способ осуществляли при использовании 500-кратно разбавленного c-Fos (K-25) антитела (Santa Cruz Biotechnology, sc-253) вместо анти-несфатинового антитела способом, аналогичным описанному выше.

<Результат >

Микроснимок (200 × увеличение) иммуногистохимического окрашивания с анти-несфатиновым антителом (NAP Ab) гипоталамуса контрольной группы показан на панели А на Фиг.8, микроснимок (такое же увеличение как для А) иммуногистохимического окрашивания с анти-несфатиновым антителом (NAP Ab) гипоталамуса голодающей группы показан на панели В на Фиг.8, и микроснимок (аналогичное увеличение, что и для

А) иммуногистохимического окрашивания с анти-c-Fos антителом гипоталамуса голодающей группы показан на панели С на Фиг.8. Верхняя половина фигуры показывает изображение перивентрикулярного ядра, и нижняя часть показывает изображение дугообразного ядра. В гипоталамусе голодающей группы по сравнению с контрольной группой интенсивность окрашивания в перивентрикулярном ядре (верхняя часть фигуры) и дугообразного ядра (нижняя часть фигуры) значительно снижена, показывая, что экспрессия несфатина снижена у голодающих. В состоянии, при котором аппетит повышен, отмечена экспрессия c-Fos белка. Из чего можно предположить, что, в состоянии, при котором аппетит повышен вследствие голодания, экспрессия несфатина, как предполагается, что повышает действие по подавлению аппетита, снижена и ответственна за контроль над аппетитом.

### **Демонстрационный пример 10**

#### **Приготовление несфатин-1, несфатин-2, несфатин-3 и несфатин-2/3 полипептида, и приготовление антитела против несфатин-1, несфатин-3 и несфатин-2/3 пептида**

В Демонстрационных примерах 3-9, показано, что несфатин обладает эффектом экспрессии в гипоталамусе мозга и вовлечен в контроль над потреблением пищи и массой тела. Также, в качестве предшественника несфатина содержит сигнальный пептид, несфатин способен секретироваться внеклеточно вне клетки. Известно, что некоторые активные белки расщепляются прогормон-конвертазой (PC) в пост-трансляционный процесс. Таким образом, было исследовано, присутствует или нет последовательность Arg-Arg или последовательность Lys-Arg, которые являются последовательностями на сайте расщепления прогормон-конвертазы, присутствующего у мышинных, крысиных и человеческих NEFA последовательностей. Как результат было обнаружено, что в целом в мышинных, крысиных и человеческих NEFA последовательностях, последовательность Lys-Arg присутствовала в аминокислотных положениях 107 и 108 на N-конце и в положениях 199 и 200, и последовательность Arg-Arg присутствовала в положениях 188 и 189 (Фиг.9А). Таким образом, среди несфатинных последовательностей, пептид, содержащий 82 остатков, соответствующих аминокислотам № 25 – 106, был назван несфатин-1 (SEQ ID NO: 15), пептид, содержащий 79 остатков, соответствующих аминокислотам № 109 – 187, был назван несфатин-2 (SEQ ID NO: 16), и пептид, содержащий 231 остатков, соответствующих аминокислотам № 190 – 420, был назван несфатин-3 (SEQ ID NO: 17). В этом случае ДНК-связывающий участок (аминокислоты № 171-223), который имеет известную доменную структуру, разделялся на несфатин-2 и несфатин-3, нектин-связывающий участок (аминокислоты № 213-420),



кальцийсвязывающий участок (аминокислоты № 254-265 и 306-317) и Asp/Glu-участок (аминокислоты № 306-317) входят в состав последовательности несфатина-3, но известные домены не входят в состав последовательности несфатин-1 (Фиг.9B).  
 5 Вследствие чего часть последовательности, содержащая несфатин-2 и несфатин-3, была названа несфатин-2/3 (SEQ ID NO: 47). Синтез крысиного несфатин-1 пептида (SEQ ID NO: 15) и несфатин-2 пептида (SEQ ID NO: 16) осуществлялся в Yanaihara Institute Inc.,  
 10 где их синтезировали путем твердофазного синтеза и очищали путем обратной жидкостной хроматографии. кДНК, приготовленные из мозга крыс, амплифицировали при использовании праймеров, указанных в SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 49, с получением ДНК (SEQ ID NO: 50), и затем ДНК использовали для приготовления несфатин-3 пептида (SEQ ID NO: 17), в Post Genome Institute Co., Ltd. (Shimizu Y. et al.: Nature Biotech 19: 751-755, 2001), путем синтеза белков в бесклеточной системе.

Используемые ПЦР праймеры:

20 Прямой Праймер: 5'-ATGGAGTATTТАААААСGCTGAGTGAG-3' (SEQ ID NO: 48)

Обратный Праймер: 5'-ТТАТGTGTGTGGCTCAAАСТТСА-3' (SEQ ID NO: 49)

Несфатин-3, приготовленный таким образом, имеет последовательность, в которой Met добавлен к N-концу (SEQ ID NO: 51).  
 25

Аналогичным образом, кДНК, полученная из мозга крыс, амплифицировали при использовании праймеров, указанных в SEQ ID NO: 52 и 53 для получения ДНК (SEQ ID NO: 50), для получения ДНК (SEQ ID NO: 54), и затем ДНК использовали для приготовления несфатин-2/3 (SEQ ID NO: 47), путем синтеза белков в бесклеточной системе.  
 30

Используемые ПЦР праймеры:

35 Прямой Праймер: 5'-ATGGAAGAAGTAGGAAGACTGAGAA-3' (SEQ ID NO: 52)

Обратный Праймер: 5'-ТТАТGTGTGTGGCTCAAАСТТСА-3' (SEQ ID NO: 53)

Также, для приготовления антител для областей, отличных от тех для антител к NAP пептиду, приготовленных в Демонстрационном примере 3, готовили последовательность, в которой Cys добавлен к C-концу последовательности соответствующей аминокислотам № 24-38 (соответствующим аминокислотам № 48-62 мышинового предшественника NEFA полипептида из SEQ ID NO: 5) NAP-1 пептида (NAP-1Ab: SEQ ID NO: 32), последовательности соответствующей аминокислотам № 1-9 (соответствующим аминокислотам № 190-198 мышинового предшественника NEFA полипептида из SEQ ID NO: 5) NAP-3, и последовательность, в которой Cys добавлен к C-концу последовательности соответствующей аминокислотам № 136-149 (соответствующим аминокислотам № 325-338 мышинового предшественника NEFA  
 40  
 45  
 50

полипептида из SEQ ID NO: 5) NAP3 пептида (NAP-1 Ab: SEQ ID NO: 33 и NAP-1 Ab: SEQ ID NO: 34).

5 NAP-1 Ab: N-ProAspThrGlyLeuTyrTyrAspGluTyrLeuLysGlnValIleCys-C (SEQ ID NO: 32)

NAP-C1 Ab: N-GluTyrLeuLysThrLeuSerGluGluCys-C (SEQ ID NO: 33)

10 NAP-C2 Ab: N-LysGluPheLeuGluProAspSerTrpGluThrLeuAspGlnCys-C (SEQ ID NO: 34)

Приготовление каждого пептида NAP-1 Ab, NAP-C1 Ab и NAP-C2 Ab осуществляли в ATP Co., Ltd. Где их синтезировали путем твердофазного синтеза и очищали путем жидкостной хроматографией с обращенной фазой. Каждый пептид NAP-1 Ab, NAP-C1 Ab и NAP-C2 Ab, полученный таким образом, были конъюгирован с KLH способом, аналогичным описанному в Демонстрационном примере 3, и затем иммунизировали кроликов для приготовления сыворотки, содержащей антитело к каждому пептиду. Из сыворотки, выделяли кроличьи IgG при использовании колонки DEAE, и называли NAP-1 IgG (несфатин-1 IgG), NAP-C1 IgG (несфатин-C1 IgG), и NAP-C2 IgG (несфатин C2 IgG).

25 Каждый из приготовленных пептидов несфатин-1 и несфатин-3 подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (12 %), и затем проводили вестерн-блоттинг для каждого пептида способом, описанным в Демонстрационном примере 3, при использовании несфатин-1 IgG антитела и несфатин-C2 IgG антитела, соответственно.

#### <Результат >

35 Несфатин-1 пептид, несфатин-2 пептид, несфатин-3 пептид и несфатин-2/3 пептид, которые синтезировали с помощью твердофазного синтеза и очищали путем жидкостной хроматографии с обращенной фазой, очищали путем аналитической хроматографии с обращенной фазой C18 до чистоты почти в один пик. Путем получения части пиков и анализа с помощью масс-спектрометрии (несфатин-1 и несфатин-2) или электрофореза в полиакриламидном геле с SDS (12 % гель) (несфатин-3 и несфатин-2/3), было продемонстрировано, что были синтезированы пептиды, для которых как и предполагалось, что они имеют приблизительно такую же молекулярную массу, как для каждого пептида их предполагаемых несфатин-1, несфатин-2, несфатин-3 и несфатин-2/3. У кроликов, которые были иммунизированы конъюгатом каждого пептида NAP-1 IgG, NAP-C1 IgG и NAP-C2 IgG и KLH, наблюдалось повышение титров антител против этих 3 пептидов и было получено антитело (IgG) против каждого пептида.

50 Как результаты вестерн-блоттинга с несфатин-1 IgG после электрофореза

несфатин-1 пептида, была обнаружена единичная полоса размером 9,7 кДа, и в результате вестерн-блоттинга с несфатин-С2 IgG после электрофореза несфатин-3 пептида, была обнаружена единичная полоса размером 27,9 кДа (Фиг. 9С). Отсюда видно, что несфатин-1 IgG антитело и несфатин-С2 IgG антитело связываются с несфатин-1 пептидом и несфатин-3 (несфатин-2/3), соответственно.

#### Демонстрационный пример 11

##### Иммуногистохимический анализ с NAP-1 IgG и анти-РС антителом

Для иллюстрации того, что несфатин участвует в образовании несфатин-1, локализация несфатина и РС была впервые анализирувана путем двойного иммуногистологического окрашивания крысиного гипоталамуса с NAP-1 IgG (несфатин-1 IgG), приготовленным в Демонстрационном примере 10, и антителом против прогормон-конвертазы (анти-РС).

Срезы тканей мозга готовили следующим образом. Восьминедельных крыс линии Wistar (купленные у CHARLES RIVER LABORATORIES Japan, Inc.) подвергали анестезии путем интраперитонеального введения 40 мг/кг пентобарбитала натрия, и затем осуществляли торакотомию с введением 50 мл физиологического раствора (0,85% NaCl) в сердце с последующим введением PBS, содержащего 4% параформальдегида (20 мМ фосфатного буфера, 150 мМ NaCl, pH 7,2), и прокачивали, используя 400 мл перистальтический насос, для перфузионного закрепления мозга. Затем мозг экстрагировали и удаленную часть, содержащую гипоталамус, фиксировали в течение ночи при 4°C в PBS, содержащем 4% параформальдегида. Образец фиксированного мозга погружали в PBS, содержащий 10% сахарозу в течение 4 часов, PBS, содержащий 10% сахарозу в течение 4 часов, и в PBS, содержащий 20% сахарозу в течение ночи при 4°C. Затем образец мозга погружали в компаунд OCT и замораживали в сухом ледяном ацетоне для приготовления залитого блока. Из приготовленного блока, приготавливали срезы по 6 мкм толщиной при -20°C при использовании криостата, и затем высушивали на воздухе на стекле, покрытом силаном (MAS coat slide, приготовленный Matsunami). Тканевые срезы на стекле обрабатывали 3% раствором перекиси водорода в течение 5 минут и затем промывали дважды в PBS в течение 5 минут.

Предметное стекло, содержащее срез ткани мозга, помещенный на него, блокировали путем обработки 10% нормальной сывороткой козла (Nichirei Corp., Cat. No. 426042) при комнатной температуре течение 10 минут. Затем, осуществляли реакцию с NAP-1 IgG (Несфатин-1 IgG: Демонстрационный пример 10), разведенным 1/500 в PBS, содержащем 5% BSA, при комнатной температуре в течение 1 часа. Предметное стекло, с которым антитело провзаимодействовало, трижды промывали в PBS в течение 5 минут, и

вносили Histofine Simple Окрашивания Крыс MAX PO (Nichirei Corp., Cat. No. 414181) и после этого промывали в PBS, окраска развивалась при использовании 4-хлор-1-нафтола (ICN, Cat. No. 980611: 4-хлор-1-нафтол, стабилизированный хромогеном). Предметное  
5 стекло после развития окраски промывали в PBS трижды в течение 5 минут, и затем погружали в 0,1 М глициновый буфер (pH 2,2) в течение 1,5 часов (указанный буфер меняли каждые 30 минут), и промывали в PBS трижды в течение 5 минут. Предметное  
10 стекло затем блокировали с 10% нормальной козьей сывороткой (Nichirei Corp., Cat. No. 426042) при комнатной температуре в течение 10 минут. Предметные стекла, которые были обработаны таким образом разделяли на две группы: одна реагировала с антителом (PC-1/3: Chemicon, Cat. No. AB1260), которое распознает прогормон-конвертазу субтипов PC1 и PC3, и другая реагировала с антителом (PC-2: Chemicon, Cat. No. AB1262), которое  
15 распознает прогормон-конвертазу субтипа PC2, как раствор антитела, разведенный в PBS, содержащем 0,5% BSA, при комнатной температуре в течение 1 часа. Предметное стекло затем промывали в PBS трижды в течение 5 минут, и предметное стекло взаимодействовало с конъюгатом козье антитело против кроличьего IgG-Alexa594 (Molecular Probes, Cat. No. A11008), разведенным 1/200 в PBS, содержащем 0.5% BSA,  
20 при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем предметное стекло промывали в PBS трижды в течение 5 минут и слегка высушивали на воздухе, и затем заключали при помощи глицерина и покровного стекла, и периметр герметизировали бесцветным лаком для ногтей для приготовления препарата. Препарат изучали как фазово-контрастное  
30 изображение окрашивания 4-хлор-1-нафтолом с помощью конфокального лазерного микроскопа (Bio-Rad Inc. MRC-1024 оборудование для конфокального лазерного микроскопа + Nikon's Eclipse E800 прямой микроскоп) и флуоресценцию с Alexa 594 проверяли как флуоресцентное изображение с помощью лазерного возбуждения под  
35 действием криптон-аргонового лазера при использовании фильтра с полосой пропускания  $605\pm 30$  нм.

#### <Результат >

40 В иммуногистохимическом изображении для ткани крысиного гипоталамуса, окрашенное изображение с несфатин-1 IgG показано на верхней панели и нижней панели в А на Фиг.10, флуоресцентное изображение с PC-1/3 - в верхней панели в В на Фиг.10, и  
45 флуоресцентное изображение с PC-2 - в нижней панели в В на Фиг.10. Верхняя панель в А на Фиг.10 и нижняя панель в В на Фиг.10, и нижняя панель в А на Фиг.10 и нижняя панель в В на Фиг.10 представляют цветное изображение и флуоресцентное изображение в том же поле. Как показано на верхней панели и нижней панели в А на Фиг.10, клетки, окрашенные с несфатин-1 IgG, наблюдались в невральных клетках мозга крысы. Многие  
50

из этих клеток, которые были окрашены с анти-РС-1/3 и анти-РС-2 антителом, также соответствуют несфатин-1 IgG положительным клеткам. Это показывает, что в клетках, экспрессирующих несфатин, одновременно экспрессируются прогормон-конвертазы РС1/3 и РС2, что предполагает возможность того, что несфатин подвергается процессингу посредством прогормон-конвертазы.

#### Демонстрационный пример 12

#### Изучение эффекта интрацеребрального введения несфатин-1, несфатин-2, несфатин-3 и несфатин-2/3 на контроль над потреблением пищи

Исследовали участок несфатина, активность которого подавляет потребление пищи.

Образцы, используемые для интрацеребрального введения, представляли собой PBS только (группа носителей) или несфатин-1, несфатин-2, несфатин-3 или несфатин-2/3, приготовленные в Демонстрационном примере 10, каждый из которых были растворены в PBS, и по 25 пмоль вводили на одного в третий желудочек непосредственно перед темным периодом. Используемые крысы были крысами линии Wistar (купленные у Nippon SLC), которые содержались в тех же условиях, как описано в Демонстрационном примере 6, и среди 8-9 недельных самцов крыс линии Wistar использовались те, чей вес составлял 200-250 г (N=5). Способ интравентрикулярного введения и измерение количества потребления пищи крысами осуществлялись аналогичным образом, как описано в Демонстрационном примере 6. Для измерения количества потребления пищи, пониженное количество пищи через 1 час после введения (0-1 ч) и 2 часа после введения (1-3 ч) определялось как потребление пищи.

При таких же условиях, как описано выше, 1, 5 или 25 пмоль несфатина-1 в качестве образца вводили на крысиного индивидуума в третий желудочек непосредственно перед темным периодом. В этом эксперименте количество потребления пищи определяли через 1 час после введения (0-1 ч).

#### <Результат >

По сравнению с контрольной группой (Конт), как показано на панели А на Фиг.11, интравентрикулярное введение несфатин-2, несфатин-3 и несфатин 2/3 не увеличивает существенно изменения количества потребления пищи (0-1 ч: а-1 на панели А на Фиг.11; 1-3ч: а-2 на панели А на Фиг.11А). Напротив, интра-церебровентрикулярное введение 25 пмоль несфатина-1 значительно увеличивает эффект подавления питания. Как показано на панели В на Фиг.11, интравентрикулярное введение 1, 5 или 25 пмоль несфатина-1 на индивидуума снижает количество потребления пищи при увеличении количества вводимого несфатина-1, по сравнению с группой (0), получавшей раствор хлорида натрия. В частности, значительное снижение количества потребления пищи наблюдалось при

введении 5 пмоль или 25 пмоль несфатина-1. Эти результаты показывают, что активность подавления потребления пищи несфатином локализована в несфатине-1.

### Демонстрационный пример 13

#### Изменения количества потребления пищи и массы тела при интравентрикулярном непрерывном введении несфатина-1

Исследовали эффект интравентрикулярного непрерывного введения несфатина-1 на изменения количества потребления пищи и массы тела.

Введение несфатина-1 осуществляли в желудочек путем осмотического насоса в течение 10 последовательных дней. Среди 8-9 недельных самцов крыс Wistar (купленные у Nippon SLC) выбирались те индивидуумы, чей вес составлял 200-250 г. Крысы получали интраперитонеальное введение 40 мг/кг массы тела пентобарбитала натрия для анестезии. После того, как волосы были убраны с головы, их фиксировали в стереотаксическом аппарате для исследования мозга (David Kopf Instruments, Model 962), снимали скальп и вводили иглу размером 23G (игла-проводник) до достижения третьего желудочка (2,5 мм от темя, 9,5 мм от поверхности). Через одну неделю после введения иглы-проводника, животные подвергались исследованию. Используемый осмотический насос являлся Alzet's Model 2002. Несфатин-1 (группа с введением несфатина-1) растворяли в физиологическом растворе хлорида натрия, который был простерилизован с 0,22 мкм фильтром Millex GV (Millipore Co. Ltd.), или простерилизованный физиологический раствор хлорида натрия только (контрольная группа) инъецировали в осмотический насос непосредственно перед применением и заправляли стерилизованным физиологическим раствором хлорида натрия за день до применения. Осмотический насос, к которому каждый образец был присоединен посредством трубки, соединенной с инъекционной канюлей, и через проводящую канюлю, предварительно имплантированную, инъекционную канюлю фиксировали так, чтобы верхушка канюли достигала третьего желудочка крысы. В таком виде использования, образцу вводили в третий желудочек при скорости потока 12 мкл в течение 24 часов, и в группе с введением несфатин-1, вводили 5 пмоль несфатина-1 в день. После того как крысы, которым был имплантирован осмотический насос, восстановились от анестезии, их помещали в индивидуальные клетки, где они содержались при условиях, при которых они могли принимать сухую пищу и воду вволю. Измерение количества потребленной пищи начинали за день до введения канюли и осмотического насоса, и вес остатков пищи измеряли в 9 часов утра ежедневно, и путем определения разницы веса пищи с предыдущим днем вычисляли количество потребления пищи в день (24 часов). С шестого дня после начала введения, измерялась масса тела во время измерения количества потребления пищи, и изменения массы тела также устанавливали.

<Результат >

Как показано на панели А на Фиг.12, в группе с введением несфатин-1, отмечали снижение количества потребленной пищи с первого дня после начала введения, и  
5 снижение нарастало в течение периода измерения по сравнению с контрольной группой. Также как показано на панели В на Фиг.12, скорость нарастания массы тела в группе с введением несфатина-1 значительно снижалось по сравнению с контрольной группой.

#### 10 Демонстрационный пример 14

**Изучение нарушения контроля над потреблением пищи путем интравентрикулярного введения анти-несфатин-1 антитела или анти-несфатин-3 антитела**

15 В Демонстрационных примерах 12 и 13, эффект снижения количества потребления пищи путем интравентрикулярного введения несфатин-1 пептида было обнаружено. Для дополнительного подтверждения этого факта, NAP-1 IgG (несфатин-1 IgG), который  
20 распознает несфатин-1, NAP-C1 IgG (несфатин-C1 IgG), или NAP-C2 IgG (несфатин-C2 IgG), который распознает несфатин-3, интравентрикулярно вводили крысе для изучения их эффекта на количество потребления пищи. Для изучения взаимосвязи между  
25 несфатином, расщепляемым прогормон-конвертазой с образованием несфатин-1, и контроля над потреблением пищи, мутанта (KR-AA мутант: Mut), в котором последовательность Lys-Arg, соответствующая аминокислотным номерам 84 и 85, среди  
30 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 26, замещали последовательностью Ala-Ala, приготавливали и изучали эффект на интравентрикулярное введение крысам.

Используемые образцы для интравентрикулярного введения представляли собой IgG (контрольная IgG группа), выделенный из неиммунизированных кроликов, с PBS,  
35 NAP-1 IgG (несфатин-1 IgG), NAP-C1 IgG (несфатин-C1 IgG) или NAP-C2 IgG (несфатин-C2 IgG), приготовленные в Демонстрационном примере 11, которые растворяли в PBS, и по 5 мкл (5 мкг) каждого вводили в третий желудочек. Используемыми крысами являлись  
40 крысы линии Wistar (купленные у Nippon SLC), которые содержались как указано в Демонстрационном Примере 6, и среди 8-9 недельных самцов крыс Wistar использовались те индивидуумы, чей вес составлял 200-250 г. Способ интравентрикулярного введения и измерение количества потребления пищи крысами осуществлялись аналогичным образом,  
45 как описано в Демонстрационном примере 7. Для измерения количества потребления пищи, пониженное количество пищи через 1 час после введения (0-1 ч) и 2 часа после введения (1-3 ч) определялось как потребление пищи.

50 Приготовление мутанта KA-AA осуществляли путем замены несфатинового гена из зрелого мышинового, приготовленного в Демонстрационном примере 5, путем

экспрессии гена. Два фрагмента были приготовлены при использовании плазмиды, в которой несфатиновый ген из зрелой мышши, полученный в Демонстрационном примере 5, клонировали до pGEM-11Zf(+), посредством способа ПЦР. Первый фрагмент  
 5 клонировали до pGEM-11Zf(+), посредством способа ПЦР. Первый фрагмент  
 10 приготавливали при использовании 5 нг плазмиды и осуществляли посредством ПЦР  
 реакции с набором праймеров mNucB2-F360[Sac2Thr] и mNucB2[KR-AA] R583.

mNucB2-F360[Sac2Thr]: 5'-  
 10 GGTTCGCGGGTCTGGTTCGCGGTGGTTCCTATCGATGTGGACAAGACCAA-3'  
 (SEQ ID NO: 56)

mNucB2[KR-AA] R583: 5'-CTTCTTGAGCAGCCAGCTCATCCAGTCTCGTCCTCA-  
 15 3' (SEQ ID NO: 57)

ПЦР реакция включала реакцию денатурации при 90°C в течение 1 минут, с  
 последующими 20 циклами реакции, включающей денатурацию при 98°C в течение 10  
 секунд, отжиг при 60°C в течение 30 секунд, и удлинение при 68°C в течение 1 минуты с  
 20 приготовлением амплифицированной ДНК (PfuTurbo<sup>(R)</sup>) полимеразы от Stratagene, Cat. No.  
 600250).

Второй фрагмент приготавливали при использовании 5 нг ДНК фрагмента  
 25 плазмиды и путем осуществления ПЦР реакции с набором праймеров mNucB2[KR-AA]  
 F612 и mNucB2-R1527[NotI]

mNucB2[KR-AA] F612: 5'-  
 30 GAGCTGGCTGCTCAAGAAGTAGGAAGACTGCGGGATGCT-3' (SEQ ID NO: 58)

mNucB2-R1527[NotI]: 5'-GGTTGCGGCCGCACTTTATGTGTGTGGCTCAAAC-3'  
 (SEQ ID NO: 59)

ПЦР условия соответствовали условиям амплификации первого ДНК фрагмента.

Для получения 2 ДНК фрагментов, образцы, полученные в двух реакциях ПЦР  
 35 добавляли к реакционной смеси таким образом, что концентрация реакционной смеси  
 составляла 5 мкл на каждые 50 мкл. При использовании 0,25 мкМ каждого His-Thr-  
 For[SpeI] праймера и вышеуказанного mNucB2-R1527[NotI] праймера, реакционная смесь  
 40 содержащая 1 x концентрированный Pfu буфер, 2,5 единиц PfuTurbo ДНК полимеразы  
 (указанная выше: Stratagene) и 0,2 мМ dNTPs (Promega: C1141), денатурация  
 осуществлялась при 90°C в течение 1 минуты, с последующими 20 циклами реакции,  
 45 включавшей денатурацию при 98°C в течение 10 секунд, отжиг при 60°C в течение  
 30 секунд и удлинение при 68°C в течение 1 минут с получением амплифицированной  
 ДНК.

His-Thr-For[SpeI]: 5'-  
 50 GGTTACTAGTGGTTCTGGTCATCACCATCACCATCACTCCGCGGGTCTGGTTCCGCG



T-3' (SEQ ID NO: 60).

Полученный продукт ПЦР подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле для вырезания полосы амплифицированной ДНК, которая была выделена с использованием набора QIAEX-II (QIAGEN). Вырезанная амплифицированная ДНК расщеплялась рестрикционными ферментами SpeI и NotI, и лигировалась с pET41a(+) плазмидным вектором (Novagen), расщепленным рестрикционными ферментами SpeI и NotI, при использовании набора Quick DNA ligase kit (New England Biolabs). Из клонированной ДНК, клон, который не содержал ошибок в мутантных положениях, вводился после анализа ДНК последовательностей таким же образом, как указано в Демонстрационном примере 5, и другие нуклеотидные последовательности могут выбираться для получения вектора для экспрессии KR-AA мутанта. Экспрессию и очистку осуществляли таким же образом, как указано в Демонстрационном примере 5. Аминокислотная последовательность полученного KR-AA мутанта указана в SEQ ID NO: 61. Применили Wt (нормальный несфатин), который приготавливали в Демонстрационном примере 5. 5 пмоль каждого KR-AA мутантного (Mut) пептида и нормального несфатинового (Wt) пептида вводили в третий желудочек крыс аналогичным образом, как указано в Демонстрационном примере 6. Через один, три, шесть и 12 часов, определяли вес пищи для расчета количества потребленной пищи, что использовали в качестве индекса пищевого поведения.

<Результат >

В каждом введении в третью группу с интравентрикулярным введением контрольного IgG, NAP-1 IgG (несфатин-1 IgG), NAP-C1 IgG (несфатин-C1 IgG) или NAP-C2 IgG (несфатин-2 IgG), количество потребленной пищи в течение 0-1 часа после введения графически показано в а-1 на Фиг.13А, количество потребленной пищи в течение 3-6 часов графически показано в а-2 на Фиг.13А, и количество потребленной пищи в течение 6-9 часов графически показано в а-3 на Фиг.13А. В 0-3 часа (а-1 на Фиг.13А) и 3-6 часов (а-2 на Фиг.13А), по сравнению с введением контрольного IgG крысам, индивидуумы, которые получали NAP-1 IgG (несфатин-1 IgG) проявляли значительное повышение количества потребленной пищи ( $P < 0.01$  для 0-3 часа,  $P < 0.05$  для 3-6 часов), однако в группах, которые получали NAP-C1 IgG (несфатин-C1 IgG) или NAP-C2 IgG (несфатин-C2 IgG), не отмечалось значительных различий по сравнению с группой носителей. В результатах для 6-9 часов, не отмечено значительной разницы в каждой контрольной IgG группе, NAP-1 IgG (несфатин-1 IgG) группе, и NAP-C1 IgG (несфатин-C1 IgG) группе и NAP-C2 IgG (несфатин-C2 IgG) группе. Этот результат показывает, что функция эндогенного несфатина-1 ингибируется антителом против несфатина-1, что

приводит к повышению количества потребляемой пищи. Это показывает, что вещество, которое ингибирует функцию несфатина-1, обладает эффектом повышения количества потребляемой пищи, дополнительно к эффекту подавления потребления пищи, что наблюдается при интравентрикулярном введении несфатин-1 полипептида как показано в Демонстрационном примере 13.

Дополнительно к результатам эффекта относительно количества потребленной пищи у крыс, где 5 пмоль каждого рекомбинантного мышинового несфатина (Wt) и мутанта (KR-AA мутанта: Mut), в котором Lys-Arg последовательность, соответствующая аминокислотным номерам 84 и 85, замененная на последовательность Ala-Ala, вводилось крысам, что показано на Фиг.13В. На Фиг.13В, количество потребленной пищи в 0-1 часа, 1-3 часа и 3-6 часов после введения графически показано в b-1, b-2, b-3, соответственно. Как показано в b -1 - b-3, у крысы, которым вводили 5 пмоль Wt (нормального несфатина), наблюдалась значительная активность по контролю потребления пищи в каждый период, хотя не наблюдалась активность по контролю потребления пищи при введении несфатина (Mut), где мутация была введена в участок расщепления прогормон-конвертазой. Отсюда, было показано, что стадия несфатина-1, процессированного прогормон-конвертазой, является важной для несфатин для функционирования.

#### **Демонстрационный пример 15**

#### **Изучение эффекта непрерывного интравентрикулярного введения антисмысловой РНК против NEFA гена на потребление пищи и массу тела**

Для дальнейшего изучения взаимосвязи между экспрессией несфатинового (NEFA) гена и контролем потребления пищи и массы тела, антисмысловую РНК, которая подавляет экспрессию несфатинового гена непрерывно вводили в третий желудочек и изучали эффект введения.

В качестве антисмысловой РНК против несфатин-1 гена использовали морфолино РНК, которая вставляется в сайт инициации трансляции, как следует.

Несфатин-1 антисмысловая РНК:

5-ATGGTCCTCCACCTCATCTTCAGAG-3 (SEQ ID NO: 31)

Введение несфатиновой антисмысловой РНК осуществляли в желудочек посредством осмотического насоса в течение 12 последовательных дней при использовании осмотического насоса. Среди 8-9 недельных самцов крыс Wistar (купленные у Nirron SLC) выбирались те индивидуумы, чей вес составлял 200-250 г. Крысы получали интраперитонеальное введение 40 мг/кг массы тела пентобарбитала натрия для анестезии. После того, как волосы были убраны с головы, их фиксировали в стереотаксическом аппарате для исследования мозга (David Kopf Instruments, Model 962),

снимали скальп и вводили иглу размером 23G (игла-проводник) до достижения третьего  
желудочка (2,5 мм от темя, 9,5 мм от поверхности). Через одну неделю после введения  
5 иглы-проводника, животные подвергались исследованию. Используемый осмотический  
насос являлся Alzet's Model 2002, который заряжали стерилизованным физиологическим  
раствором хлорида натрия за день до использования. Несфатиновая антисмысловая РНК  
10 (группа введения антисмыслового агента), растворенная в физиологическом растворе  
хлорида натрия, который был простерилизован через 0,22 мкм фильтр Millex GV, или  
миссенс РНК (АТсGTgCTCCACgTCATCTaCAcAG), стерилизованная таким же образом,  
растворенная в стерилизованном физиологическом растворе хлорида натрия (контрольная  
15 группа), вводились в осмотический насос непосредственно перед применением.  
Осмотический насос, к которому каждый образец был присоединен посредством трубки,  
соединенной с инъекционной канюлей, и через проводящую канюлю, предварительно  
20 имплантированную, инъекционную канюлю фиксировали так, чтобы верхушка канюли  
достигала третьего желудочка крысы. В таком виде использования, образцу вводили в  
третий желудочек при скорости потока 12 мкл в течение 24 часов, и 40 мкг каждой  
антисмысловой РНК и миссенс РНК были инъецированы. После того как крысы, которым  
25 был имплантирован осмотический насос, восстановились от анестезии, их помещали в  
индивидуальные клетки, где они содержались при условиях, при которых они могли  
принимать сухую пищу и воду вволю. Измерение количества потребленной пищи  
начинали за день до введения канюли и осмотического насоса, и вес остатков пищи  
30 измеряли в 9 часов утра ежедневно, и путем определения разницы веса пищи с  
предыдущим днем вычисляли количество потребления пищи в день (24 часов). С шестого  
дня после начала введения, масса тела измерялась во время измерения количества  
35 потребления пищи, и изменения массы тела также устанавливали.

На 12 день после начала введения, индивидуумы из каждой группы были  
умерщвлены, и гипоталамус из мозга был изъят. При использовании экстрагированного  
образца, экспрессию несфатина подтверждали путем вестерн-блоттинга с несфатином-1  
40 Ab. Вестерн-блоттинг осуществляли таким же способом, как указано в  
Демонстрационных примерах 13 и 12. Концентрацию полос, окрашенных в вестерн-  
блоттинге, определяли путем денситометрия

#### <Результат >

Изменения количества потребленной пищи в течение 24 часов для контрольной  
группы и группы с антисмысловым введением, которой вводилась несфатиновая  
антисмысловая РНК, показаны в А на Фиг.14 и изменения массы тела показаны в В на  
50 Фиг.14. По сравнению с контрольной группой, повышение количества потребленной

пищи (А на Фиг.14) отмечалось в группе с антисмысловым введением, начиная с 1 дня после начала введения, и количество потребленной пищи было всегда выше, чем в контрольной группе в течение всего периода измерения (до 12 дня после начала введения).  
5 Для изменений в массе тела (В на Фиг.14), не отмечалось различия на 6 день после начала введения между контрольной группой и группой с антисмысловым введением, однако на 7 день и потом значительное повышение массы тела ( $P < 0.05$ ) отмечалось в группе с  
10 антисмысловым введением по сравнению с контрольной группой, разница возрастала с 9 дня до 11 дня периода измерения. В анализе вестерн-блоттинг несфатина-1 при использовании крысиного гипоталамуса крысы, умерщвленной в 12 день, экспрессия  
15 несфатина-1 была значительно снижена в группе с введением антисмыслового агента (интенсивность полос путем денситометрии составляла  $8,5 \pm 0,7$  AU) по сравнению с контрольной группой (интенсивность полос составляла  $14,3 \pm 1,2$  AU, которая была  
20 определена при использовании денситометрии). Из этих результатов можно заключить, что интравентрикулярное введение несфатиновой антисмысловой РНК имеет эффект подавления экспрессии несфатина-1 и повышения количества потребляемой пищи и прибавления в весе.

#### 25 Демонстрационный пример 16

##### Продукция рекомбинантного несфатина-1 рекомбинантным

Для получения несфатина-1 в большом количестве, был разработан способ получения рекомбинантного несфатина-1 при использовании рекомбинантного.

30 Ген, кодирующий мышинный несфатин-1, был получен и была сконструирована экспрессия вектора путем присоединения гена глутатион-S-трансферазы (GST) и гистидиновой метки к N-концу гена несфатина-1 так, что сайт для расщепления (-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-) расщепляли при использовании тромбина, опосредовал  
35 аминокислотную последовательность гистидиновой метки и аминокислотную последовательность мышинового несфатина-1 в белке после трансляции. Ген мышинового несфатина-1 получали при использовании мышинной мозговой кДНК (Clontech) путем  
40 проведения двух реакций ПЦР (двустадийная «гнездовая» ПЦР). Для первой ПЦР использовались прямой праймер (mNucB2-F337: SEQ ID NO: 35) и обратный праймер (mNucB2-R712: SEQ ID NO: 36) по 100 пМ каждый, Pyrobest ДНК полимеразы (TakaraBio  
45 К.К. R005A), приложенный реакционный буфер и dNTP, и осуществляли реакцию в соответствии с прилагаемым протоколом. ПЦР реакция включала, после реакция при  $90^{\circ}\text{C}$  в течение 1 минуты, температурный профиль из 30 циклов при  $98^{\circ}\text{C}$  в течение 10 секунд и  $68^{\circ}\text{C}$  в течение 1 минуты, и затем реакция при  $68^{\circ}\text{C}$  в течение 2 минут.

50 Прямой праймер (mNucB2-F337): 5'-GCACGCTGAC CGCTC TGGAAG-3' (SEQ ID

NO: 35)

Обратный праймер (mNucB2-R712): 5'-CAAATGTGTT AGGAT TCTGGTGGTTCA-3' (SEQ ID NO: 36)

Используя 0,5 мкл полученного продукта ПЦР, осуществляли вторую реакцию ПЦР при использовании прямого праймера (mNucB2-N3[SacI-Thr]) и обратный праймер (mNucB2-R389[NotI]) по 100 пМ каждый, и при использовании Pyrobest ДНК полимеразы, как и в первой ПЦР. ПЦР реакция включала, после реакция при 90°C в течение 1 минуты, температурный профиль из 20 циклов при 98°C в течение 10 секунд, 60°C в течение 30 секунд и 68°C в течение 1 минуты, и затем реакцию при 68°C в течение 2 минут.

Прямой праймер (mNucB2-N3[SacI-Thr]): 5'-GGTTCGCGGGTCTGGTTCGCGTGG TTCTCCTATCGATGTGGACAAGACCAA-3' (SEQ ID NO: 37)

Обратный праймер (mNucB2-R589[NotI]): 5'-GGTTGCGGCCGCTTACCTCT TCAGCTCA TCCAGTCTCG-3' (SEQ ID NO: 38)

ПЦР реакция образцов, которые были подвергнуты двум реакциям ПЦР, очищали фенол-хлороформным экстрагированием, расщепляли рестрикционными ферментами SacII и NotI, и затем подвергали электрофорезу в агарозном геле для вырезания полосы, соответствующей длине около 300 п.о., которая была очищена набором QIAEX-II (QIAGEN). Очищенный продукт ПЦР около 300 п.о. лигировали с pET41a(+) плазмидным вектором (Novagen), расщепляли с рестрикционными ферментами SacII и NotI при использовании набора Quick DNA ligase kit (New England Biolabs). Лигированный вектор вводили в E. coli штамм J409 и 8 трансформантов, таким образом полученных, подвергали плазмидному экстрагированию малыми структурами. Плазмиды, таким образом полученные, анализировали на нуклеотидную последовательности последовательности введенного гена несфатина-1, при использовании набора BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction и секвенатора ABI377 type DNA Sequencer (Perkin-Elmer Inc.). В результате, была получена экспрессия вектора, содержащего ген, в который интегрирована правильная последовательность несфатина-1, и назвали pET41a(+)GST-His-LVPRGS-mNAP1.

Путем введения pET41a(+)GST-His-LVPRGS-mNAP1 в E. coli BL21 (DE3) Codon Plus RIPL и экспрессии, экспрессировался слитой белок (GST-His-LVPRGS-mNAP1) GST-гистидин меченый-тромбином расщепленный- последовательность-несфатин-1. Клоны, полученные введением pET41a(+)GST-His-LVPRGS-mNAP1 в E. coli BL21 (DE3) Codon Plus RIPL и выбранные в LB среде, содержащей канамицин, культивировали в 10-мл LB среды, содержащей канамицин, при 37°C. Культивирование останавливали, когда при

длине волны 600 нм не составит 0,8. 3 мл жидкости для культивирования инокулировали в 100 мл LB среды, содержащей канамицин, которую культивировали при 37°C. Когда поглощение при длине волны 600 нм стало 0,8, 1 мл 100 мМ IPTG добавляли для индукции экспрессии белка. После добавления IPTG, перемешивая, осуществляли культивацию при 37°C в течение 3 часов. Жидкость для культивирования центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 минут (4°C) для получения клеток E. coli.

Из клеток E. coli, таким образом полученных, GST-His-LVPRGS-mNAP1 слитой белок экстрагировали и очищали с хелатом колонки никеля (Ni-NTA агароза). Клетки суспендировали в 20 мл буфере для разрушения ультразвуком (50 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 мМ NaCl, 2 мМ DTT, pH 7,5) содержащей однократную концентрацию Complete-EDTA free (Roche Diagnostics К.К.) и 0,5-кратную концентрации BugBuster (Merck Ltd., Novagen, Cat. No. 70584), и разрушали посредством ультразвука в ледяной воде в течение 10 минут. Обработанный ультразвуком образец центрифугировали при 15000 об/мин в течение 20 минут и собирали супернатант. 10 мл супернатанта полученной добавляли к 1 мл Ni-NTA агарозной колонке, уравновешенную лизирующим буфером (50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола, pH 8,0), и промывали дважды в 10 мл промывочного буфера (50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, pH 8,0). Колонку после промывания элюировали дважды 2,5 мл буфера для элюции (50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазола, pH 8,0), и собирали фракцию содержащую элюированный GST-His-LVPRGS-mNAP1 слитой белок. Экстрагированный супернатант из остаточных клеток обрабатывали аналогичным образом, и собирали фракцию, содержащую GST-His-LVPRGS-mNAP1 слитой белок. Из GST-His-LVPRGS-mNAP1 слитого белка, часть GST и гистидиновой метки удаляли и дополнительно очищали, GST-His-LVPRGS-mNAP1 слитой белок, прикрепленный к GST смоле подвергали обработке тромбином и очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой для удаления полученного из E. coli липополисахарида (LPS), который может действовать как воспалительное вещество. Буферы в этой стадии и для последующих проверяли на отсутствие LPS. 7,2 мл фракции, содержащей GST-His-LVPRGS-mNAP1 слитой белок, промывали однократной концентрацией GST Bind/Wash буфером (Merck Ltd., Novagen, Cat. No. 70571), который в итоге добавляли к GST смоле (Merck Ltd., Novagen, Cat. No. 70541) (равный 7,2 мл), суспендировали в 3 мл GST Bind/Wash буфере, и аккуратно перемешивали при 20°C в течение 1 часа. После сбора смола после центрифугирования, указанную смолу промывали дважды в 36 мл GST Bind/Wash буфере. К промытой смоле добавляли 3,6 мл раствора 20 единиц/мл тромбина в PBS суспендировали и оставляли для взаимодействия при 20°C в течение 20 часов при аккуратном перемешивании. Смолу после реакции

переносили в 1,8 мл в чашки, к которым прикреплен фильтр (Millipore) с размером пор 0,22 мкм, центрифугировали при 3,000 об/мин в течение 2 минут, и затем профильтрованные обработанные тромбином образцы собирали. К 450 мкл профильтрованным обработанным тромбином образцам добавляли 50 мкл уксусной кислоты для приготовления образца для хроматографии с обращенной фазой C18. Хроматографии с обращенной фазой включала элюцию с градиентом ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте, и градиент был поставлен при 10% ацетонитрил:10 минут/10-20% градиент ацетонитрила:60 минут/30-40% градиент ацетонитрила:40 минут/40-60% градиент ацетонитрила:5 минут. Белок, элюированный из колонки, подвергали мониторингу путем измерения поглощения при длине волны 280 нм. Путем изучения фракции, элюированной с градиентом ацетонитрила, с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга, было обнаружено, что несфатин-1 элюирован при концентрации ацетонитрила 36,2%. Таким образом, эту фракция была собрана, лиофилизирована и растворена снова в дистиллированной воде для инъекции, которые использовались для определения концентрации белка посредством измерения поглощения и содержания LPS с помощью анализа Endospasy (Seikagaku Kogyo).

#### <Результат >

На 100 мл жидкости для культивирования, около 7 мг необработанного GST-His-LVPRGS-mNAP1 было очищено на Ni-NTA-agarose, и полученный несфатин-1, который был обработан тромбином или высоко очищен с помощью C18 хроматографии с обращенной фазой, составлял 472,5 мкг. Количество LPS, входящего в состав высокоочищенного несфатина-1, составляло приблизительно около 4 пг на 1 мкг несфатина-1. Кроме того, при интравентрикулярном введении высокоочищенного несфатина-1 крысам аналогичным образом, указанным в Демонстрационном примере 13, отмечался эффект подавления потребления пищи и/или подавления прибавления в весе. Это показывает, что продукция активного несфатина-1 возможна посредством экспрессии и очистки при использовании рекомбинантного.

#### **Демонстрационный пример 17**

##### **Изучение введения несфатина-1 в третий желудочек крыс линии Zucker fa/fa в отношении контроля над потреблением пищи**

Как описано в традиционной технологии, многие тучные люди или пациенты с липоматозом проявляют устойчивость к лептину, что представляет проблему в патологии и лечении. Таким образом, при использовании крыс линии Zucker fa/fa (Michael et al., Nature Genetics, Vol. 13, pp. 18-19, 1996), экспериментальной патологической модели лепти-устойчивости, изучали эффект несфатина-1 на контроль количества потребленной

пищи.

В качестве крыс использовали 8 недельных самцов линии Zucker fa/fa (Zucker) и в качестве контроля крыс линии Zucker +/+ (Lean), которые были куплены у Nippon Charles River и которые содержались при освещении в течение 12 часового светового периода с 6 часов утра до 6 часов вечера и в течение 12 часового темного периода с 6 часов вечера до 6 часов следующего утра и питались порошком (Nippon Clea, CE-2) при 22°C, и такие условия поддерживались при проведении всего эксперимента. После предварительного содержания купленных крыс в течение одной недели индивидуумов взвешивали и те, которые имели вес 200-250 г были выбраны среди других 9-10 недельных индивидуумов.

Используемым образцом для введения был таким, в котором рекомбинантный мышинный несфатин-1, приготовленный в Демонстрационном примере 16, был растворен до 5 пмоль в 5 мкл PBS, и использовали в качестве контроля образец физиологического раствора хлорида натрия (Раствор хлорида натрия). Пять мкл приготовленных образцов вводили в третий желудочек каждой крысе в группе из пяти Zucker крыс и Lean крысам на группу (Zucker/несфатин-1 группа, Lean/несфатин-1 группа, Zucker/раствор хлорида натрия группа, Lean/раствор хлорида натрия группа). Отсчет времени введения осуществлялся непосредственно перед началом темного периода, когда поведение в отношении потребления пищи повышено, и способ введения был аналогичным, который описан в Демонстрационном примере 6.

После интравентрикулярного введения, количество потребленной пищи было определено путем измерения количества снижения сухой еды для каждой крысы в течение 0-1 часа, 1-3 часов и 3-6 часов. Для изучения достоверной разницы использовался дисперсионный анализ.

<Результат >

Панель А на Фиг.15 показывает результат измерения потребленной пищи для группы (Lean/несфатин-1 группа), в которой несфатин-1 был введен и для группы (Lean/Раствор хлорида натрия группа), в которой физиологический раствор хлорида натрия был введен Lean крысам. Панель В на Фиг.15 показывает результат измерения потребленной пищи для группы (Zucker/несфатин-1 группа), в которой вводили несфатин-1, и группы (Zucker/Раствор хлорида натрия группа), в которой вводили физиологический раствор хлорида натрия Zucker крысам. В результате (панель А на Фиг.15) для контрольного животного, крыс Lean, количество потребленной пищи в течение 0-1 часа и в течение 1-3 часов было снижено в группе с введением несфатина-1 относительно группы с введением раствора хлорида натрия ( $P < 0,001$ ). Не было отмечено различия в количестве потребленной пищи в течение 3-6 часов. У Zucker, лептин-устойчивых животных, как и в



Lean, было отмечено значительное снижение в количестве потребленной пищи в течение 0-1 часа и в течение 1-3 часов в группе с введением несфатина-1 относительно группы с введением раствора хлорида натрия ( $P < 0,001$ ). В течение 3-6 часов, было также отмечено значительное снижение ( $P < 0,05$ ) (панель В на Фиг.15). Вышеуказанное показывает, что эффект подавления потребления пищи несфатином-1 был повышен при отсутствии эффекта лептина и это рассматривается как эффективное при лептин-устойчивых условиях.

### **Демонстрационный пример 18**

#### **Изучение эффекта интраперитонеального введения несфатина-1 относительно контроля количества потребленной пищи у мышей**

Было показано в эксперименте по интравентрикулярному введению крысам, что несфатин и несфатин-1 вовлечены в контролирование количества потребления пищи. Для изучения эффекта на других видах животных, проводили эксперименты по введению на мышах. Рассматривая практическую ценность, как например, фармацевтическую, предполагали, что периферическое введение является также эффективным, и, вследствие чего, интраперитонеальное введение было выдрано в качестве пути введения. Кроме того, экспериментальное введение также осуществляли на желтых мышах агути (с57BL/6J-A<sup>y</sup>/a), которые являются модельными животными экспериментального ожирения, у которых функция подавления потребления пищи посредством MC3R/MC4R ингибирована путем чрезмерной экспрессии белка агути.

Экспериментальные животные были 7 недельными самцами мышей линии ICR, купленные у Japan SLC, Inc., содержались при освещении в течение 12 часового светового периода с 6 часов утра до 6 часов вечера и в течение 12 часового темного периода с 6 часов вечера до 6 часов следующего утра и питались зерновым кормом (Nippon Clea, CE-2 при 22°C и такие условия поддерживались при проведении всего эксперимента. Купленные мыши в содержались в течение одной недели, индивидуумов взвешивали и те, которые имели вес 35-40 г были выбраны среди других 8-9 недельных индивидуумов и использовались в эксперименте.

Используемым образцом для введения был рекомбинантный мышинный несфатин-1, приготовленный в Демонстрационном примере 16, растворенный в 200 мкл физиологического раствора хлорида натрия с тем чтобы содержал 2 нмоль, 10 нмоль или 50 нмоль, и в качестве контрольного образца использовался только физиологический раствор хлорида натрия (Раствор хлорида натрия). При использовании шприца для введения туберкулина, оснащенного иглой 25G, 200 мкл каждого образца был введен один раз в брюшную полость каждой мыши (5 животных на группу), и отсчет времени

введения начинали непосредственно перед началом темного периода (6 ч вечера).

В эксперименте на модельном животном экспериментального ожирения, использовали мышей линии C57BL/6J в качестве контрольной группы и желтых мышей агути использовали в качестве модельных животных экспериментального ожирения, и эти животные были куплены у Nippon Charles River (Jackson Lab.). Условия содержания и недельный возраст используемых мышей были аналогичными мышам линии ICR, тогда как индивидуумы с весом 25-28 г для контрольной группы мышей и индивидуумы с весом 31-38 г для желтых мышей агути были выбраны для использования. Используемые образцы для введения являлись рекомбинантным мышинным несфатин-1, растворенным в 200 мкл физиологического раствора хлорида натрия с тем чтобы содержать 10 нмоль, и качестве контрольного образца использовался только физиологический раствор хлорида натрия (Раствор хлорида натрия). (16 животных на группу). Другие условия аналогичны, указанным выше.

Каждая мышь, которая получала введение, помещалась в индивидуальную клетку, и в течение 0-3 часов после введения измеряли массу снижения зернового корма для определения количества потребленной пищи. Для изучения достоверной разницы использовался дисперсионный анализ.

#### <Результат >

Результат измеренного количества потребленной пищи в течение 0-3 часов после введения, когда несфатин-1 или физиологический раствор хлорида натрия интраперитонеально были введены мышам ICR, показан на панели А на Фиг.16. В результате, как показано на панели А на Фиг.16, снижение количества потребленной пищи отмечалось у мышей, которые получали 2 нмоль, 10 нмоль и 50 нмоль несфатина-1 на мышь относительно контроля (группы с введением раствора хлорида натрия), и статистически значимое снижение количества потребленной пищи отмечалось при введении 10 нмоль ( $p < 0,05$ ) и 50 нмоль ( $p < 0,005$ ). Это показывает, что поскольку несфатин-1 проявляет активность подавления потребления пищи у мышей, также как и у крыс, он обладает эффектом контролирования потребления пищи во многих видах, и введение не только через мозг, но и периферическое введение, такое как в брюшную полость, является эффективным для подавления потребления пищи. Также, было показано, что интраперитонеально введенный несфатин-1 обладает эффектом подавления потребления пищи на начальной стадии после введения.

Также, в эксперименте на мышинной модели экспериментального ожирения, результат измеренного количества потребленной пищи, когда физиологический раствор хлорида натрия (Конт) или несфатин-1 (10 нмоль) были введены мышам (c57BL/6J)

контрольной группы, показан на панели В на Фиг.16, и результат измеренного количества  
потребленной пищи, когда физиологический раствор хлорида натрия (Конт) или  
несфатин-1 (10 пмоль) были введены желтым мышам агути, мышиной модели  
5 экспериментального ожирения, показан на панели С на Фиг.16. Как результат, для обеих  
мышей из контрольной группы и желтых мышей агути, количество потребленной пищи  
было значительно снижено у мышей, которые получали интраперитонеальное введение  
10 несфатина-1 относительно контроля. Поскольку желтые мыши агути являются моделью  
экспериментального ожирения, у которых функция подавленного потребления пищи  
меланокортином, лиагндом MC3R/MC4R, не работала вследствие чрезмерной экспрессии  
15 белка агути, что наводит на предположение, что фармакологическая активность была  
продемонстрирована в лептин-устойчивой модели в результате для крыс Zucker (fa/fa) в  
Демонстрационном примере 17, и аналогично потребление пищи контролировалось  
20 посредством механизма, независимого от подавления потребления пищи в имеющейся  
агути/меланокортин системе.

#### **Демонстрационный пример 19**

#### **Изучение эффекта интраперитонеального и подкожного введения несфатина-1 относительно контролирования количества потребленной пищи у мышей**

В Демонстрационном примере 18, было раскрыто, что интраперитонеальное  
25 введение несфатина-1 мышам является также эффективным для подавления потребления  
пищи, и, вследствие чего, как пример другого периферического введение, изучали  
30 подкожное введение несфатина-1.

Используемым образцом для введения был рекомбинантный мышинный несфатин-1,  
приготовленный в Демонстрационном примере 16, растворенный в 200 мкл  
35 физиологического раствора хлорида натрия с тем чтобы содержал 10 нмоль, и в качестве  
контрольного образца использовался только физиологический раствор хлорида натрия  
(Раствор хлорида натрия). При использовании туберкулинового шприца, оснащенного  
40 иглой 25G, 200 мкл каждого образца было введено один раз в брюшную полость каждой  
мышы или гиподерму спины каждой мышы, и отсчет времени введения начинали  
непосредственно перед началом темного периода (6 ч вечера). Другие условия были  
аналогичными тем, которые указаны в Демонстрационном примере 18.

#### **<Результат >**

Результат измеренного количества потребленной пищи в течение 0-3 часов после  
45 введения, когда несфатин-1 (10 нмоль ) или физиологический раствор хлорида натрия (0)  
были интраперитонеально (ip) или подкожно (sc) введены мышам, показан на панели А на  
50 Фиг.17, и в течение 0-14 часов показан на панели В на Фиг.17. На панели А на Фиг.17,

количество потребленной пищи имеет тенденцию к снижению в группах, которым 10 нмоль несфатина-1 интраперитонеально (ip) и подкожно (sc) введено, относительно группы с введением физиологического раствора хлорида натрия (0), и специфично для интраперитонеального введения, статистически значимое снижение ( $P < 0.05$ ) было отмечено. На панели В на Фиг.17 также, количество потребленной пищи имеет тенденцию к снижению в группе, которой 10 нмоль несфатина-1 было интраперитонеальное (ip) и подкожное (sc) введено, относительно группы с введением физиологического раствора хлорида натрия (0), но при интраперитонеальном введении группе (ip) и подкожном введении группе (sc) количество потребленной пищи не было значительно снижено ( $P < 0,005$ ) относительно группы с введением физиологического раствора хлорида натрия. В результате, как видно из обеих панелей А и В на Фиг.17, интраперитонеальное введение несфатина-1 имеет тенденцию проявления эффекта раннего снижения потребления пищи и эффект посредством подкожного введения имеет тенденцию к запозданию. Вышеуказанное наводит на предположение, что для периферического введения, несфатин-1, либо интраперитонеально, либо подкожно введенный, является эффективным относительно подавления потребления пищи. Для лекарств, которые действуют в мозге, наличие эффекта при периферическом введении является значимым в практическом применении, и в этом смысле несфатин-1 являлся подходящим в качестве фармацевтического лекарства, что основано на результатах Демонстрационных примеров 18 и 19.

#### **Демонстрационный пример 20**

**Изучение эффекта интраперитонеального введения частичного пептида (несфатин-1N23, несфатин-1M30, несфатин-1C29) несфатина-1 относительно контроля потребления пищи у мышей**

В Демонстрационных примерах 10 и 12, несфатин-1 был обнаружен из сайтов расщепления в несфатине для прогормон-конвертазы. При анализе функции несфатина-1, однако, важно идентифицировать функциональный участок указанного пептида, и также в его применении в лекарственных средствах, короткие аминокислоты по длине пептида рассматриваются как выгодные в плане получения, дозировки, антигенности и подобных. Таким образом, для изучения в дополнительных подробностях участков, обладающих активностью подавления потреблением пищи, частичные пептиды были приготовлены из структуры несфатина-1, имеющего длину в 82-аминокислоты, и эксперимент осуществляли с измерением количества потребленной пищи, когда мышам осуществляли интраперитонеальное введение.

Из аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 14) мышинового несфатина-1,

полученного из последовательности мышиноного несфатина, последовательность из аминокислотных номеров с 1 до 23 из amino конца определяли как несфатин-1N23, последовательность из аминокислотных номеров 23 - 53 - как несфатин-1M30, и последовательность из аминокислотных номеров 54 - 82 - как несфатин-1C29.

несфатин-1N23:

ValProIleAspValAspLysTчLysValHisAsnTчGluProValGluAsnAlaArgIleGluPro (SEQ ID NO: 42)

несфатин-1M30:

ProAspTчGlyLeuTyrTyrAspGluTyrLeuLysGlnValIleGluValLeuGluTчAspProHisPheArgGluLysLeuGlnLys (SEQ ID NO: 41)

несфатин-1C29:

AlaAspIleGluGluIleArgSerGlyArgLeuSerGlnGluLeuAspLeuValSerHisLysValArgTчArgLeuAspGluLeu (SEQ ID NO: 43)

Каждый используемый пептид несфатина-1N23, несфатина-1M30 и несфатина-1C29 являлся синтетическим пептидом, получение которого было заказано у Biologica Co., Ltd., и очищался путем использования ВЭЖХ до чистоты 95% или выше. Каждый пептид приготавливали в физиологическом растворе хлорида натрия с содержанием 50 нмоль на 200 мкл, который использовался в качестве образца, и как контрольный образец использовали только физиологический раствор хлорида натрия (носитель). При использовании туберкулинового шприца, снабженного иглой 25G, 200 мкл каждого образца было введено один раз в брюшную полость каждой мыши (5 животных на группу), и отсчет времени введения начинали непосредственно перед началом темного периода (6 ч вечера). Используемые мыши были самцами линии ICR (Nippon SLC) и условия содержания были аналогичными тем, которые указаны в Демонстрационном примере 18.

Каждая мышь, которая получала введение, помещалась в индивидуальную клетку, и в течение 0-3 часов после введения измеряли массу снижения зернового корма для определения количества потребленной пищи. Для изучения достоверной разницы использовался дисперсионный анализ.

Осуществляли сравнение путем выравнивания аминокислотных последовательностей человеческого, крысиного и мышиноного несфатина-1. При использовании аминокислотной последовательности человеческого несфатина-1 (SEQ ID NO: 13), мышиноного несфатина-1 (SEQ ID NO: 14) и крысиного несфатина-1 (SEQ ID NO: 15), выравнивание осуществляли с помощью амореяма CLUSTAL-W (Higgins et al., Nucleic Acids Research, Vol. 22, pp. 4673-4680, 1994).

<Результат >

Результат измеренного количества потребленной пищи в течение 0-3 часов после введения, когда физиологический раствор хлорида натрия (Носитель), несфатин-1N23 (-N23), несфатин-1M30 (-M30) и несфатин-1C29 (-C29) интраперитонеально вводили мышам, показан на панели А на Фиг.18. В группе с введением несфатина-1M30 (N-1b) относительно контрольной группы (Носитель), которой вводили физиологический раствор хлорида натрия, отмечалось значительное снижение ( $P < 0,02$ ) количества потребленной пищи. Однако, в группе с введением несфатина-1N23 (N-1a) и группе с введением несфатина-1C29- (N-1c), не отмечалось значимого снижения или повышения количества потребленной пищи. Вышеуказанное показывает, что несфатин-1M30 наиболее важный функциональный участок для активности несфатина-1 (и несфатина) относительно подавления потребления пищи. Также, поскольку интраперитонеальное введение несфатина-1M30 влияет на активность подавления потребления пищи, было определено возможное использование указанного полипептида в качестве лекарственного средства.

Результат выравнивания аминокислотных последовательностей человеческого, крысиного и мышинного несфатина-1, и участков несфатина-1N23, несфатина-1M30 и несфатина-1C29 показано на панели В на Фиг.18. Показано, что аминокислотные последовательности участков несфатина-1M30 являются высоко консервативными среди видов.

#### **Демонстрационный пример 21**

##### **Схема РИА системы и определение несфатин-1 пептида в ткани гипоталамуса**

Из результата с антителом (несфатин-1 IgG) против несфатина-1 и антителом (PC1/3 и PC2) против прогормон-конвертазы в клетках крысиного гипоталамуса в Демонстрационном примере 11, было продемонстрировано, что несфатин и прогормон-конвертаза экспрессируются в аналогичных клетках и несфатин-1 вероятно продуцируется там. Для дальнейшего изучения данного предположения, была сконструирована система конкурентного РИА, которая детектирует несфатин или несфатин-1, и сравнивали способ фракционирования с использованием ВЭЖХ с обращенной фазой образца, экстрагированного из ткани крысиного гипоталамуса и способа приготовления несфатина-1 путем синтеза.

Система конкурентного РИА была создана при использовании несфатин-1 IgG, приготовленного в Демонстрационном примере 10, и несфатин-1 полипептида, меченного биотином. Несфатин-1 IgG, растворенный в PBS, в 10 мкг/мл помещали в 96-луночную плату для ELISA (SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.: MS-8596F) в концентрации 50 мкл/луночку, которые герметизировали и оставляли при 4°C в течение всей ночи для иммобилизации антитела. После промывания PBS каждой лунки планшета с

иммобилизованным антителом, PBS, содержащая 10% бычий сывороточный альбумин (BSA), распределяли в концентрации 250 мкл/лунку и планшеты оставляли при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем каждую лунку планшета промывали трижды с PBS и получали планшет с иммобилизованным антителом.

Для приготовления меченого несфатина-1, цистеиновый остаток добавляли к концу несфатина-1 (несфатин-1 Cys: SEQ ID NO: 62). В остальном способ приготовления был аналогичным указанному в Демонстрационном примере 16, ПЦР для получения нуклеиновой кислоты, кодирующей несфатин-1 Cys, осуществляли при использовании следующего набора праймеров:

Прямой праймер: 5'-  
GGTCCGCGGGTCTGGTTCGCGTGGTTCTCSTATCGATGTGGACAAGACCAA-3'  
(SEQ ID NO: 63)

Обратный праймер: 5'-  
GGTTGCGGCCGCTTAACACCTCTTCAGCTCATCCAGTCTCG-3' (SEQ ID NO: 64)

Несфатин-1 Cys, экспрессированный и очищенный по способу, указанному в Демонстрационном примере 16, растворяли в 0,1М фосфатном буфере (pH 6,0), содержащем 50 мМ 2-меркаптоэтанолamina и 1 мМ EDTA, и обрабатывали при 37°C в течение 90 минут. Затем добавляли трифторуксусную кислоту (TFA) до 0,1%, и наносили на колонку Sep-Pak C18 (Waters). После промывания колонки 10 мл водного раствора 0,1% TFA и 10% ацетонитрила, элюировали 3 мл водного раствора 0,1% TFA и 60% ацетонитрила. Затем элюат лиофилизировали, он был растворен в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,0) до 5 мг/мл, и добавляли 20 мг/мл биотин (Long Arm) малеимида (VECTRO Lab.), растворенного в 1/40 объеме диметилформамида (DMF) и оставляли для взаимодействия при комнатной температуре в течение 3 часов. К несфатин-1 Cys, прореагировавшему с биотин (Long Arm) малеимидом, TFA добавляли до 0,1%, и применяли для ВЭЖХ, оснащенной колонкой с обращенной фазой C18 (Nacalai Tesque Inc.: COSMOSIL (товарный знак) 5C18-AR-300 20.0 mm I.D. × 150 mm). При мониторинге поглощения при длине волны 210 нм, колонку промывали водным раствором 0,1% TFA и затем водным раствором 20% ацетонитрила, содержащего 0,1% TFA, до того, как поглощение элюата перестает наблюдаться. Затем пропускали водный раствор ацетонитрила при градиенте 20-60% для получения фракции, содержащей наибольший пик поглощения при 210 нм. Полученную фракцию лиофилизировали и затем растворяли в PBS, которую использовали в качестве меченого несфатина-1.

Меченный несфатин-1 растворяли до 1 мкг/мл в PBS, содержащем 2% BSA. Для построения стандартной кривой рекомбинантный несфатин-1, приготовленный в

Демонстрационном примере 16, растворяли до концентрации 6000 нг/мл в PBS, содержащей 2% BSA, затем опять растворяли в PBS, содержащей 2% BSA, при знаменателе 2 и использовали (стандартные образцы: 6000, 3000, 1500, 750,0, 375,0, 187,5, 93,8 нг/мл). Пятьдесят мкл каждого приготовленного меченного несфатина-1 и стандартных образцов помещали в пробирки для микроанализа и перемешивали, и 50 мкл каждого из них распределяли в лунку планшеты с иммобилизованным антителом. В качестве примера биологического образца, 50 мкл цереброспинальной жидкости, как она была собрана, или образца, растворенного в 2-кратном PBS, содержащем 2% BSA, смешивали с 50 мкл раствора меченного несфатина-1 в пробирке для микроанализа, и 50 мкл из этого было помещено в лунки планшеты с иммобилизованным антителом (исследуемый образец). После помещения в планшеты с иммобилизованным антителом, оставляли при комнатной температуре в течение 1 часа, реакционный образец в лунке выбрасывали и промывали трижды в PBS, содержащем 0,2% Tween 20. Затем 50 мкл авидин-пероксидазы (Sigma, A7419-2ML) растворяли 1/1000 с PBS, содержащем 2% BSA, и 0,2% Tween 20 распределяли к каждой лунке и оставляли при комнатной температуре в течение 30 минут. После реакции, раствор из каждой лунки удаляли, и затем промывали четыре раза в PBS, содержащем 0,2% Tween 20, промывали дважды в TBS (50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 8,0). К каждой лунке планшеты с иммобилизованным антителом, добавляли 50 мкл субстрата пероксидазы, TMB (PIERCE: 1-Step (TM) Turbo TMB), и оставляли для взаимодействия при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем к каждой лунке, 50 мкл 0,5 N серной кислоты добавляли для остановки реакции, поглощение при длине волны 450 нм и при длине волны 620 нм измеряли с помощью спектрофотометра для прочтения поглощения планшетов, и поглощение при длине волны 620 нм вычиталось от такового при длине волны 450 нм (450 (Δ620) нм) с получением измеряемого значения.

Анализ экспрессии несфатина-1 в гипоталамусе осуществляли путем фракционирования при использовании ВЭЖХ с пептидом, экстрагированным из ткани в качестве образца. Гипоталамус вырезали из мозга восьми крыс, гомогенизировали в 4 мл водного раствора 0,1% TFA с помощью гомогенизатора Teflon (торговое наименование), и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 минут со сбором супернатанта. После собранный супернатант профильтровывали с помощью фильтра (Millipore), имеющего размер пор 0,45 мкм, затем его пропускали через колонку Sep-Pak C18 (Waters), и колонку промывали 5 мл водного раствора 0,1% TFA. Затем, к колонке добавляли 3 мл водного раствора 60% ацетонитрила для элюции, и элюат высушивали в испарителе. Высушенный продукт растворяли в 0,8 мл водного раствора 0,1% TFA, центрифугировали при 10000



об/мин в течение 10 минут, и 500 мкл супернатанта инжектировали в устройство ВЭЖХ, оснащенного колонкой с обращенной фазой C18 (Nacalai Tesque Inc.: COSMOSIL %C18-  
5 AR-II, 4.6 mm I.D. × 250 mm). После введения образца, водный раствор 0,1% TFA пропускали через колонку при скорости потока 1 мл/мин при мониторинге поглощения элюата при длине волны 224 нм. После промывания, при сохранении скорости потока, ацетонитрил при 0-60% концентрации градиента ( $\Delta 1\%/мин$ ) пропускали в присутствии  
10 0,1% TFA со сбором элюата в виде 1 мл фракции. После замораживания полученной фракции при  $-80^{\circ}C$ , ее лиофилизировали, и образцы после сушки каждый растворяли в 200 мкл PBS, содержащей 2% BSA, и несфатин и несфатин/несфатин-1 измеряли с  
15 помощью способа конкурентного РИА. Аналогично, из образцов, полученных путем сушки, 600 мкл цереброспинальной жидкости собирали от восьми крыс, пептидные образцы были приготовлены, фракционированы путем ВЭЖХ, и элюированные фракции изучались посредством системы конкурентного РИА. Также, в качестве контроля, 80 мкг  
20 рекомбинантного несфатин-1 пептида, приготовленного в Демонстрационном примере 16, растворяли в 100 мкл водного раствора 0,1% TFA, и вводили в ВЭЖХ, и фракции, в которых несфатин-1 был элюирован, детектировали.

25 <Результат >

Стандартная реакционная кривая, полученная измерением стандартных образцов в системе конкурентного РИА, показана на Фиг.19 А-1. Было показано, что с увеличением  
30 концентраций прореагировавшего несфатина-1, связывание меченого несфатина-1 полностью ингибируется и поглощение при 450 ( $\Delta 620$ ) снижается, показывая, что концентрации несфатина-1 в образцах могут быть определены в этой системе. Чувствительность системы соответствует 4,6 нг/пробирку (93 нг/мл) несфатина-1.  
35 Результат измерения концентрации несфатина-1 (несфатин) в цереброспинальной жидкости, определенный этой системой конкурентного РИА, показан на Фиг.19 А-2. Значения, полученные измерением цереброспинальной жидкости как таковой или после  
40 разбавления 1/2 (пересчитанной с использованием коэффициента разбавления после измерения) практически аналогичны и показывают, что присутствует около 230 нг/мл несфатина-1 (несфатин).

b-1 на Фиг.19В показывает результат фракционирования посредством ВЭЖХ  
45 пептидного образца, экстрагированного из крысиного гипоталамуса, и определения присутствия несфатина-1 в фракции, и b-2 на Фиг.19В показывает результат, в котором аналогичное изучение осуществляли при использовании пептидного образца,  
50 экстрагированного из крысиной цереброспинальной жидкости. В обоих b-1 на Фиг.19В и b-2 на Фиг.19В, реакционный пик, который вероятно принадлежит несфатину-1, отмечен

для фракций под номерами 44 и 45. В результате, когда рекомбинантный несфатин-1 был фракционирован посредством ВЭЖХ при аналогичном условии, несфатин-1 был элюирован во фракции под номером 44, фактором, присутствие которого было обнаружено во фракции гипоталамуса, полученной с помощью ВЭЖХ, и цереброспинальной жидкости с помощью системы конкурентного РИА, предполагается являлся несфатин-1.

#### Демонстрационный пример 22

**Изучение эффекта интраперитонеального введения частичного пептида (несфатина-1M16, несфатина-1M14, несфатина-1M10M) несфатина-1M30 относительно контроля потребления пищи у мышей**

В Демонстрационном примере 20, изучение эффекта подавления потребления пищи полученным частичным пептидом несфатин-1 привело к изобретению несфатина-1M30. Кроме того, для изучения в дополнительных подробностях участков, обладающих активностью подавления потреблением пищи, частичный пептид несфатин-1M30 приготавливали из структуры несфатина-1M30, содержащего длину в 30-аминокислот, и эксперимент осуществляли с измерением количества потребленной пищи, когда мышам осуществляли интраперитонеальное введение.

Для несфатина-1M16, содержащего 16-аминокислот, несфатина-1M14, содержащего 14-аминокислот в длину, и несфатина-1M10M, содержащего 10-аминокислот в длину, которые являются частичными пептидами мышинового несфатина-1M30, приготавливание синтетических пептидов, имеющих следующие последовательности, осуществлялось Biologica Co., Ltd. и были очищены посредством ВЭЖХ до чистоты 95% или выше.

несфатин-1M16: N-ProAspTчGlyLeuTyrTyrAspGluTyrLeuLysGlnValIleGlu-C (SEQ ID NO: 71)

несфатин-1M14: N-ValLeuGluTчAspProHisPheArgGluLysLeuGlnLys-C (SEQ ID NO: 72)

несфатин-1M10M: N-LysGlnValIleGluValLeuGluTчAsp-C (SEQ ID NO: 73)

Каждый пептид приготавливали в физиологическом растворе хлорида натрия с содержанием 10 пмоль на 100 мкл, который использовался в качестве образца, и как контрольный образец использовали только физиологический раствор хлорида натрия (носитель). Физиологический раствор хлорида натрия в качестве контроля и приготовленные пептидные образцы интраперитонеально вводили по 100 мкл на мышью (6 животных на группу). Используемые мыши были самцами линии ICR (Nippon SLC) и условия содержания были аналогичными тем, которые указаны в Демонстрационном

примере 18.

Каждая мышь, которая получала введение, помещалась в индивидуальную клетку, и в течение 0-3 часов после введения измеряли массу снижения зернового корма для определения количества потребленной пищи. Для изучения достоверной разницы использовался дисперсионный анализ.

<Результат >

Фиг.20 показывает количество потребленной пищи в течение 0-3 часов после введения, когда частичный пептид несфатин-1M30, несфатин-1M16 (M16), несфатин-1M10M (M10M) или несфатин-M14 (M14), интраперитонеально вводили мышам. Во всех группах, которым вводили несфатин-1M16 (M16), несфатин-1M10M (M10M) или несфатин-M14 (M14) относительно контрольной группы (Конт.), которой вводили физиологический раствор хлорида натрия только, отмечался значительный эффект подавления потребления пищи.

### Демонстрационный пример 23

#### Изучение эффекта человеческого несфатина-1M30 и мышиногo NUCB1-M30 на контроль над потреблением пищи

Демонстрационный пример 20 демонстрировал, что мышиный несфатин-1M30 обладает эффектом подавления потребления пищи. На основании этого, приготавливали человеческий несфатин-1M30 и изучали его эффект на поведение по потреблению пищи при введении мышам. Нуклеобиндин-1 (NUCB1) является фактором, который образует семейство, имеющее высокую гомологию с NEFA/несфатином в аминокислотной последовательности пептидов и нуклеотидной последовательностью генов. Таким образом, создавали NUCB1-M30, который является участком соответствующим несфатину-1M30 NUCB1, и вводили его мышам для изучения эффекта относительно потребления пищи.

Приготовление человеческого несфатина-1M30 (SEQ ID NO: 39) и мышиногo NUCB1-M30 путем химического синтеза относилось к Biologica Co., Ltd. и были очищены посредством ВЭЖХ до чистоты 95% или выше.

Человеческий несфатин-1M30:

N-

ProAspTчGlyLeuTyrTyrAspGluTyrLeuLysGlnValIleAspValLeuGluTчAspLysHisPheArgGluLysLeuGlnLys-C (SEQ ID NO: 39)

Мышиный NUCB1-M30:

N-

ProAspTчGlyLeuTyrTyrHisArgTyrLeuGlnGluValIleAsnValLeuGluTчAspGlyHisPheArgGluLy

sLeuGlnAla-C (SEQ ID NO: 103)

Каждый приготовленный человеческий несфатин-1М30 и мышинный NUCB1-М30  
приготавливали в физиологическом растворе хлорида натрия с содержанием 10 пмоль на  
100 мкл, который использовался в качестве образца для введения. Для несфатина1М30,  
который проявлял активность подавления потребления пищи, тот, который был  
приготовлен в Демонстрационном примере 20 использовался в качестве сравнительного  
образца в таких же количествах как несфатин-1М30 и NUCB1-М30, и в качестве  
контрольного образца использовали только физиологический раствор хлорида натрия  
(носитель).

Физиологический раствор хлорида натрия в качестве контроля и приготовленные  
пептидные образцы интраперитонеально вводили по 100 мкл на мышшь (6 животных на  
группу). Используемые мышши были самцами линии ICR (Nippon SLC) и условия  
содержания были аналогичными тем, которые указаны в Демонстрационном примере 18.

Каждая мышшь, которая получала введение, помещалась в индивидуальную клетку,  
и в течение 0-3 часов после введения измеряли уменьшение массы зернового корма для  
определения количества потребленной пищи. Для изучения достоверной разницы  
использовался дисперсионный анализ.

Выравнивание аминокислотных последовательностей осуществляли для  
человеческого, крысиного и мышинного несфатина и человеческого, крысиного и  
мышинного NUCB1. В способе использовали аминокислотные последовательности  
человеческого, крысиного и мышинного несфатина из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 и SEQ  
ID NO: 8, соответственно, и аминокислотные последовательности человеческого,  
крысиного и мышинного NUCB1 из SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 92,  
соответственно, и анализировали посредством алгоритма Clustal-W.

<Результат >

Результат измерения количества потребленной пищи в течение 0-3 часов после  
введения, когда был введен человеческий несфатин-1М30 (человеческий /несфатин-1М30),  
мышинный несфатин-1М30 (мышинный /несфатин-1М30) или мышинный NUCB1-М30  
(мышинный NUCB1), показан на Фиг.21А. Фиг.21А показывает, что во всех группах,  
которые получали человеческий несфатин-1М30 (человеческий /несфатин-1М30),  
мышинный несфатин-1М30 (мышинный /несфатин-1М30) или мышинный NUCB1-М30  
(мышинный NUCB1) относительно контрольной группы (Носитель), которые получали  
физиологический раствор хлорида натрия только, значительный эффект подавления  
потребления пищи был отмечен.

Также результаты выравнивания аминокислотных последовательностей для

человеческого, крысиного и мышинного несфатина и для человеческого, крысиного и мышинного NUCB1 и участков, соответствующих несфатину-1 и несфатину-1M30, показаны на Фиг. 21В - 21С. Показано, что аминокислотные последовательности высоко консервативны в участках, соответствующих несфатину и несфатину-1 из NUCB2, в частности участку, соответствующем несфатину-1M30.

#### Демонстрационный пример 24

##### Изучение экспрессии участка несфатинового гена в крысином гипоталамусе

Экспрессию несфатиновой мРНК в гипоталамусе мозга анализировали с помощью способа гибридизации *in situ* по Демонстрационному примеру 8. Для дальнейшего анализа участка, где несфатиновый ген экспрессирован, осуществляли исследование путем гибридизации *in situ* при использовании радиоизотопа.

При использовании восьминедельных самцов крыс линии Wistar (купленных у Nippon SLC) (масса тела : 220-250 г), которые содержались в свободном доступе к еде, крысы были глубоко анестезированы с помощью пентобарбитала в световой период, и мозг фиксировали путем перфузирования 4% параформальдегидом, растворенным в ледяном 0,1М боратном буфере (pH 9.5), из сердца. Мозг экстрагировали, и погружали в 0,1М боратный буфер (pH 9.5), содержащий 10% сахарозу и 4% параформальдегид, в течение 2 дней. Фиксированный мозг замораживали в сухом льду-ацетоне и делали срезы с использованием криостата толщиной 20 мкм, которые помещали на предметное стекло (MAS покровное стекло S-9116, приготовленное Matsunami Glass).

Для приготовления зонда, меченного радиоизотопом, использовали плазмиды, которая была получена путем расщепления плазмиды для приготовления NEFA зонда, которая использовалась в Демонстрационном примере 2, с рестрикционным ферментом NcoI и затем проводили ее очистку. К 0,1 мкг плазмиды добавляли 20 Ед (1 мкл) SP6 РНК полимеразы (Promega, P1085) при условии 19 мкл раствора, содержащего 36 мМ Tris-HCl буфера (pH 7,5), 6 мМ хлорида магния, 2 мМ спермидина, 8 мМ дитиотреитол, 25 мМ аденозин трифосфата /гуанозин трифосфата /цитозин трифосфата, 5 мМ урацил трифосфата и 5 мМ [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-урацил трифосфата, и 1мкл ингибитора рибонуклеазы RNAsin™ (Promega, N2111), и проводили реакцию при 37°C в течение 60 минут с получением <sup>35</sup>S-меченного NEFA кРНК зонда. После реакции для остановки реакции добавляли 20 мкл TNE буфера (10 мМ Tris-Cl, pH 8,0, 0,5 М NaCl и 0,25 мМ EDTA, pH 8,0), и затем зонд очищали при использовании картриджей для очистки нуклеиновых кислот NENSORB™ PREP Nucleic Acid Purification Cartridges (Perkin-Elmer, Inc., NLP028001EA) в соответствие с прилагаемым протоколом.

Предметное стекло с приготовленным срезом образца высушивали в течение ночи

под вакуумом перед гибридизацией, обрабатывали PBS, содержащим 10 мкг/мл протеазы К (Sigma, P2308) при 37°C в течение 30 минут, и промывали дважды с PBS, и кроме того обрабатывали, погружая в 0,1 М буфер триэтиламин-соляная кислота (рН 8,0),  
5 содержащий 0,25% уксусный ангидрид, при комнатной температуре в течение 10 минут, с последующей промывкой дважды с 2× концентрированным SSC. Промытый срез образца обезвоживали путем погружения в 75% этанол, 95% этанол и 99% этанол в указанном  
10 порядке, высушивали на воздухе и в дальнейшем высушивали под вакуумом.

На сухое предметное стекло среза образца, помещали раствор для гибридизации *in situ* (10 mM Tris-HCl буфера, рН 8,0, 30 mM NaCl, 10% сульфат декстрана, 1×  
15 концентрированный раствор Денхардта, 12 mM EDTA, 50% деионизованный формамид, 0,5 мг/мл дрожжевой рРНК) так, чтобы покрыть срез ткани мозга, и предварительно гибридизировали при 65°C в течение 1 часа. После удаления прегибридизационного раствора, 80 мкл, на стекло помещали гибридизационный раствор, содержащий 10<sup>6</sup> имп. в  
20 мин/мл <sup>35</sup>S-меченного NEFA кРНК зонда и 10 mM дитиотреитол, и покровное стекло помещали в этот раствор, что помещали камеру и оставляли для прохождения гибридизации в течение всей ночи при 65°C. Затем предметное стекло после  
25 гибридизации промывали четыре раза с 4× концентрированным SSC, обрабатывали с TNE буфером (10 mM Tris-HCl, рН 8,0, 0,5 M NaCl, и 0,25 mM EDTA, рН 8,0), содержащим 20 мкг/мл РНКазы А, при 37°C в течение 30 минут, промывали дважды с 2× концентрированным SSC при комнатной температуре, с дальнейшим промыванием  
30 дважды с 0,1× концентрированным SSC при 65°C в течение 30 минут. Предметное стекло после промывания обезвоживали путем погружения в 75% этанол, 95% этанол и 99% этанол в указанном порядке, и высушивали на воздухе. После того, как предметное стекло,  
35 содержащее тканевый срез помещали на рентгеновскую пленку и экспонировали в течение 7 дней, его погружали в 2× растворенную светочувствительную фотографическую эмульсию (Kodak, NTB3) и экспонировали свету в течение 3 недель. После экспонирования предметное стекло промывали водой, окрашивали тионином, и  
40 исследовали черные пятна, полученные в результате облучения, под микроскопом.

Положение каждой части в мозге крыс было идентифицировано в соответствии с  
45 The Rat Brain в Stereotaxic Coordinates, Paxinos G. and Watson C. (Academic Press) (USA) 1986.

#### <Результат >

Панель А на Фиг.22 показывает изображение гибридизации *in situ* тканевого среза,  
50 содержащего перивентрикулярное ядро (PVN) и супраоптическое ядро (SON), панель В на

Фиг.22 показывает, что тканевый срез содержит zona incerta (Zi) и дугообразное ядро (Arc), и панель С на Фиг.22 показывает, что срез ткани содержит латеральную область гипоталамуса (LHA). В каждой области PVN, SON, Zi, Arc и LHA, пятна, которые были светочувствительны гибридацией радиоизотоп-меченного NEFA кРНК зонда, показывают экспрессию NEFA гена.

#### Демонстрационный пример 25

##### Изучение эффекта интравентрикулярного введения несфатина относительно поведения по потреблению пищи

В то время, как в Демонстрационном примере 6 изучали количество потребленной пищи в течение 0-1 часа/1-3 часов /3-6 часов после введения несфатина крысам, эффект относительно поведения по потреблению пищи в течение 6-12 часов после введения был дополнительно изучен здесь.

Для показа воспроизводимости Демонстрационного примера 6, количество потребленной пищи в течение 0-1 часа после введения было определено, когда 0 (PBS только), 1, 4 и 20 пмоль рекомбинантного несфатина вводили в третий желудочек мозга, как и в Демонстрационном примере 6. Также, таким же образом, как и в Демонстрационном примере 6, затем в желудочек крысы было введено 5 пмоль несфатина, количество потребленной пищи определяли в течение 0-1 часа/1-3 часов /3-6 часов после введения. Используемая контрольная группа была та, крысы которой получали только физиологический раствор хлорида натрия (0 пмоль). Для изучения достоверной разницы использовался дисперсионный анализ.

#### <Результат >

Как показано на панели А на Фиг.23, количество потребленной пищи в 0-1 часа после введения 4 пмоль или 20 пмоль несфатина в желудочек мозга было значительно снижено по сравнению с контрольной группой (0 пмоль) ( $p < 0.01$ ). Также, как показано на панели В на Фиг.23, значимое снижение количества потребленной пищи отмечалось у индивидуума, который получал интравентрикулярное введение 5 пмоль несфатина в течение 0-1 часа ( $p < 0,01$ ), 1-3 часов ( $p < 0,05$ ) и 3-6 часов ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольной группой (0 пмоль). Однако, для количества потребленной пищи в течение 6-12 часов, не было обнаружено различия между группой, получающей 5 пмоль несфатина, и контрольной группой.

#### Демонстрационный пример 26

##### Изучение количества экспрессируемой несфатиновой мРНК и несфатинового полипептида в гипоталамусе крыс в течение голодания

Для изучения экспрессии несфатинового гена в течение голодания, осуществляли

гибридизацию *in situ* участков гипоталамуса мозга крыс, которые имели свободный доступ к пище, и голодающих крыс, и определяли повышение или снижение количества несфатиновой мРНК в дугообразном ядре, перивентрикулярном ядром, латеральной области гипоталамуса и супраоптического ядре из ткани. Также, для изучения количества экспрессируемого пептида несфатин-1 в перивентрикулярном ядре, участки гипоталамуса мозга крыс, которые имели свободный доступ к пище, и голодающих крыс, вырезали и экстрагированные пептиды определяли с помощью системы конкурентного РИА.

Как в Демонстрационном примере 8, используемые крысы являлись индивидуумами (контрольная группа), которые получали свободный доступ к пище, и индивидуумами (голодающая группа), которые содержались только при наличии воды без какого либо корма в течение 48 часов. Для определения количества экспрессируемой несфатиновой мРНК в каждом участке гипоталамуса, тканевые срезы приготавливали таким же образом, как указано в Демонстрационном примере 24, которые подвергали гибридизации *in situ* и изображение, полученное путем облучения рентгеновской пленки, измеряли при использовании анализатора изображений (Imaging Research Inc., MCID™ Elite) (Imaki et al., Brain Research, Netherlands, 1993, Vol. 623, pp. 223-228). Плотность облученного изображения каждого участка дугообразного ядра, перивентрикулярного ядра, латеральной области гипоталамуса и супраоптического ядра определяли, и значения переводили в количественные значения относительно оптических значений по содержащей 256 градаций шкале серого, от белого к черному, которые затем превращали в количественные значения как относительные оптические плотности в соответствии со следующим уравнением с получением абсолютных значений для мРНК экспрессии :

Относительная оптическая плотность =  $\log_{10}(256/\text{относительная оптическая плотность})$ .

Каждый участок дугообразного ядра, перивентрикулярного ядра, латеральной области гипоталамуса и супраоптического ядра в мозге крыс идентифицировали по The Rat Brain в Stereotaxic Coordinates, Paxinos G. and Watson C. (Academic Press) (USA) 1986.

Несфатин-1 пептид в перивентрикулярном ядре мозга крыс определяли следующим образом. Крыс, которые получали свободный доступ к пище, и те, которые голодали, как описано выше, скарificировали путем декапитации, и мозг немедленно замораживали в сухом льду-этаноле, и нарезали на криостате на срезы толщиной 60 мкм. Ткань окрашивали Nissl, и части соответствующие перивентрикулярному ядру на обеих сторонах мозга разделяли и извлекали. Извлеченную ткань гомогенизировали в 100 мкл 0,1 N соляной кислоты в 1,5 мл микропробирке при использовании пестика для



5 микропробирки (Scientific Specialties, 1005-39). Раствор для гомогенизации центрифугировали в микроцентрифуге при 15000 об/мин в течение 20 минут, собирали супернатант и удаляли растворитель путем лиофилизации. Лиофилизованный образец  
 10 растворяли в 100 мкл PBS, и количество несфатин-1 пептида определяли при условии 50 мкл/лунку посредством конкурентного РИА, описанного в Демонстрационном примере 21.

#### 10 <Результат >

Панель А на Фиг.24 показывает результат изображения анализа гибридизации *in situ* экспрессии несфатиновой мРНК в различных областях гипоталамуса мозга крыс:  
 15 дугообразном ядре (Arc), перивентрикулярном ядре (PVN), латеральной области гипоталамуса (LHA) и супраоптическом ядре (SON), в группе со свободно доступной пищей (контрольная группа) и в голодающей группе. В дугообразном ядре (Arc), латеральной области гипоталамуса (LHA) и супраоптическом ядре (SON), не отмечено  
 20 различия в значении (относительная оптическая плотность) экспрессии несфатиновой мРНК в голодающей группе относительно контрольной группы. Напротив, в результате для перивентрикулярного ядра (PVN), количество экспрессируемой несфатиновой мРНК в голодающей группе было значительно снижено относительно контрольной группы.  
 25

Панель В на Фиг.24 показывает результат изображения анализа гибридизации *in situ* экспрессии несфатин-1 пептида в перивентрикулярном ядре (PVN) среди гипоталамических участков мозга крыс в группе со свободным доступом к пище  
 30 (контрольная группа) и голодающей группе. Было показано, что экспрессия несфатин-1 пептида в перивентрикулярном ядре значительно снижена в голодающей группе относительно контрольной группы.

35 Вышеуказанный результат показывает, что голодание значимо снижает экспрессию несфатинового (NEFA) гена и несфатина-1 в перивентрикулярном ядре гипоталамуса, что является важным в контроле над потреблением пищи.

#### 40 **Демонстрационный пример 27**

**Изучение эффекта интравентрикулярного введения несфатина-1 в мозг крыс относительно поведения по потреблению**

Показано в Демонстрационном примере 12, что часть несфатин-1 имеет активность  
 45 подавления потреблением пищи в эксперименте введения частичных пептидов несфатина. Для дальнейшего подтверждения эксперимента, изменения активности подавления потребления пищи со временем после введения изучалось.

50 Экспериментальные условия соответствовали таковым в Демонстрационном примере 12, и 5 пмоль несфатина-1 вводили в третий желудочек мозга крыс

непосредственно перед началом темного периода, измеряли количество снижения пищи (количества потребленной пищи) в течение 1 часа непосредственно после введения (0-1 ч), в течение 2 часов, спустя 1 час после введения (1-3 ч), в течение 3 часов, спустя 3 часа после введения (3-6 ч), и в течение 6 часов, спустя 6 часов после введения (6-12 ч) в качестве количества потребленной пищи. В качестве контрольной группой, измеряли количество потребленной пищи индивидуумами, которые получали только физиологический раствор хлорида натрия.

<Результат >

Фиг.25 показывает количество потребленной пищи в течение 0-1 ч, 1-3 ч, 3-6 ч и 6-12 ч, когда несфатин-1 был введен в третий желудочек мозга крыс. Значительное снижение количества потребленной пищи в 0-1 ч, 1-3 ч и 3-6 ч отмечали в группе с введением несфатина-1 относительно контрольной группой ( $p < 0,01$ ). Наоборот, в 6-12 ч, увеличение количества потребленной пищи отмечали группе с введением несфатина-1 относительно контрольной группы ( $p < 0,01$ ). Вышеуказанный результат показывает, что подавление потребления пищи из-за интравентрикулярного введения несфатина-1 является временным, и может отмечаться потеря фармакологического эффекта несфатина с течением времени и результативное восстановление потребления пищи.

#### **Демонстрационный пример 28**

**Изучение специфичности действия интравентрикулярного введения анти-несфатинового-1 антитела на повышение потребления пищи**

Показано в Демонстрационном примере 14, что эффект повышения потребления пищи отмечается, когда антитело против несфатина-1 вводится в желудочек крыс. Для подтверждения эффекта вследствие ингибирования эффекта несфатина-1, изучение осуществляли для определения ингибируется ли подавление потребления пищи вследствие интравентрикулярного введения несфатина-1 одновременным введением анти-несфатинового-1 антитела.

Экспериментальные условия соответствовали таковым в Демонстрационном примере 12, и для группы, которой вводили 5 пмоль несфатина-1 в третий желудочек мозга крыс непосредственно перед началом темного периода, и группы, которая получала 5 пмоль несфатина-1 и 8 мкг антитела против несфатина-1 (несфатин-1 IgG), измерялось количество потребленной пищи в течение 1 часа после введения и по сравнению с таковым для контрольной группы (был введен только физиологический раствор хлорида натрия). Также, изучался эффект потребления пищи для группы, которая получала только лептин (крысиный лептин: R & D Systems, 598-LP-01M) (1 мкг), который как известно обладает активностью по подавлению потребления пищи, путем интравентрикулярного

введения и группы, которая получала лептин и антитело против несфатина-1.

<Результат >

5 Фиг.26 представляет график, показывающий количество потребленной пищи через 1 час после введения для контрольной группы, которые получали только физиологический раствор (несфатин-1 IgG/несфатин-1/лептин: -/-/-), группы, в которой получали только  
10 несфатин-1 (несфатин-1 IgG/несфатин-1/лептин: -/+/-), группы, в которой получали несфатин-1 и антитело против несфатина-1 (несфатин-1 IgG/несфатин-1/лептин: +/+/-), группы, в которой получали лептин только (несфатин-1 IgG/несфатин-1/лептин: -/-/+), и  
15 для группы, в которой получали лептин и антитело против несфатина-1 (несфатин-1 IgG/несфатин-1/лептин: +/-/+). Количество потребленной пищи значительно снижалось в группе, которая получала только несфатин относительно контрольной группой (несфатин-1 IgG/несфатин-1/лептин: -/-/-), тогда как в группе, которая получала несфатин-1 и антитело против несфатина-1, эффект повышения количества потребленной пищи  
20 такое же как для контрольной группы отмечалось. В отличие от этого, в группе, которая получала лептин, количество потребленной пищи также снижалось, тогда как в группе, которая получала лептин и антитело против несфатина-1, не отмечалось эффекта повышения подавления количество потребленной пищи лептином. Этот результат предполагает, что эффект повышения потребления пищи антителом против несфатина-1 является результатом специфического подавления эффекта несфатина-1.

### 30 Демонстрационный пример 29

#### Изучение связывающей специфичности антитела против несфатина-1

35 Показано в Демонстрационном примере 28, что интравентрикулярное введение антитела против несфатина-1 специфически ингибирует эффект несфатина-1. Его свойства связывания с другими факторами, известными в настоящее время как имеющие активность относительно контролирования потребления пищи, были дополнительно изучены способом вестерн-блоттинг при использовании экстрактов мозга крыс.

40 Вестерн-блоттинг-анализ осуществляли способом, описанным в Демонстрационном примере 3 с первичным антителом, которое представляло собой замену поликлонального антитела против NAP на антитело против несфатина-1. Перед взаимодействием антитела против несфатина-1 с мембраной в вестерн-блоттинге в качестве эксперимента для изучения специфичности связывания антитела против несфатина-1, добавляли по 5 мкг каждого из пептида NAP1-Ab (Демонстрационный  
45 пример 10), лептина (Rat лептин: R & D Systems, 598-LP-01M),  $\alpha$ MSH (Melanocyte Stimulating Hormone; Peptide Institute, Inc., 4057-v), CART (Rat Cocaine- and Amphetamine-

Regulated Transcript 55-102; Peptide Institute, Inc., 4351-s), NPY (Human , Rat Neuropeptide Y; Peptide Institute, Inc., 4158-v), MCH (Human Melanin-Concentrating Hormone; Peptide Institute, Inc., 4369-v) и Orexin-A (Human , Rat, Mouse , Bovine Orexin-A; Peptide Institute, Inc., 4346-s) на 1 мкг антитела против несфатина-1, и реакцию ставили при комнатной температуре в течение 1 часа, и затем осуществляли анализ вестерн-блоттинг способом, описанным выше, для определения произошло связывание или нет.

<Результат >

Панель А на Фиг. 27 показывает изображение вестерн-блоттинга, проводимого с антителом против несфатина-1 при использовании белковых экстрактов из мозга крыс. В результате полоса была отмечена в положении молекулярной массы, соответствующей 47,5 кДа несфатинового полипептида. Панель В на Фиг.27 показывает изображение вестерн-блоттинга при около 47,5 кДа, осуществляемого после предыдущего взаимодействия антитела против несфатина-1 и различных пептидов. Когда антитело против несфатина-1 вводили в реакцию с NAP1-Ab, полоса 47,5 кДа исчезла, показывая, что предыдущее связывание NAP-1 Ab с NAP1-Ab пептидом блокирует сайт связывания несфатина. В отличие от этого, когда это произошло с лептином,  $\alpha$ MSH, CART, NPY, MCH и Orexin-A, и когда пептид не был подвергнут реакции с антителом к несфатину-1, 47,5 кДа полоса не исчезала. Эти результаты демонстрируют, что антитело к несфатину-1 специфически связывается с несфатином, но не с другими пептидами, связанными с потреблением пищи, такими как лептин,  $\alpha$ MSH, CART, NPY, MCH и Orexin-A.

### Демонстрационный пример 30

#### Изучение сайта экспрессии несфатина в продолговатом мозге крыс

В Демонстрационном примере 4, экспрессию в окружении гипоталамуса мозга крыс изучали при иммуногистохимическом анализе. Для дальнейшего изучения экспрессии несфатина в окружении продолговатого мозга крыс, осуществляли аналогичный иммуногистохимический анализ.

При использовании восьминедельных самцов крыс линии Wistar (купленных у Nirron SLC), тканевые срезы мозга части, содержащей продолговатый мозг приготавливали из образцов аналогично тому, как указано в Демонстрационном примере 4. Способ иммуногистохимического окрашивания был также аналогичным таковому, указанному в Демонстрационном примере 4. Кроме этого, NAP пептид (Демонстрационный пример 3) добавляли к антителу (1 мкг/мл) против NAP пептида с получением концентрации 100 мкг/мл, оставляли для прохождения реакции при комнатной температуре в течение 1 часа, и затем осуществляли иммуногистохимическое окрашивание также при использовании антитела.

<Результат >

Панель А на Фиг.28 показывает изображение иммуногистохимического окрашивания в ткани мозга, содержащей продолговатый мозг. В иммуногистохимическом окрашивании ткани мозга, содержащей продолговатый мозг, окрашивание было отмечено в STN: ядро солитарного тракта, и отмечали экспрессию несфатинового полипептида. Панель В на Фиг.28 показывает изображение иммуногистохимического окрашивания, выполненного после реакции антитела против NAR пептида с NAR пептидом. Поскольку окрашивание, наблюдаемое на панели А на Фиг.28, произошло путем взаимодействия анти-NAR антитела с NAR пептидом ранее, было продемонстрировано, что несфатиновый полипептид специфически окрашивался в этом иммуногистохимическом окрашивании. Результаты показывают, что несфатин также экспрессируется в ядре солитарного тракта, который является ядром висцерального сенсорного нерва, и, следовательно, вовлечен в механизм контроля над потреблением пищи.

### **Демонстрационный пример 31**

#### **Эффект введения троглитазона на лептин крови и интрацеребральную экспрессию несфатина у нормальных и лептин-устойчивых крыс с ожирением**

В Демонстрационном примере 2, изучалась индукция троглитазоном несфатинового (NEFA) гена в культивированных клетках, PPAR $\gamma$  агониста, который используется в качестве противодиабетического лекарства. Для дальнейшего изучения индуцированной экспрессии несфатина троглитазоном, троглитазон давали крысам для изучения индукции несфатина в мозге. Аналогично, уровень лептина в крови, который как известно является ответственным при контроле потребления пищи, изучался. При изучении, использовались нормальные крысы Zucker (Zucker +/+; Lean) и крысы линии Zucker fa/fa, модельные животные экспериментального ожирения, устойчивого к лептину.

В качестве животных, использовали 8 недельных самцов линии Zucker fa/fa (Zucker) и в качестве контроля крыс линии Zucker +/+ (Lean), которые были куплены у Nippon Charles River и которые содержались при освещении в течение 12 часового светового периода с 6 часов утра до 6 часов вечера и в течение 12 часового темного периода с 6 часов вечера до 6 часов следующего утра и питались порошком (Nippon Clea, CE-2) при 22°C. После предварительного содержания купленные крысы в течение одной недели, индивидуумов взвешивали и те, которые имели вес 200-250 г были выбраны среди других 9-10 недельных индивидуумов и использовали 6 животных на группу в эксперименте. Троглитазон (TGZ; Sankyo Co., Ltd.) вводили в концентрации 0,2% перемешанный с порошковой едой, к которой животные имели свободный доступ. В качестве контроля, который не получал троглитазон, использовались крысы, которые

имели доступ к нормальной порошковой пище. После содержания на троглитазон-содержащей пище или нормальной пищи в течение 10 дней в конце животных взвешивали и скарифицированы со сбором всей крови. Из собранной крови крыс разделяли сыворотку и определяли концентрацию лептина в сыворотке при использовании коммерческого набора для ELISA (Yanaihara Institute Inc., YK050) в соответствии с прилагаемым протоколом. Кроме того, удаляли мозг из скарифицированных крыс и подвергали вестерн-блоттингу аналогичным образом, как указано в Демонстрационном примере 3, плотность полос анализировали посредством анализатора изображений (Imaging Research Inc., MCID™ Basic), и степень развития окраски полосы экспрессировалась в относительных единицах.

<Результат >

Панель А на Фиг.29 представляет график, показывающий массу тела группы (TGZ: +), в которой пища, содержащая троглитазон, давалась нормальным крысам (Lean) и крысам линии Zucker fa/fa (Zucker), и группы (TGZ: -), в которой крысам давали пищу без троглитазона. У нормальных крыс и также у Zucker fa/fa крыс, не было отмечено значительной разницы в массе тела вследствие введения троглитазона. Также, независимо от введения троглитазона, Zucker fa/fa крысы весили значительно больше ( $p < 0,01$ ) относительно нормальных крыс.

Панель В на Фиг.29 представляет график, показывающий концентрацию лептина в крови группы (TGZ: +), в которой пища, содержащая троглитазон, давалась нормальным крысам (Lean) и крысам линии Zucker fa/fa (Zucker), и группы (TGZ: -), в которой крысам давали пищу без троглитазона. У нормальных крыс и Zucker fa/fa крыс, концентрация лептина в крови значимо снижено ( $p < 0,05$ ) вследствие введения троглитазона. Также, независимо от введения троглитазона, концентрация лептина в крови была значимо выше у крыс линии Zucker fa/fa ( $p < 0,01$ ) относительно нормальных крыс.

Панель С на Фиг.29 представляет график, показывающий в относительных единицах, плотность полос, полученных вестерн-блоттингом образцов белковых экстрактов мозга из группы (TGZ: +), в которой пища, содержащая троглитазон, давалась нормальным крысам (Lean) и крысам линии Zucker fa/fa (Zucker), и группы (TGZ: -), в которой крысам давали пищу без троглитазона. У нормальных крыс, не отмечено различия количества, экспрессируемого несфатина в мозге между группой (TGZ: +), в которой пища, содержащая троглитазон, давалась нормальным крысам (Lean) и крысам линии Zucker fa/fa (Zucker), и группы (TGZ: -), в которой крысам давали пищу без троглитазона. В отличие от этого, у Zucker fa/fa крыс, количество экспрессируемого несфатина в мозге значимо увеличено ( $p < 0,01$ ). Также, независимо от введения

троглитазона, количество экспрессируемого несфатина в мозге было значимо выше у Zucker fa/fa крыс ( $p < 0,01$ ) относительно нормальных крыс.

5 Вышеуказанный результат предполагает, что троглитазон, который использовался в качестве антидиабетического лекарства не индуцирует несфатин в мозге нормальных животных, тогда как он может вызывать экспрессию несфатина в мозге модельных животных, которые проявляют лептин-устойчивую патологию. В отличие от этого, 10 предполагается, что повышенные концентрации лептина в крови не могут быть получены вследствие введения троглитазона у обоих нормального животного и патогенетических животных, и наоборот концентрации в крови снижаются.

### 15 Демонстрационный пример 32

#### 20 Детекция несфатин-1 пептида во фракции, полученной посредством ВЭЖХ, экстракта из ткани гипоталамуса

Пептид, экстрагированный из ткани гипоталамуса в Демонстрационном примере 21, 20 в качестве образца подвергали ВЭЖХ фракционированию, и фракции изучали на присутствие несфатина-1 с использованием системы конкурентного РИА анализа. Кроме того, для изучения пептида, обнаруженного во фракции, является ли он молекулой 25 соответствующей несфатину-1, ВЭЖХ фракции экстракта ткани гипоталамуса анализировали с помощью вестерн-блоттинг-анализа.

ВЭЖХ фракции экстракта ткани гипоталамуса приготавливали аналогичным образом, как указано в Демонстрационном примере 21, и фракции №. (Фракция #) 43-47 30 лиофилизировали. Образцы после лиофилизации растворяли в 100 мкл PBS, и 20 мкл из них подвергали SDS-PAGE в 12% полиакриламидном геле, и затем осуществляли вестерн-блоттинг с антителом к несфатину-1 аналогичным образом, как указано в 35 Демонстрационном примере 3.

#### <Результат >

Панель А на Фиг.30 показывает изображение вестерн-блоттинга фракции №. 45, 40 полученной путем фракционирования пептида, выделенного из крысиного гипоталамуса посредством ВЭЖХ. Молекулярная масса полосы, детектированную вестерн-блоттингом, составляла 9,7 кДа, что почти согласовывалось с молекулярной массой рекомбинантно 45 приготовленного несфатин-1 пептида (Демонстрационный пример 10, Фиг.9С). Панель В на Фиг.30 показывает изображение части с молекулярной массой приблизительно в 9,7 кДа в изображении вестерн-блоттинга фракций № 43-47, полученный путем фракционирования пептида, выделенного из крысиного гипоталамуса посредством ВЭЖХ. 50 Полоса с 9,7 кДа наиболее четко обозревается для фракции № 45, результат согласуется с образцом, полученным определением фракции посредством конкурентного РИА,

полученной путем фракционирования экстракта пептида из гипоталамуса крысы путем ВЭЖХ (b-1 of Фиг.19В).

5 Вышеуказанный результат показывает, что молекула, соответствующая несфатин-1 присутствует в гипоталамусе крыс, и что молекула, соответствующая несфатину-1, может обнаруживаться путем фракционирования по способу, указанному в Демонстрационном примере 21, и с последующим определением посредством конкурентного РИА способа и/или вестерн-блоттинг способа.

### Демонстрационный пример 33

#### 15 Изучение специфичности иммуногистохимического окрашивания участков гипоталамуса крыс

В Демонстрационном примере 4, для анализа NEFA экспрессии в гипоталамусе мозга крыс, который относится к участку контроля над потреблением пищи, осуществляли иммуногистохимический анализ при использовании участков мозга крыс. Для изучения, является ли окрашивание несфатин-специфичным, иммуногистохимический анализ осуществляли снова, принимая во внимание свойство связывания пептида, известного в контроле потребления пищи, с антителом.

25 В способе, аналогичном указанному в Демонстрационном примере 4, осуществляли иммуногистохимическое окрашивание срезов тканей мозга крыс, каждый из которых содержал дугообразное ядро и перивентрикулярное ядро, для которого использовали антитело против несфатина-1 (несфатин-1 IgG; Демонстрационный пример 10) вместо поликлонального антитела против NAR в качестве первичного антитела. Также, перед реакцией первичного антитела с образцом ткани, добавляли 5 мкг каждого пептида антитела против несфатина-1 (Демонстрационный пример 10), лептина (Rat leptin: R & D Systems, 598-LP-01M),  $\alpha$ MSH (Melanocyte Stimulating Hormone; Peptide Institute, Inc., 4057-v), CART (Rat Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript 55-102; Peptide Institute, Inc., 4351-s) и NPY (Human, Rat Neuropeptide Y; Peptide Institute, Inc., 4158-v), известных 35 действием по контролю над потреблением пищи, на 1 мкг антитела против несфатина-1 антитело, и оставляли для взаимодействия при комнатной температуре в течение 1 часа, и затем использовали в иммуногистохимическом окрашивании для подтверждения специфичности реакции антитела.

45 <Результат >

Панель А на Фиг.31 показывает результат иммуногистохимического окрашивания при использовании антитела против несфатина-1 в ткани мозга крыс, содержащей дугообразное ядро, и результат иммуногистохимического окрашивания, выполненный 50 после взаимодействия антитела против несфатина-1 с различными пептидами. На панели



А на Фиг.31, поскольку а-1 показывает, что дугообразное ядро мозга крыс иммунологически окрашено с анти-несфатиновым-1 антителом, и а-2 показывает, что если антитело против несфатина-1 уже прореагировало с несфатин-1 пептидом, то происходит окрашивание, то было показано, что антитело против несфатина-1 детектирует несфатин, экспрессированный в дугообразном ядре. В отличие от этого, если антитело против несфатина-1 ранее прореагировало с лептином (а-3 в А на Фиг.31),  $\alpha$ MSH (а-4 в А на Фиг.31), CART (а-5 в А на Фиг.31) и NPY (а-6 в А на Фиг.31), иммунологического окрашивания в дугообразном ядре не происходит, показывая что эти пептиды не связываются с антителом против несфатина-1, и, таким образом, было показано, что при иммуногистохимическом окрашивании указанное антитело не взаимодействует с этими пептидами.

Панель В на Фиг.31 показывает результат иммуногистохимического окрашивания при использовании антитела против несфатина-1 в ткани мозга крыс, содержащей перивентрикулярное ядро, и результат иммуногистохимического окрашивания, выполненный после взаимодействия антитела против несфатина-1 с различными пептидами. На панели В на Фиг.31, поскольку b-1 показывает, что дугообразное ядро мозга крыс иммунологически окрашено антителом против несфатина-1, и а-2 показывает, что если антитело против несфатина-1 уже прореагировало с несфатин-1 пептидом, то происходит окрашивание, то было показано, что антитело против несфатина-1 детектирует несфатин, экспрессированный в перивентрикулярном ядре. В отличие от этого, если антитело против несфатина-1 ранее прореагировало с лептином (b-3 в В на Фиг.31),  $\alpha$ MSH (b-4 в В на Фиг.31), CART (b-5 в В на Фиг.31) и NPY (b-6 в В на Фиг.31), иммунологического окрашивания в дугообразном ядре не происходит, показывая что эти пептиды не связываются с антителом против несфатина-1, и, таким образом, было показано, что при иммуногистохимическом окрашивании указанное антитело не взаимодействует с этими пептидами.

В вышеуказанном результате, экспрессия несфатина специфически обнаруживается иммуногистохимическим окрашиванием при использовании антитела против несфатина-1, показывая, что несфатин экспрессируется в мозге крыс в дугообразном ядре и перивентрикулярном ядре.

#### **Демонстрационный пример 34**

**Изучение эффекта непрерывного введения несфатина-1 в желудочек крыс на массу жировой ткани**

Для изучения эффекта несфатина-1 на количество жировой ткани, несфатин-1 непрерывного вводили в желудочек крыс для анализа изменений массы жировой ткани и

др.

Несфатин-1 (5 пмоль в день) или физиологический раствор хлорида натрия только (контрольная группа) вводили в третий желудочек крысам при использовании осмотического насоса в течение 10 последующих дней (5 и 4 крысы использовали на группу). Интравентрикулярное введение крысам с помощью осмотического насоса осуществляли таким же образом, как указано в Демонстрационном примере 13.

После введения несфатина-1 или только физиологического раствора хлорида натрия в течение 10 дней, каждую крысу скарифицировали, срезали все абдоминальную подкожную жировую ткань, эпидермальную жировую ткань (белая жировая ткань) и ретроперитонеальную бурую жировую ткань, и определяли их массу. Также, были взяты икроножные мышцы билатеральной задней конечности и их массу определяли. Из измеренной массы тканей, определяли их соотношение с массой тела каждого индивидуума (масса ткани/массе тела, мг/г). Для изучения достоверной разницы использовался дисперсионный анализ.

#### <Результат >

Фиг.32 представляет график результатов, показывающий соотношение массы ткани каждой жировой ткани (А-Е) и икроножной мышцы (F), полученной от крыс, которым давали несфатин-1 или только физиологический раствор хлорида натрия в течение 10 дней, относительно массы тела. Для абдоминальной подкожной жировой ткани (А на Фиг.32), эпидермальной жировой ткани (В на Фиг.32) и мезентериальной жировой ткани (С на Фиг.32), отмечалось значительное снижение соотношения массы ткани к массе тела в группе с введением несфатина-1 относительно контрольной группы, которая получала физиологический раствор хлорида натрия только. Для ретроперитонеальной жировой ткани (D на Фиг.32), соотношение массы ткани к массе тела имеет тенденцию снижения, но не отмечено значимой разницы относительно контрольной группы. Кроме того, для бурой жировой ткани (Е на Фиг.32) и икроножной мышцы (F на Фиг.32), не отмечено значимой разницы в соотношении общей массы ткани к массе тела между контрольной группой и группой с введением несфатина-1.

Вышеуказанный результат показывает, что несфатин-1 обладает эффектом снижения соотношения массы белой жировой ткани к массе тела, т.е. снижения процентного содержания телесного жира. Также показано, что он не оказывает действия на соотношение массы бурой жировой ткани и мышечной ткани к массе тела.

#### **Демонстрационный пример 35**

**Изучение эффекта интраперитонеального введения несфатина-1 крысам на биохимические показатели крови.**

Изучали, связаны ли активности относительно подавления потребления пищи, подавления прибавления в весе или снижения количества жировой ткани с изменениями сахара в крови (содержание глюкозы в крови) и показателей, связанных с липидным обменом (содержание холестерина, содержание триглицеридов).

В качестве экспериментальных животных, использовали 7 недельных самцов мышей линии c57BL/6J, купленных у Nippon Clea, и они содержались при освещении в течение 12 часового светового периода с 6 часов утра до 6 часов вечера и в течение 12 часового темного периода с 6 часов вечера до 6 часов следующего утра и питались порошковым кормом (Nippon Clea, CE-2), при 22°C.

В брюшную полость мышей линии c57BL/6J, вводили 10 нмоль рекомбинантного мышинового несфатина-1, приготовленного в демонстрационном примере 16, растворенного в 100 мкл физиологического раствора хлорида натрия, и в качестве контрольного образца использовали только физиологический раствор хлорида натрия alone. При использовании шприца для введения туберкулина, оснащенного иглой 25G, 100 мкл каждого образца был введен один раз в брюшную полость каждой мыши (5 животных на группу), и отсчет времени введения начинали непосредственно перед началом темного периода (6 ч вечера).

Каждая мышь, которая получала введение, помещалась в индивидуальную клетку, и в течение 0-3 часов после введения измеряли массу снижения зернового корма для определения количества потребленной пищи. Также через 3 часа после введения каждая мышь была умерщвлена путем декапитации со сбором цельной крови, и собирали из нее сыворотку. В сыворотке определяли содержание глюкозы, общего холестерина и триглицерида при использовании коммерческих реагентов для определения (KYOWA MEDEX, Determiner L GLUII, Determiner L TCII, Determiner L TGII).

Для изучения достоверной разницы использовался дисперсионный анализ.

<Результат >

Фиг.33 представляет график результатов анализа количества потребленной пищи, глюкозы в крови, общего холестерина и триглицеридов, когда несфатин-1 или только физиологический раствор интраперитонеально вводили мышам.

Введение несфатина-1 значительно снижает количество потребленной пищи по сравнению с контрольной группой. В отличие от этого, небольшая разница отмечалась между группой с введением несфатина-1 и контрольной группой относительно содержания глюкозы в крови (глюкоза на фигуре), которая отражает уровень сахара в крови, или показателей липидного обмена, таких как содержание общего холестерина (холестерин на фигуре), содержание триглицеридов (триглицерид на фигуре).

Вышеуказанный результат показывает, что эффект несфатина-1 заключается в

подавлении потребления пищи, подавлении прибавления в весе и снижения количества жировой ткани при отсутствии изменений в показателях уровня сахара в крови и показателях липидного обмена.

5 В соответствии с настоящим изобретением, фактор, вовлеченный в нарушение контроля над потреблением пищи и/или контроль массы тела, может быть получен при использовании агониста PPAR $\gamma$ . Также несфатин и/или несфатин-1 могут применяться для профилактики и лечения заболеваний, связанных с метаболическим синдромом и нарушениями потребления пищи, таких как ожирение или липоматоз и нервная гиперфагия, и заболеваний, связанных с липоматозом, таких как сахарный диабет 2 типа, нарушение толерантности к глюкозе, гипертензия, гиперлипидемия, гиперурикемия, жировая инфильтрация печени, заболевания сердца, цереброваскулярные заболевания, синдром апноэ во сне, ортопедические заболевания, такие как остеоартроз, нарушения менструального цикла и злокачественные опухоли. Кроме того, вещество, такое как антитело, которое подавляет активность несфатина или несфатина-1, может применяться для профилактики и лечения анорексии в пост-операционный период и/или анорексии раковых больных, и заболеваний, связанных с нарушениями питания и кормления, таких как патологическое отвращение к пище.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

5 <110> Gunma University  
 Teijin Pharma Limited

10 <120> A Novel Physiologically Active Compound, NESFATIN, Related Compounds thereof and their Use

<130> X

15 <160> 124

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1  
 <211> 1263  
 <212> DNA  
 25 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 30 <222> (1)..(1263)  
 <223>

35 <400> 1  
 atg agg tgg agg acc atc ctg cta cag tat tgc ttt ctc ttg att aca 48  
 Met Arg Trp Arg Thr Ile Leu Leu Gln Tyr Cys Phe Leu Leu Ile Thr  
 1 5 10 15

40  
 tgt tta ctt act gct ctt gaa gct gtg cct att gac ata gac aag aca 96  
 Cys Leu Leu Thr Ala Leu Glu Ala Val Pro Ile Asp Ile Asp Lys Thr  
 20 25 30

45  
 50

aaa gta caa aat att cac cct gtg gaa agt gcg aag ata gaa cca cca 144  
 Lys Val Gln Asn Ile His Pro Val Glu Ser Ala Lys Ile Glu Pro Pro  
 35 40 45  
 5  
 gat act gga ctt tat tat gat gaa tat ctc aag caa gtg att gat gtg 192  
 Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Asp Val  
 10 50 55 60  
 ctg gaa aca gat aaa cac ttc aga gaa aag ctc cag aaa gca gac ata 240  
 Leu Glu Thr Asp Lys His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile  
 15 65 70 75 80  
 gag gaa ata aag agt ggg agg cta agc aaa gaa ctg gat tta gta agt 288  
 Glu Glu Ile Lys Ser Gly Arg Leu Ser Lys Glu Leu Asp Leu Val Ser  
 20 85 90 95  
 cac cat gtg agg aca aaa ctt gat gaa ctg aaa agg caa gaa gta gga 336  
 His His Val Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Gly  
 25 100 105 110  
 agg tta aga atg tta att aaa gct aag ttg gat tcc ctt caa gat ata 384  
 Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ser Leu Gln Asp Ile  
 30 115 120 125  
 ggc atg gac cac caa gct ctt cta aaa caa ttt gat cac cta aac cac 432  
 Gly Met Asp His Gln Ala Leu Leu Lys Gln Phe Asp His Leu Asn His  
 35 130 135 140  
 ctg aat cct gac aag ttt gaa tcc aca gat tta gat atg cta atc aaa 480  
 Leu Asn Pro Asp Lys Phe Glu Ser Thr Asp Leu Asp Met Leu Ile Lys  
 40 145 150 155 160  
 gcg gca aca agt gat ctg gaa cac tat gac aag act cgt cat gaa gaa 528  
 45  
 50

Ala Ala Thr Ser Asp Leu Glu His Tyr Asp Lys Thr Arg His Glu Glu  
 165 170 175

5 ttt aaa aaa tat gaa atg atg aag gaa cat gaa agg aga gaa tat tta 576  
 Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met Lys Glu His Glu Arg Arg Glu Tyr Leu  
 180 185 190

10 aaa aca ttg aat gaa gaa aag aga aaa gaa gaa gag tct aaa ttt gaa 624  
 Lys Thr Leu Asn Glu Glu Lys Arg Lys Glu Glu Glu Ser Lys Phe Glu  
 195 200 205

15 gaa atg aag aaa aag cat gaa aat cac cct aaa gtt aat cac cca gga 672  
 Glu Met Lys Lys Lys His Glu Asn His Pro Lys Val Asn His Pro Gly  
 210 215 220

20 agc aaa gat caa cta aaa gag gta tgg gaa gag act gat gga ttg gat 720  
 Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Thr Asp Gly Leu Asp  
 225 230 235 240

25 cct aat gac ttt gac ccc aag aca ttt ttc aaa tta cat gat gtc aat 768  
 Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr Phe Phe Lys Leu His Asp Val Asn  
 245 250 255

30 agt gat gga ttc ctg gat gaa caa gaa tta gaa gcc cta ttt act aaa 816  
 Ser Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Lys  
 260 265 270

35 gag ttg gag aaa gta tat gac cct aaa aat gaa gag gat gat atg gta 864  
 Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu Glu Asp Asp Met Val  
 275 280 285

40 gaa atg gaa gaa gaa agg ctt aga atg agg gaa cat gta atg aat gag 912

45

50

Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val Met Asn Glu  
 290 295 300

5 gtt gat act aac aaa gac aga ttg gtg act ctg gag gag ttt ttg aaa 960  
 Val Asp Thr Asn Lys Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Lys  
 305 310 315 320

10 gcc aca gaa aaa aaa gaa ttc ttg gag cca gat agc tgg gag aca tta 1008  
 Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu Glu Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu  
 325 330 335

15 gat cag caa cag ttc ttc aca gag gaa gaa cta aaa gaa tat gaa aat 1056  
 Asp Gln Gln Gln Phe Phe Thr Glu Glu Glu Leu Lys Glu Tyr Glu Asn  
 340 345 350

20 att att gct tta caa gaa aat gaa ctt aag aag aag gca gat gag ctt 1104  
 Ile Ile Ala Leu Gln Glu Asn Glu Leu Lys Lys Lys Ala Asp Glu Leu  
 355 360 365

25 cag aaa caa aaa gaa gag cta caa cgt cag cat gat caa ctg gag gct 1152  
 Gln Lys Gln Lys Glu Glu Leu Gln Arg Gln His Asp Gln Leu Glu Ala  
 370 375 380

30 cag aag ctg gaa tat cat cag gtc ata cag cag atg gaa caa aaa aaa 1200  
 Gln Lys Leu Glu Tyr His Gln Val Ile Gln Gln Met Glu Gln Lys Lys  
 385 390 395 400

35 tta caa caa gga att cct cca tca ggg cca gct gga gaa ttg aag ttt 1248  
 Leu Gln Gln Gly Ile Pro Pro Ser Gly Pro Ala Gly Glu Leu Lys Phe  
 405 410 415

40 gag cca cac att taa 1263

45

50



Glu Pro His Ile

420

5

<210> 2

<211> 420

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

15

Met Arg Trp Arg Thr Ile Leu Leu Gln Tyr Cys Phe Leu Leu Ile Thr

1 5 10 15

20

Cys Leu Leu Thr Ala Leu Glu Ala Val Pro Ile Asp Ile Asp Lys Thr

20 25 30

25

Lys Val Gln Asn Ile His Pro Val Glu Ser Ala Lys Ile Glu Pro Pro

35 40 45

30

Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Asp Val

50 55 60

35

Leu Glu Thr Asp Lys His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile

65 70 75 80

40

Glu Glu Ile Lys Ser Gly Arg Leu Ser Lys Glu Leu Asp Leu Val Ser

85 90 95

45

50

His His Val Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Gly  
 100 105 110

5

Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ser Leu Gln Asp Ile  
 115 120 125

10

Gly Met Asp His Gln Ala Leu Leu Lys Gln Phe Asp His Leu Asn His  
 130 135 140

15

Leu Asn Pro Asp Lys Phe Glu Ser Thr Asp Leu Asp Met Leu Ile Lys  
 145 150 155 160

20

Ala Ala Thr Ser Asp Leu Glu His Tyr Asp Lys Thr Arg His Glu Glu  
 165 170 175

25

Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met Lys Glu His Glu Arg Arg Glu Tyr Leu  
 180 185 190

30

Lys Thr Leu Asn Glu Glu Lys Arg Lys Glu Glu Glu Ser Lys Phe Glu  
 195 200 205

35

Glu Met Lys Lys Lys His Glu Asn His Pro Lys Val Asn His Pro Gly  
 210 215 220

40

45

50

RU 2418002 C2

Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Thr Asp Gly Leu Asp  
 225 230 235 240

5

Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr Phe Phe Lys Leu His Asp Val Asn  
 245 250 255

10

Ser Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Lys  
 260 265 270

15

Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu Glu Asp Asp Met Val  
 275 280 285

20

Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val Met Asn Glu  
 290 295 300

25

Val Asp Thr Asn Lys Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Lys  
 305 310 315 320

30

Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu Glu Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu  
 325 330 335

35

Asp Gln Gln Gln Phe Phe Thr Glu Glu Glu Leu Lys Glu Tyr Glu Asn  
 340 345 350

40

45

50

Ile Ile Ala Leu Gln Glu Asn Glu Leu Lys Lys Lys Ala Asp Glu Leu  
 355 360 365

5

Gln Lys Gln Lys Glu Glu Leu Gln Arg Gln His Asp Gln Leu Glu Ala  
 370 375 380

10

Gln Lys Leu Glu Tyr His Gln Val Ile Gln Gln Met Glu Gln Lys Lys  
 385 390 395 400

15

Leu Gln Gln Gly Ile Pro Pro Ser Gly Pro Ala Gly Glu Leu Lys Phe  
 405 410 415

20

Glu Pro His Ile  
 420

25

<210> 3  
 <211> 396  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (1)..(396)  
 <223>

35

40

<400> 3

45

50

Val Pro Ile Asp Ile Asp Lys Thr Lys Val Gln Asn Ile His Pro Val  
 1 5 10 15

5

Glu Ser Ala Lys Ile Glu Pro Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu  
 20 25 30

10

Tyr Leu Lys Gln Val Ile Asp Val Leu Glu Thr Asp Lys His Phe Arg  
 35 40 45

15

Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile Glu Glu Ile Lys Ser Gly Arg Leu  
 50 55 60

20

Ser Lys Glu Leu Asp Leu Val Ser His His Val Arg Thr Lys Leu Asp  
 65 70 75 80

25

Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Gly Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys Ala  
 85 90 95

30

Lys Leu Asp Ser Leu Gln Asp Ile Gly Met Asp His Gln Ala Leu Leu  
 100 105 110

35

Lys Gln Phe Asp His Leu Asn His Leu Asn Pro Asp Lys Phe Glu Ser  
 115 120 125

40

45

50

Thr Asp Leu Asp Met Leu Ile Lys Ala Ala Thr Ser Asp Leu Glu His  
 130 135 140

5

Tyr Asp Lys Thr Arg His Glu Glu Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met Lys  
 145 150 155 160

10

Glu His Glu Arg Arg Glu Tyr Leu Lys Thr Leu Asn Glu Glu Lys Arg  
 165 170 175

15

Lys Glu Glu Glu Ser Lys Phe Glu Glu Met Lys Lys Lys His Glu Asn  
 180 185 190

20

His Pro Lys Val Asn His Pro Gly Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val  
 195 200 205

25

Trp Glu Glu Thr Asp Gly Leu Asp Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr  
 210 215 220

30

Phe Phe Lys Leu His Asp Val Asn Ser Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln  
 225 230 235 240

35

Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asp Pro  
 245 250 255

40

45

50

RU 2 418 002 C2

Lys Asn Glu Glu Asp Asp Met Val Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg  
 260 265 270

5

Met Arg Glu His Val Met Asn Glu Val Asp Thr Asn Lys Asp Arg Leu  
 275 280 285

10

Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Lys Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu  
 290 295 300

15

Glu Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu Asp Gln Gln Gln Phe Phe Thr Glu  
 305 310 315 320

20

Glu Glu Leu Lys Glu Tyr Glu Asn Ile Ile Ala Leu Gln Glu Asn Glu  
 325 330 335

25

Leu Lys Lys Lys Ala Asp Glu Leu Gln Lys Gln Lys Glu Glu Leu Gln  
 340 345 350

30

Arg Gln His Asp Gln Leu Glu Ala Gln Lys Leu Glu Tyr His Gln Val  
 355 360 365

35

Ile Gln Gln Met Glu Gln Lys Lys Leu Gln Gln Gly Ile Pro Pro Ser  
 370 375 380

40

45

50

Gly Pro Ala Gly Glu Leu Lys Phe Glu Pro His Ile

385 390 395

5

<210> 4

<211> 1263

10

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

15

<221> CDS

<222> (1)..(1263)

<223>

20

<400> 4

atg agg tgg agg atc atc caa gta cag tac tgt ttt ctc ttg gtt ccg 48

Met Arg Trp Arg Ile Ile Gln Val Gln Tyr Cys Phe Leu Leu Val Pro

25

1 5 10 15

tgc acg ctg acc gct ctg gaa gct gtt cct atc gat gtg gac aag acc 96

Cys Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Val Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr

30

20 25 30

aaa gta cac aac act gag cca gtg gaa aat gca agg ata gag cca cca 144

Lys Val His Asn Thr Glu Pro Val Glu Asn Ala Arg Ile Glu Pro Pro

35

35 40 45

gat act gga ctt tat tat gat gaa tac ctc aag caa gtg att gaa gtc 192

Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu Val

40

50 55 60

ttg gaa aca gat cca cat ttc aga gaa aag ctc cag aaa gca gac ata 240

45

50



Leu Glu Thr Asp Pro His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile  
 65 70 75 80

5 gag gag ata agg agc ggg agg ctg agt caa gag ctg gac tta gta agt 288  
 Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu Asp Leu Val Ser  
 85 90 95

10 cac aaa gtg agg acg aga ctg gat gag ctg aag agg caa gaa gta gga 336  
 His Lys Val Arg Thr Arg Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Gly  
 100 105 110

15 aga ctg cgg atg ctc atc aaa gct aag ctg gat gcc ctt caa gac act 384  
 Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Leu Gln Asp Thr  
 115 120 125

20 ggc atg aat cac cac ctt ctt ctg aag cag ttt gaa cac ctg aac cac 432  
 Gly Met Asn His His Leu Leu Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asn His  
 130 135 140

25 cag aat cct aac aca ttt gaa tcc aga gat ttg gat atg cta atc aaa 480  
 Gln Asn Pro Asn Thr Phe Glu Ser Arg Asp Leu Asp Met Leu Ile Lys  
 145 150 155 160

30 gca gct acc gcg gat ctg gag caa tat gac cgg act cgg cat gaa gag 528  
 Ala Ala Thr Ala Asp Leu Glu Gln Tyr Asp Arg Thr Arg His Glu Glu  
 165 170 175

35 ttt aag aag tac gag atg atg aag gaa cac gag cgg aga gag tat tta 576  
 Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met Lys Glu His Glu Arg Arg Glu Tyr Leu  
 180 185 190

40 aaa acg ctg agt gag gag aag agg aaa gaa gaa gag tct aag ttt gaa 624  
 45

50

Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys Arg Lys Glu Glu Glu Ser Lys Phe Glu  
 195 200 205

5 gag atg aag agg aag cac gaa gac cac ccc aaa gtt aat cat ccc gga 672  
 Glu Met Lys Arg Lys His Glu Asp His Pro Lys Val Asn His Pro Gly  
 210 215 220

10 agc aaa gat caa cta aaa gag gtt tgg gaa gag act gat gga ttg gac 720  
 Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Thr Asp Gly Leu Asp  
 225 230 235 240

15 cct aat gac ttt gac ccc aag aca ttt ttc aaa tta cat gat gtt aac 768  
 Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr Phe Phe Lys Leu His Asp Val Asn  
 245 250 255

20 aac gat gga ttc ctg gat gaa caa gaa tta gaa gca cta ttc aca aga 816  
 Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Arg  
 25 260 265 270

30 gag ttg gag aaa gtg tat aac cca caa aat gca gag gac gat atg ata 864  
 Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asn Pro Gln Asn Ala Glu Asp Asp Met Ile  
 275 280 285

35 gaa atg gaa gag gag agg ctc agg atg aga gaa cac gtc atg agt gag 912  
 Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val Met Ser Glu  
 290 295 300

40 att gat aac aac aaa gac cga ttg gtg act ctg gag gaa ttc ctg aga 960  
 Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Arg  
 305 310 315 320

45 gct aca gag aag aaa gaa ttc ctg gag cct gat agc tgg gag aca ctg 1008

50

Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu Glu Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu  
 325 330 335

5  
 gac cag caa cag tta ttc acc gag gac gag ctt aaa gag tat gaa agc 1056  
 Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr Glu Asp Glu Leu Lys Glu Tyr Glu Ser  
 340 345 350

10  
 att att gct atc caa gag aac gag ctt aag aag agg gcg gaa gag ctg 1104  
 Ile Ile Ala Ile Gln Glu Asn Glu Leu Lys Lys Arg Ala Glu Glu Leu  
 355 360 365

15  
 cag aaa cag aag gag gat ctg cag cgg cag cac gac cac ctc gag gcg 1152  
 Gln Lys Gln Lys Glu Asp Leu Gln Arg Gln His Asp His Leu Glu Ala  
 370 375 380

20  
 cag aag cag gag tat cat cag gcc gtc cag cac ctg gaa cag aag aaa 1200  
 Gln Lys Gln Glu Tyr His Gln Ala Val Gln His Leu Glu Gln Lys Lys  
 25 385 390 395 400

30  
 ctt caa caa ggc att gct cca tca ggg cca gcg gga gag ctg aag ttt 1248  
 Leu Gln Gln Gly Ile Ala Pro Ser Gly Pro Ala Gly Glu Leu Lys Phe  
 405 410 415

35  
 gag cca cac aca taa 1263  
 Glu Pro His Thr  
 420

40  
 <210> 5  
 <211> 420  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

45

50

<400> 5

5 Met Arg Trp Arg Ile Ile Gln Val Gln Tyr Cys Phe Leu Leu Val Pro  
1 5 10 15

10 Cys Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Val Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr  
20 25 30

15 Lys Val His Asn Thr Glu Pro Val Glu Asn Ala Arg Ile Glu Pro Pro  
35 40 45

20 Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu Val  
50 55 60

25 Leu Glu Thr Asp Pro His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile  
65 70 75 80

30 Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu Asp Leu Val Ser  
85 90 95

35 His Lys Val Arg Thr Arg Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Gly  
100 105 110

40 Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Leu Gln Asp Thr  
45 115 120 125

50

RU 2418002 C2

Gly Met Asn His His Leu Leu Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asn His  
 130 135 140

5

Gln Asn Pro Asn Thr Phe Glu Ser Arg Asp Leu Asp Met Leu Ile Lys  
 145 150 155 160

10

Ala Ala Thr Ala Asp Leu Glu Gln Tyr Asp Arg Thr Arg His Glu Glu  
 165 170 175

15

Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met Lys Glu His Glu Arg Arg Glu Tyr Leu  
 180 185 190

20

Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys Arg Lys Glu Glu Glu Ser Lys Phe Glu  
 195 200 205

25

Glu Met Lys Arg Lys His Glu Asp His Pro Lys Val Asn His Pro Gly  
 210 215 220

30

Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Thr Asp Gly Leu Asp  
 225 230 235 240

35

Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr Phe Phe Lys Leu His Asp Val Asn  
 245 250 255

40

45

50

RU 2418002 C2

Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Arg  
 260 265 270

5

Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asn Pro Gln Asn Ala Glu Asp Asp Met Ile  
 275 280 285

10

Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val Met Ser Glu  
 290 295 300

15

Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Arg  
 305 310 315 320

20

Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu Glu Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu  
 325 330 335

25

Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr Glu Asp Glu Leu Lys Glu Tyr Glu Ser  
 340 345 350

30

Ile Ile Ala Ile Gln Glu Asn Glu Leu Lys Lys Arg Ala Glu Glu Leu  
 355 360 365

35

Gln Lys Gln Lys Glu Asp Leu Gln Arg Gln His Asp His Leu Glu Ala  
 370 375 380

40

45

50

Gln Lys Gln Glu Tyr His Gln Ala Val Gln His Leu Glu Gln Lys Lys  
 385 390 395 400

5

Leu Gln Gln Gly Ile Ala Pro Ser Gly Pro Ala Gly Glu Leu Lys Phe  
 405 410 415

10

Glu Pro His Thr  
 420

15

<210> 6  
 <211> 395  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

20

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (1)..(395)  
 <223>

25

30

<400> 6

35

Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr Lys Val His Asn Thr Glu Pro Val Glu  
 1 5 10 15

40

Asn Ala Arg Ile Glu Pro Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr  
 20 25 30

45

50

Leu Lys Gln Val Ile Glu Val Leu Glu Thr Asp Pro His Phe Arg Glu  
 35 40 45

5

Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg Leu Ser  
 50 55 60

10

Gln Glu Leu Asp Leu Val Ser His Lys Val Arg Thr Arg Leu Asp Glu  
 65 70 75 80

15

Leu Lys Arg Gln Glu Val Gly Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys Ala Lys  
 85 90 95

20

Leu Asp Ala Leu Gln Asp Thr Gly Met Asn His His Leu Leu Leu Lys  
 100 105 110

25

Gln Phe Glu His Leu Asn His Gln Asn Pro Asn Thr Phe Glu Ser Arg  
 115 120 125

30

Asp Leu Asp Met Leu Ile Lys Ala Ala Thr Ala Asp Leu Glu Gln Tyr  
 130 135 140

35

Asp Arg Thr Arg His Glu Glu Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met Lys Glu  
 145 150 155 160

40

45

50



His Glu Arg Arg Glu Tyr Leu Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys Arg Lys  
 165 170 175  
 5  
 Glu Glu Glu Ser Lys Phe Glu Glu Met Lys Arg Lys His Glu Asp His  
 180 185 190  
 10  
 Pro Lys Val Asn His Pro Gly Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val Trp  
 195 200 205  
 15  
 Glu Glu Thr Asp Gly Leu Asp Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr Phe  
 210 215 220  
 20  
 Phe Lys Leu His Asp Val Asn Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln Glu  
 225 230 235 240  
 25  
 Leu Glu Ala Leu Phe Thr Arg Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asn Pro Gln  
 245 250 255  
 30  
 Asn Ala Glu Asp Asp Met Ile Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met  
 260 265 270  
 35  
 Arg Glu His Val Met Ser Glu Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg Leu Val  
 275 280 285  
 40  
 45  
 50

RU 2 418 002 C2

Thr Leu Glu Glu Phe Leu Arg Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu Glu  
 290 295 300

5

Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr Glu Asp  
 305 310 315 320

10

Glu Leu Lys Glu Tyr Glu Ser Ile Ile Ala Ile Gln Glu Asn Glu Leu  
 325 330 335

15

Lys Lys Arg Ala Glu Glu Leu Gln Lys Gln Lys Glu Asp Leu Gln Arg  
 340 345 350

20

Gln His Asp His Leu Glu Ala Gln Lys Gln Glu Tyr His Gln Ala Val  
 355 360 365

25

Gln His Leu Glu Gln Lys Lys Leu Gln Gln Gly Ile Ala Pro Ser Gly  
 370 375 380

30

Pro Ala Gly Glu Leu Lys Phe Glu Pro His Thr  
 385 390 395

35

40

<210> 7  
 <211> 1263  
 <212> DNA  
 <213> Rattus norvegicus

45

50

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1263)  
 5 <223>

<400> 7

10 atg agg tgg agg acc atc caa gca cgg tac tgt ttt ctc ttg gtt ccg 48  
 Met Arg Trp Arg Thr Ile Gln Ala Arg Tyr Cys Phe Leu Leu Val Pro  
 1 5 10 15

15 tgc gtg ctc act gcg ctg gaa gct gtt cct att gat gtg gac aag acc 96  
 Cys Val Leu Thr Ala Leu Glu Ala Val Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr  
 20 25 30

20 aaa gtg cac aac gtc gag ccg gtg gaa agt gca agg ata gaa ccg cca 144  
 Lys Val His Asn Val Glu Pro Val Glu Ser Ala Arg Ile Glu Pro Pro  
 35 40 45

25 gac acg gga ctt tat tat gat gaa tac ctc aag caa gtg att gaa gtc 192  
 Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu Val  
 50 55 60

30 ttg gaa aca gat ccg cat ttc aga gaa aag ctc cag aaa gca gac ata 240  
 Leu Glu Thr Asp Pro His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile  
 35 65 70 75 80

gag gag ata agg agc ggg agg ctg agt caa gag ctg gac tta gta agt 288  
 Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu Asp Leu Val Ser  
 40 85 90 95

cac aaa gtg agg acg aga ctg gat gaa ctg aag agg caa gaa gta gga 336  
 His Lys Val Arg Thr Arg Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Gly  
 45 100 105 110

50

aga ctg aga atg ctc atc aaa gcc aag ctg gat gcc ctt caa gac act 384  
 Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Leu Gln Asp Thr  
 115 120 125

5

ggc atg aat cac cac ctt ctt ctt aag cag ttt gaa cac ctg aac cac 432  
 Gly Met Asn His His Leu Leu Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asn His  
 130 135 140

10

cag aat cct gac aca ttt gaa tcc aaa gac ttg gat atg cta atc aag 480  
 Gln Asn Pro Asp Thr Phe Glu Ser Lys Asp Leu Asp Met Leu Ile Lys  
 145 150 155 160

15

gcg gcc acc gcg gat ctg gag cag tat gac cgg act cgg cat gag gag 528  
 Ala Ala Thr Ala Asp Leu Glu Gln Tyr Asp Arg Thr Arg His Glu Glu  
 165 170 175

20

ttt aag aag tat gag atg atg aag gaa cat gaa cgc aga gaa tat tta 576  
 Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met Lys Glu His Glu Arg Arg Glu Tyr Leu  
 180 185 190

25

aaa acg ctg agt gag gag aag agg aaa gag gaa gaa gcc aag ttt gca 624  
 Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys Arg Lys Glu Glu Glu Ala Lys Phe Ala  
 195 200 205

30

gag atg aag agg aag cat gaa gac cac ccc aaa gtt aat cac ccc gga 672  
 Glu Met Lys Arg Lys His Glu Asp His Pro Lys Val Asn His Pro Gly  
 210 215 220

35

agc aaa gat caa cta aaa gag gtt tgg gaa gag act gat gga ttg gac 720  
 Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Thr Asp Gly Leu Asp  
 225 230 235 240

40

45

50

cct aat gac ttt gac ccc aag aca ttt ttc aaa tta cat gat gtt aac 768  
 Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr Phe Phe Lys Leu His Asp Val Asn  
 245 250 255  
 5  
 aac gat gga ttc ctg gat gaa caa gaa ttg gaa gca ctg ttc aca aaa 816  
 Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Lys  
 260 265 270  
 10  
 gag ttg gac aaa gtg tat aac ccg cag aat gca gag gat gat atg ata 864  
 Glu Leu Asp Lys Val Tyr Asn Pro Gln Asn Ala Glu Asp Asp Met Ile  
 275 280 285  
 15  
 gaa atg gaa gag gag agg ctc agg atg aga gag cac gtc atg aat gag 912  
 Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val Met Asn Glu  
 290 295 300  
 20  
 att gat aac aac aaa gac cga ttg gtg act ctg gag gaa ttc ttg aga 960  
 Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Arg  
 305 310 315 320  
 25  
 gcc aca gag aag aaa gaa ttc ttg gag ccc gat agc tgg gag aca ctg 1008  
 Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu Glu Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu  
 325 330 335  
 30  
 gac cag cag cag tta ttc acc gag gaa gag ctc aaa gag tat gaa agt 1056  
 Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr Glu Glu Glu Leu Lys Glu Tyr Glu Ser  
 340 345 350  
 35  
 atc att gct atc caa gag agt gaa ctt aag aag aag gca gat gaa ctg 1104  
 Ile Ile Ala Ile Gln Glu Ser Glu Leu Lys Lys Lys Ala Asp Glu Leu  
 355 360 365  
 40  
 cag aag cag aag gag gag ctg cag cgc cag cac gac cac ctt gag gcc 1152  
 45  
 50

Gln Lys Gln Lys Glu Glu Leu Gln Arg Gln His Asp His Leu Glu Ala  
 370 375 380

5 cag aag cag gag tat cag cag gct gta cag cag ctg gaa cag aag aaa 1200  
 Gln Lys Gln Glu Tyr Gln Gln Ala Val Gln Gln Leu Glu Gln Lys Lys  
 385 390 395 400

10 ttc caa caa ggg att gct cca tca ggg ccg gca gga gag ctg aag ttt 1248  
 Phe Gln Gln Gly Ile Ala Pro Ser Gly Pro Ala Gly Glu Leu Lys Phe  
 405 410 415

15 gag cca cac aca taa 1263  
 Glu Pro His Thr  
 420

20

<210> 8  
 25 <211> 420  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

30 <400> 8

Met Arg Trp Arg Thr Ile Gln Ala Arg Tyr Cys Phe Leu Leu Val Pro  
 35 1 5 10 15

Cys Val Leu Thr Ala Leu Glu Ala Val Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr  
 40 20 25 30

Lys Val His Asn Val Glu Pro Val Glu Ser Ala Arg Ile Glu Pro Pro  
 45 35 40 45

50

Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu Val  
 50 55 60

5

Leu Glu Thr Asp Pro His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile  
 65 70 75 80

10

Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu Asp Leu Val Ser  
 85 90 95

15

His Lys Val Arg Thr Arg Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Gly  
 100 105 110

20

Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Leu Gln Asp Thr  
 115 120 125

25

Gly Met Asn His His Leu Leu Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asn His  
 130 135 140

30

Gln Asn Pro Asp Thr Phe Glu Ser Lys Asp Leu Asp Met Leu Ile Lys  
 145 150 155 160

35

Ala Ala Thr Ala Asp Leu Glu Gln Tyr Asp Arg Thr Arg His Glu Glu  
 165 170 175

40

45

50

RU 2418 002 C2

Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met Lys Glu His Glu Arg Arg Glu Tyr Leu  
 180 185 190

5

Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys Arg Lys Glu Glu Glu Ala Lys Phe Ala  
 195 200 205

10

Glu Met Lys Arg Lys His Glu Asp His Pro Lys Val Asn His Pro Gly  
 210 215 220

15

Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Thr Asp Gly Leu Asp  
 225 230 235 240

20

Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr Phe Phe Lys Leu His Asp Val Asn  
 245 250 255

25

Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Lys  
 260 265 270

30

Glu Leu Asp Lys Val Tyr Asn Pro Gln Asn Ala Glu Asp Asp Met Ile  
 275 280 285

35

Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val Met Asn Glu  
 290 295 300

40

45

50



Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Arg  
 305 310 315 320

5

Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu Glu Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu  
 325 330 335

10

Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr Glu Glu Glu Leu Lys Glu Tyr Glu Ser  
 340 345 350

15

Ile Ile Ala Ile Gln Glu Ser Glu Leu Lys Lys Lys Ala Asp Glu Leu  
 355 360 365

20

Gln Lys Gln Lys Glu Glu Leu Gln Arg Gln His Asp His Leu Glu Ala  
 370 375 380

25

Gln Lys Gln Glu Tyr Gln Gln Ala Val Gln Gln Leu Glu Gln Lys Lys  
 385 390 395 400

30

Phe Gln Gln Gly Ile Ala Pro Ser Gly Pro Ala Gly Glu Leu Lys Phe  
 405 410 415

35

Glu Pro His Thr  
 420

40

45

<210> 9

50

<211> 396  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

5

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (1)..(396)  
 <223>

10

<400> 9

15

Val Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr Lys Val His Asn Val Glu Pro Val  
 1                    5                    10                    15

20

Glu Ser Ala Arg Ile Glu Pro Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu  
                   20                    25                    30

25

Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu Val Leu Glu Thr Asp Pro His Phe Arg  
                   35                    40                    45

30

Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg Leu  
                   50                    55                    60

35

Ser Gln Glu Leu Asp Leu Val Ser His Lys Val Arg Thr Arg Leu Asp  
 65                    70                    75                    80

40

Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Gly Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys Ala  
                   85                    90                    95

45

50

Lys Leu Asp Ala Leu Gln Asp Thr Gly Met Asn His His Leu Leu Leu  
 100 105 110

5

Lys Gln Phe Glu His Leu Asn His Gln Asn Pro Asp Thr Phe Glu Ser  
 115 120 125

10

Lys Asp Leu Asp Met Leu Ile Lys Ala Ala Thr Ala Asp Leu Glu Gln  
 130 135 140

15

Tyr Asp Arg Thr Arg His Glu Glu Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met Lys  
 145 150 155 160

20

Glu His Glu Arg Arg Glu Tyr Leu Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys Arg  
 165 170 175

25

Lys Glu Glu Glu Ala Lys Phe Ala Glu Met Lys Arg Lys His Glu Asp  
 180 185 190

30

His Pro Lys Val Asn His Pro Gly Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val  
 195 200 205

35

Trp Glu Glu Thr Asp Gly Leu Asp Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr  
 210 215 220

40

45

50

RU 2 418 002 C2

Phe Phe Lys Leu His Asp Val Asn Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln  
 225 230 235 240

5

Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu Asp Lys Val Tyr Asn Pro  
 245 250 255

10

Gln Asn Ala Glu Asp Asp Met Ile Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg  
 260 265 270

15

Met Arg Glu His Val Met Asn Glu Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg Leu  
 275 280 285

20

Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Arg Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu  
 290 295 300

25

Glu Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr Glu  
 305 310 315 320

30

Glu Glu Leu Lys Glu Tyr Glu Ser Ile Ile Ala Ile Gln Glu Ser Glu  
 325 330 335

35

Leu Lys Lys Lys Ala Asp Glu Leu Gln Lys Gln Lys Glu Glu Leu Gln  
 340 345 350

40

45

50

Arg Gln His Asp His Leu Glu Ala Gln Lys Gln Glu Tyr Gln Gln Ala  
 355 360 365

5

Val Gln Gln Leu Glu Gln Lys Lys Phe Gln Gln Gly Ile Ala Pro Ser  
 370 375 380

10

Gly Pro Ala Gly Glu Leu Lys Phe Glu Pro His Thr  
 385 390 395

15

<210> 10  
 <211> 1188  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

20

25

<220>  
 <221> gene  
 <222> (1)..(1188)  
 <223>

30

<400> 10  
 cctattgaca tagacaagac aaaagtacaa aatattcacc ctgtggaaag tgcgaagata 60

35

gaaccaccag atactggact ttattatgat gaatatctca agcaagtgat tgatgtgctg 120

40

gaaacagata aacacttcag agaaaagctc cagaaagcag acatagagga aataaagagt 180

45

gggagggctaa gcaaagaact ggatttagta agtcaccatg tgaggacaaa acttgatgaa 240

ctgaaaaggc aagaagtagg aaggttaaga atgtaatta aagctaagtt ggattccctt 300

50

caagatatag gcatggacca ccaagctctt ctaaaacaat ttgatcacct aaaccacctg 360

5 aatcctgaca agtttgaatc cacagattta gatatgctaa tcaaagcggc aacaagtgat 420

ctggaacact atgacaagac tcgtcatgaa gaatttaaaa aatatgaaat gatgaaggaa 480

10 catgaaagga gagaatattt aaaaacattg aatgaagaaa agagaaaaga agaagagtct 540

aaatttgaag aatgaagaa aaagcatgaa aatcaccta aagttaatca cccaggaagc 600

15 aaagatcaac taaaagaggt atgggaagag actgatggat tggatcctaa tgactttgac 660

ccaagacat ttttcaaatt acatgatgtc aatagtgatg gattcctgga tgaacaagaa 720

20 ttagaagccc tatttactaa agagttggag aaagtatatg accctaaaaa tgaagaggat 780

gatatggtag aatggaaga agaaaggctt agaatgaggg aacatgtaat gaatgaggtt 840

25 gatactaaca aagacagatt ggtgactctg gaggagtttt tgaaagccac agaaaaaaaa 900

gaattcttgg agccagatag ctgggagaca ttagatcagc aacagttctt cacagaggaa 960

30 gaactaaaag aatatgaaaa tattattgct ttacaagaaa atgaacttaa gaagaaggca 1020

gatgagcttc agaaacaaaa agaagagcta caacgtcagc atgatcaact ggaggctcag 1080

35 aagctggaat atcatcaggt catacagcag atggaacaaa aaaaattaca acaaggaatt 1140

40 cctccatcag ggccagctgg agaattgaag tttgagccac acatttaa 1188

<210> 11

45 <211> 1191

50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; gene

&lt;222&gt; (1)..(1191)

10

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 11

15

gttcctatcg atgtggacaa gaccaaagta cacaacactg agccagtgga aaatgcaagg 60

atagagccac cagatactgg actttattat gatgaatacc tcaagcaagt gattgaagtc 120

20

ttggaacag atccacattt cagagaaaag ctccagaaag cagacataga ggagataagg 180

agcgggaggc tgagtcaaga gctggactta gtaagtcaca aagtgaggac gagactggat 240

25

gagctgaaga ggcaagaagt aggaagactg cggatgctca tcaaagctaa gctggatgcc 300

cttcaagaca ctggcatgaa tcaccacctt cttctgaagc agtttgaaca cctgaaccac 360

30

cagaatccta acacatttga atccagagat ttggatatgc taatcaaagc agctaccgcg 420

gatctggagc aatatgaccg gactoggcac gaagagttta agaagtacga gatgatgaag 480

35

gaacacgagc ggagagagta tttaaaaacg ctgagtgagg agaagaggaa agaagaagag 540

tctaagtttg aagagatgaa gaggaagcac gaagaccacc ccaaagttaa tcatcccgga 600

40

agcaaagatc aactaaaaga ggtttgggaa gagactgatg gattggaccc taatgacttt 660

45

gacccaaga catttttcaa attacatgat gttaacaacg atggattcct ggatgaacaa 720

50

gaattagaag cactattcac aagagagttg gagaaagtgt ataaccaca aaatgcagag 780  
 5 gacgatatga tagaaatgga agaggagagg cttaggatga gagaacacgt catgagtgag 840  
 attgataaca acaaagaccg attggtgact ctggaggaat tcctgagagc tacagagaag 900  
 10 aaagaattcc tggagcctga tagctgggag aactggacc agcaacagtt attcaccgag 960  
 gacgagctta aagagtatga aagcattatt gctatccaag agaacgagct taagaagagg 1020  
 15 gcggaagagc tgcagaaaca gaaggaggat ctgcagcggc agcacgacca cctcgaggcg 1080  
 cagaagcagg agtatcatca ggccgtccag cacctggaac agaagaaact tcaacaaggc 1140  
 20 attgctccat cagggccagc gggagagctg aagtttgagc cacacacata a 1191  
 25 <210> 12  
 <211> 1191  
 <212> DNA  
 <213> Rattus norvegicus  
 30  
 <220>  
 <221> gene  
 35 <222> (1)..(1191)  
 <223>  
 <400> 12  
 40 gttcctattg atgtggacaa gaccaaagtg cacaacgtcg agccggtgga aagtgcaagg 60  
 atagaaccgc cagacacggg actttattat gatgaatacc tcaagcaagt gattgaagtc 120  
 45 ttgaaacag atccgcattt cagagaaaag ctccagaaag ca'gacataga ggagataagg 180  
 50



agcgggaggc tgagtcaaga gctggactta gtaagtcaca aagtgaggac gagactggat 240

5 gaactgaaga ggcaagaagt aggaagactg agaatgctca tcaaagccaa gctggatgcc 300

cttcaagaca ctggcatgaa tcaccacctt cttcttaagc agtttgaaca cctgaaccac 360

10 cagaatcctg acacatttga atccaaagac ttggatatgc taatcaaggc ggccaccgcg 420

gatctggagc agtatgaccg gactcggcat gaggagtta agaagtatga gatgatgaag 480

15 gaacatgaac gcagagaata tttaaaaacg ctgagtgagg agaagaggaa agaggaagaa 540

gccaaagttg cagagatgaa gaggaagcat gaagaccacc ccaaagttaa tcaccccgga 600

20 agcaaagatc aactaaaaga ggtttgggaa gagactgatg gattggacc taatgacttt 660

gacccaaga catttttcaa attacatgat gttaacaacg atggattcct ggatgaacaa 720

25 gaattggaag cactgttcac aaaagagttg gacaaagtgt ataaccgca gaatgcagag 780

gatgatatga tagaaatgga agaggagagg ctcaggatga gagagcacgt catgaatgag 840

30 attgataaca acaaagaccg attggtgact ctggaggaat tcttgagagc cacagagaag 900

aaagaattct tggagcccga tagctgggag aactggacc agcagcagtt attcaccgag 960

35 gaagagctca aagagtatga aagtatcatt gctatccaag agagtgaact taagaagaag 1020

40 gcagatgaac tgcagaagca gaaggaggag ctgcagcgcc agcacgacca ccttgaggcc 1080

cagaagcagg agtatcagca ggctgtacag cagctggaac agaagaaatt ccaacaaggg 1140

45

50

attgctccat cagggccggc aggagagctg aagtttgagc cacacacata a

1191

5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 82

&lt;212&gt; PRT

10

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; PEPTIDE

15

&lt;222&gt; (1)..(82)

&lt;223&gt;

20

&lt;400&gt; 13

Val Pro Ile Asp Ile Asp Lys Thr Lys Val Gln Asn Ile His Pro Val

1

5

10

15

25

Glu Ser Ala Lys Ile Glu Pro Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu

20

25

30

30

Tyr Leu Lys Gln Val Ile Asp Val Leu Glu Thr Asp Lys His Phe Arg

35

35

40

45

Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile Glu Glu Ile Lys Ser Gly Arg Leu

40

50

55

60

Ser Lys Glu Leu Asp Leu Val Ser His His Val Arg Thr Lys Leu Asp

45

65

70

75

80

50

Glu Leu

5

<210> 14

<211> 82

10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

15

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(82)

<223>

20

<400> 14

Val Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr Lys Val His Asn Thr Glu Pro Val

25

1                    5                    10                    15

Glu Asn Ala Arg Ile Glu Pro Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu

30

                  20                    25                    30

Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu Val Leu Glu Thr Asp Pro His Phe Arg

35

                  35                    40                    45

Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg Leu

40

                  50                    55                    60

45

50

Ser Gln Glu Leu Asp Leu Val Ser His Lys Val Arg Thr Arg Leu Asp  
 65 70 75 80

5

Glu Leu

10

<210> 15

<211> 82

<212> PRT

15

<213> Rattus norvegicus

<220>

20

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(82)

<223>

25

<400> 15

Val Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr Lys Val His Asn Val Glu Pro Val  
 1 5 10 15

30

Glu Ser Ala Arg Ile Glu Pro Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu  
 20 25 30

35

Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu Val Leu Glu Thr Asp Pro His Phe Arg  
 35 40 45

40

45

50

Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg Leu  
 50 55 60

5

Ser Gln Glu Leu Asp Leu Val Ser His Lys Val Arg Thr Arg Leu Asp  
 65 70 75 80

10

Glu Leu

15

<210> 16

<211> 79

<212> PRT

20

<213> Rattus norvegicus

<220>

25

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(79)

<223>

30

<400> 16

Gln Glu Val Gly Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala  
 1 5 10 15

35

Leu Gln Asp Thr Gly Met Asn His His Leu Leu Leu Lys Gln Phe Glu  
 20 25 30

40

His Leu Asn His Gln Asn Pro Asp Thr Phe Glu Ser Lys Asp Leu Asp  
 35 40 45

45

50

Met Leu Ile Lys Ala Ala Thr Ala Asp Leu Glu Gln Tyr Asp Arg Thr  
 50 55 60

5

Arg His Glu Glu Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met Lys Glu His Glu  
 65 70 75

10

<210> 17  
 <211> 231  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

15

20

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(231)  
 <223>

25

<400> 17

30

Glu Tyr Leu Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys Arg Lys Glu Glu Glu Ala  
 1 5 10 15

35

Lys Phe Ala Glu Met Lys Arg Lys His Glu Asp His Pro Lys Val Asn  
 20 25 30

40

His Pro Gly Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Thr Asp  
 35 40 45

45

50

Gly Leu Asp Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr Phe Phe Lys Leu His  
 50 55 60

5

Asp Val Asn Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu  
 65 70 75 80

10

Phe Thr Lys Glu Leu Asp Lys Val Tyr Asn Pro Gln Asn Ala Glu Asp  
 85 90 95

15

Asp Met Ile Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val  
 100 105 110

20

Met Asn Glu Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu  
 115 120 125

25

Phe Leu Arg Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu Glu Pro Asp Ser Trp  
 130 135 140

30

Glu Thr Leu Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr Glu Glu Glu Leu Lys Glu  
 145 150 155 160

35

Tyr Glu Ser Ile Ile Ala Ile Gln Glu Ser Glu Leu Lys Lys Lys Ala  
 165 170 175

40

45

50

Asp Glu Leu Gln Lys Gln Lys Glu Glu Leu Gln Arg Gln His Asp His  
 180 185 190

5

Leu Glu Ala Gln Lys Gln Glu Tyr Gln Gln Ala Val Gln Gln Leu Glu  
 195 200 205

10

Gln Lys Lys Phe Gln Gln Gly Ile Ala Pro Ser Gly Pro Ala Gly Glu  
 210 215 220

15

Leu Lys Phe Glu Pro His Thr  
 225 230

20

<210> 18  
 <211> 246  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

25

<220>  
 <221> gene  
 <222> (1)..(246)  
 <223>

30

35

<400> 18  
 gtgcctattg acatagacaa gacaaaagta caaatattc accctgtgga aagtgcgaag 60  
 atagaaccac cagatactgg actttattat gatgaatattc tcaagcaagt gattgatgtg 120  
 ctggaaacag ataaacactt cagagaaaag ctccagaaag cagacataga ggaaataaag 180

40

45

50



agtgggaggc taagcaaaga actggattta gtaagtcacc atgtgaggac aaaacttgat 240  
 5 gaactg 246  
 <210> 19  
 10 <211> 246  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 15 <220>  
 <221> gene  
 <222> (1)..(246)  
 20 <223>  
 <400> 19  
 25 gttcctatcg atgtggacaa gaccaaagta cacaacactg agccagtgga aaatgcaagg 60  
 atagagccac cagatactgg actttattat gatgaatacc tcaagcaagt gattgaagtc 120  
 30 ttggaaacag atccacattt cagagaaaag ctccagaaag cagacataga ggagataagg 180  
 agcgggaggc tgagtcaaga gctggactta gtaagtcaca aagtgaggac gagactggat 240  
 35 gagctg 246  
 <210> 20  
 40 <211> 246  
 <212> DNA  
 <213> Rattus norvegicus  
 45 <220>  
 50

<221> gene

<222> (1)..(246)

<223>

5

<400> 20

gttcctattg atgtggacaa gaccaaagtg cacaacgtcg agccggtgga aagtgcaagg 60

10

atagaaccgc cagacacggg actttattat gatgaatacc tcaagcaagt gattgaagtc 120

15

ttggaacag atccgcattt cagagaaaag ctccagaaag cagacataga ggagataagg 180

agcgggaggc tgagtcaaga gctggactta gtaagtcaca aagtgaggac gagactggat 240

20

gaactg 246

<210> 21

25

<211> 566

<212> DNA

<213> Mus musculus

30

<220>

<221> gene

<222> (1)..(566)

35

<223>

<400> 21

ccagtggaaa atgcaaggat agagccacca gatactggac tttattatga tgaatacctc 60

40

aagcaagtga ttgaagtctt gaaacagat ccacatttca gagaaaagct ccagaaagca 120

45

gacatagagg agataaggag cgggaggctg agtcaagagc tggacttagt aagtcacaaa 180

50

gtgaggacga gactggatga gctgaagagg caagaagtag gaagactgcg gatgctcatc 240

5 aaagctaagc tggatgccct toaagacact ggcataaacc accaccttct tctgaagcag 300

tttgaacacc tgaaccacca gaatocaaac acatttgaat ccagagattt ggatatgcta 360

10 atcaaagcag ctaccgcgga tctggagcaa tatgaccgga ctcggcatga agagttaag 420

aagtacgaga tgatgaagga acacgagcgg agagagtatt taaaaacgct gaggaggag 480

15 aagaggaaag aagaagagtc taagttttaa gagatgaaga ggaagcacga agaccacccc 540

aaagttaatc atcccgaag caaaga 566

20

<210> 22

<211> 20

25 <212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

30 <221> gene

<222> (1)..(20)

<223>

35 <400> 22

ccagtggaaa atgcaaggat 20

40

<210> 23

<211> 21

45 <212> DNA

<213> Mus musculus

50

<220>

<221> gene

<222> (1)..(21)

5

<223>

<400> 23

10

tctttgcttc cgggatgatt a

21

<210> 24

15

<211> 13

<212> PRT

<213> Synthetic

20

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(13)

25

<223>

<400> 24

30

His Leu Asn His Gln Asn Pro Asp Thr Phe Glu Ser Cys

1

5

10

35

<210> 25

<211> 621

<212> PRT

40

<213> Synthetic

<220>

<221> PROPEP

45

50

<222> (1)..(621)

<223>

5

<400> 25

10

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro  
1 5 10 15

15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu  
20 25 30

20

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu  
35 40 45

25

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys  
50 55 60

30

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn  
65 70 75 80

35

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu  
85 90 95

40

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser  
100 105 110

45

50

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu  
 115 120 125  
 5  
 Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn  
 130 135 140  
 10  
 Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp  
 145 150 155 160  
 15  
 Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu  
 165 170 175  
 20  
 Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr  
 180 185 190  
 25  
 Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala  
 195 200 205  
 30  
 Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg  
 210 215 220  
 35  
 Gly Ser Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr Lys Val His Asn Thr Glu Pro  
 225 230 235 240  
 40  
 45  
 50

Val Glu Asn Ala Arg Ile Glu Pro Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp  
 245 250 255

5

Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu Val Leu Glu Thr Asp Pro His Phe  
 260 265 270

10

Arg Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg  
 275 280 285

15

Leu Ser Gln Glu Leu Asp Leu Val Ser His Lys Val Arg Thr Arg Leu  
 290 295 300

20

Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Gly Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys  
 305 310 315 320

25

Ala Lys Leu Asp Ala Leu Gln Asp Thr Gly Met Asn His His Leu Leu  
 325 330 335

30

Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asn His Gln Asn Pro Asn Thr Phe Glu  
 340 345 350

35

Ser Arg Asp Leu Asp Met Leu Ile Lys Ala Ala Thr Ala Asp Leu Glu  
 355 360 365

40

45

50

RU 2418002 C2

Gln Tyr Asp Arg Thr Arg His Glu Glu Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met  
 370 375 380

5

Lys Glu His Glu Arg Arg Glu Tyr Leu Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys  
 385 390 395 400

10

Arg Lys Glu Glu Glu Ser Lys Phe Glu Glu Met Lys Arg Lys His Glu  
 405 410 415

15

Asp His Pro Lys Val Asn His Pro Gly Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu  
 420 425 430

20

Val Trp Glu Glu Thr Asp Gly Leu Asp Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys  
 435 440 445

25

Thr Phe Phe Lys Leu His Asp Val Asn Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu  
 450 455 460

30

Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Arg Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asn  
 465 470 475 480

35

Pro Gln Asn Ala Glu Asp Asp Met Ile Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu  
 485 490 495

40

45

50



RU 2 418 002 C2

Arg Met Arg Glu His Val Met Ser Glu Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg  
 500 505 510

5

Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Arg Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe  
 515 520 525

10

Leu Glu Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr  
 530 535 540

15

Glu Asp Glu Leu Lys Glu Tyr Glu Ser Ile Ile Ala Ile Gln Glu Asn  
 545 550 555 560

20

Glu Leu Lys Lys Arg Ala Glu Glu Leu Gln Lys Gln Lys Glu Asp Leu  
 565 570 575

25

Gln Arg Gln His Asp His Leu Glu Ala Gln Lys Gln Glu Tyr His Gln  
 580 585 590

30

Ala Val Gln His Leu Glu Gln Lys Lys Leu Gln Gln Gly Ile Ala Pro  
 595 600 605

35

Ser Gly Pro Ala Gly Glu Leu Lys Phe Glu Pro His Thr  
 610 615 620

40

45 <210> 26

50

<211> 397  
 <212> PRT  
 <213> Synthetic

5

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(397)  
 <223>

10

<400> 26

15

Gly Ser Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr Lys Val His Asn Thr Glu Pro  
 1                    5                    10                    15

20

Val Glu Asn Ala Arg Ile Glu Pro Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp  
                   20                    25                    30

25

Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu Val Leu Glu Thr Asp Pro His Phe  
                   35                    40                    45

30

Arg Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg  
                   50                    55                    60

35

Leu Ser Gln Glu Leu Asp Leu Val Ser His Lys Val Arg Thr Arg Leu  
 65                    70                    75                    80

40

Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Gly Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys  
                   85                    90                    95

45

50

Ala Lys Leu Asp Ala Leu Gln Asp Thr Gly Met Asn His His Leu Leu  
 100 105 110

5

Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asn His Gln Asn Pro Asn Thr Phe Glu  
 115 120 125

10

Ser Arg Asp Leu Asp Met Leu Ile Lys Ala Ala Thr Ala Asp Leu Glu  
 130 135 140

15

Gln Tyr Asp Arg Thr Arg His Glu Glu Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met  
 145 150 155 160

20

Lys Glu His Glu Arg Arg Glu Tyr Leu Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys  
 165 170 175

25

Arg Lys Glu Glu Glu Ser Lys Phe Glu Glu Met Lys Arg Lys His Glu  
 180 185 190

30

Asp His Pro Lys Val Asn His Pro Gly Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu  
 195 200 205

35

Val Trp Glu Glu Thr Asp Gly Leu Asp Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys  
 210 215 220

40

45

50

RU 2 418 002 C2

Thr Phe Phe Lys Leu His Asp Val Asn Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu  
 225 230 235 240

5

Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Arg Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asn  
 245 250 255

10

Pro Gln Asn Ala Glu Asp Asp Met Ile Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu  
 260 265 270

15

Arg Met Arg Glu His Val Met Ser Glu Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg  
 275 280 285

20

Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Arg Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe  
 290 295 300

25

Leu Glu Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr  
 305 310 315 320

30

Glu Asp Glu Leu Lys Glu Tyr Glu Ser Ile Ile Ala Ile Gln Glu Asn  
 325 330 335

35

Glu Leu Lys Lys Arg Ala Glu Glu Leu Gln Lys Gln Lys Glu Asp Leu  
 340 345 350

40

45

50

Gln Arg Gln His Asp His Leu Glu Ala Gln Lys Gln Glu Tyr His Gln  
 355 360 365

5

Ala Val Gln His Leu Glu Gln Lys Lys Leu Gln Gln Gly Ile Ala Pro  
 370 375 380

10

Ser Gly Pro Ala Gly Glu Leu Lys Phe Glu Pro His Thr  
 385 390 395

15

<210> 27

20

<211> 31

<212> DNA

<213> Synthetic

25

<220>

<221> gene

<222> (1)..(31)

<223>

30

<400> 27

ttggatccgt tcctatcgat gtggacaaga c

31

35

<210> 28

<211> 34

40

<212> DNA

<213> Synthetic

45

<220>

<221> gene

50

<222> (1)..(34)

<223>

5

<400> 28

ttgcggccgc ttatgtgtgt ggctcaaact tcag

34

10

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

15

<213> Mus musculus

<220>

<221> gene

20

<222> (1)..(18)

<223>

25

<400> 29

cctgaaccac cagaatcc

18

30

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

35

<213> Mus musculus

<220>

<221> gene

40

<222> (1)..(18)

<223>

45

<400> 30

agactgatgg attggacc

18

50

<210> 31  
<211> 15  
<212> RNA  
5 <213> Synthetic

<400> 31  
10 atggtcctcc acctcatctt cagag 15

<210> 32  
15 <211> 16  
<212> PRT  
<213> Synthetic

20 <220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(16)  
25 <223>

<400> 32  
30 Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Cys  
1 5 10 15

35 <210> 33  
<211> 10  
<212> PRT  
40 <213> Synthetic

<220>  
45

50

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(10)

<223>

5

<400> 33

10 Glu Tyr Leu Lys Thr Leu Ser Glu Glu Cys

1 5 10

15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

20

<213> Synthetic

<220>

<221> PEPTIDE

25

<222> (1)..(15)

<223>

<400> 34

30

Lys Glu Phe Leu Glu Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu Asp Gln Cys

1 5 10 15

35

<210> 35

<211> 21

40

<212> DNA

<213> Synthetic

<400> 35

45

gcacgctgac cgctctggaa g

21

50



<210> 36  
<211> 27  
<212> DNA  
5 <213> Synthetic

<400> 36  
10 caaatgtggtt aggattctgg tggttca 27

<210> 37  
15 <211> 53  
<212> DNA  
<213> Synthetic

<400> 37  
20 ggttccgagg gtctggttcc gcgtggttct cctatcgatg tggacaagac caa 53

<210> 38  
25 <211> 38  
<212> DNA  
30 <213> Synthetic

<400> 38  
35 ggttgaggcc gcttacctct tcagctcacc cagtctcg 38

<210> 39  
40 <211> 30  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45

50

<400> 39

5 Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Asp  
 1 5 10 15

10 Val Leu Glu Thr Asp Lys His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Lys  
 20 25 30

15 <210> 40

<211> 30

<212> PRT

20 <213> Rattus norvegicus

<400> 40

25 Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu  
 1 5 10 15

30 Val Leu Glu Thr Asp Pro His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Lys  
 20 25 30

35 <210> 41

<211> 30

<212> PRT

40 <213> Mus musculus

<400> 41

45

50

Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu  
 1                    5                    10                    15

5

Val Leu Glu Thr Asp Pro His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Lys  
                   20                    25                    30

10

<210> 42

<211> 23

15

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 42

Val Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr Lys Val His Asn Thr Glu Pro Val  
 1                    5                    10                    15

25

Glu Asn Ala Arg Ile Glu Pro  
                   20

30

<210> 43

<211> 29

35

<212> PRT

<213> Mus musculus

40

<400> 43

Ala Asp Ile Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu Asp  
 1                    5                    10                    15

45

50

Leu Val Ser His Lys Val Arg Thr Arg Leu Asp Glu Leu

20

25

5

<210> 44

<211> 90

10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

15

ccagatactg gactttatta tgatgaatat ctcaagcaag tgattgatgt gctggaaaca 60

gataaacact tcagagaaaa gctccagaaa 90

20

<210> 45

<211> 90

25

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 45

30

ccagacacag gactttatta tgatgaatac ctcaagcaag tgattgaagt cttggaaca 60

gatccgcatt tcagagaaaa gctccagaaa 90

35

<210> 46

<211> 90

40

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 46

45

50

ccagatactg gactttatta tgatgaatac ctcaagcaag tgattgaagt cttggaaca 60

5 gatccacatt tcagagaaaa gctccagaaa 90

<210> 47

10 <211> 312

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

15 <400> 47

Gln Glu Val Gly Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala  
 20 1 5 10 15

Leu Gln Asp Thr Gly Met Asn His His Leu Leu Leu Lys Gln Phe Glu  
 25 20 25 30

His Leu Asn His Gln Asn Pro Asp Thr Phe Glu Ser Lys Asp Leu Asp  
 30 35 40 45

Met Leu Ile Lys Ala Ala Thr Ala Asp Leu Glu Gln Tyr Asp Arg Thr  
 35 50 55 60

Arg His Glu Glu Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met Lys Glu His Glu Arg  
 40 65 70 75 80

45

50

Arg Glu Tyr Leu Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys Arg Lys Glu Glu Glu

85

90

95

5

Ala Lys Phe Ala Glu Met Lys Arg Lys His Glu Asp His Pro Lys Val

100

105

110

10

Asn His Pro Gly Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Thr

115

120

125

15

Asp Gly Leu Asp Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr Phe Phe Lys Leu

130

135

140

20

His Asp Val Asn Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala

145

150

155

160

25

Leu Phe Thr Lys Glu Leu Asp Lys Val Tyr Asn Pro Gln Asn Ala Glu

165

170

175

30

Asp Asp Met Ile Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His

180

185

190

35

Val Met Asn Glu Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu

195

200

205

40

45

50

Glu Phe Leu Arg Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu Glu Pro Asp Ser  
 210 215 220

5

Trp Glu Thr Leu Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr Glu Glu Glu Leu Lys  
 225 230 235 240

10

Glu Tyr Glu Ser Ile Ile Ala Ile Gln Glu Ser Glu Leu Lys Lys Lys  
 245 250 255

15

Ala Asp Glu Leu Gln Lys Gln Lys Glu Glu Leu Gln Arg Gln His Asp  
 260 265 270

20

His Leu Glu Ala Gln Lys Gln Glu Tyr Gln Gln Ala Val Gln Gln Leu  
 275 280 285

25

Glu Gln Lys Lys Phe Gln Gln Gly Ile Ala Pro Ser Gly Pro Ala Gly  
 290 295 300

30

Glu Leu Lys Phe Glu Pro His Thr  
 305 310

35

40

<210> 48  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Synthetic

45

50

<400> 48  
 atggaatatt taaaaacgct gagtgag 27  
 5

<210> 49  
 <211> 23  
 10 <212> DNA  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 49  
 15 ttatgtgtgt ggctcaaact tca 23

<210> 50  
 <211> 699  
 <212> DNA  
 <213> Synthetic  
 25

<400> 50  
 atggaatatt taaaaacgct gagtgaggag aagaggaaag aagaagagtc taagtttgaa 60  
 30 gagatgaaga ggaagcacga agaccacccc aaagttaatc atcccggaag caaagatcaa 120  
 ctaaaagagg tttgggaaga gactgatgga ttggacccta atgactttga cccaagaca 180  
 35 tttttcaaat tacatgatgt taacaacgat ggattcctgg atgaacaaga attagaagca 240  
 ctattcacia gagagttgga gaaagtgtat aaccacaaa atgcagagga cgatatgata 300  
 40 gaaatggaag aggagaggct caggatgaga gaacacgtca tgagtgagat tgataacaac 360  
 45 aaagaccgat tggtgactct ggaggaattc ctgagagcta cagagaagaa agaattcctg 420  
 50



gagcctgata gctgggagac actggaccag caacagttat tcaccgagga cgagcttaaa 480  
 5 gagtatgaaa gcattattgc tatccaagag aacgagctta agaagagggc ggaagagctg 540  
 cagaaacaga aggaggatct gcagcggcag cacgaccacc tcgaggcgca gaagcaggag 600  
 10 tatcatcagg ccgtccagca cctggaacag aagaaacttc aacaaggcat tgctccatca 660  
 gggccagcgg gagagctgaa gtttgagcca cgtatgtaa 699

15

<210> 51  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 20 <213> Synthetic

25

Met Glu Tyr Leu Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys Arg Lys Glu Glu Glu  
 1 5 10 15

30

Ala Lys Phe Ala Glu Met Lys Arg Lys His Glu Asp His Pro Lys Val  
 20 25 30

35

Asn His Pro Gly Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Thr  
 35 40 45

40

Asp Gly Leu Asp Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr Phe Phe Lys Leu  
 45 50 55 60

50

His Asp Val Asn Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala  
 65 70 75 80

5

Leu Phe Thr Lys Glu Leu Asp Lys Val Tyr Asn Pro Gln Asn Ala Glu  
 85 90 95

10

Asp Asp Met Ile Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His  
 100 105 110

15

Val Met Asn Glu Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu  
 115 120 125

20

Glu Phe Leu Arg Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu Glu Pro Asp Ser  
 130 135 140

25

Trp Glu Thr Leu Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr Glu Glu Glu Leu Lys  
 145 150 155 160

30

Glu Tyr Glu Ser Ile Ile Ala Ile Gln Glu Ser Glu Leu Lys Lys Lys  
 165 170 175

35

Ala Asp Glu Leu Gln Lys Gln Lys Glu Glu Leu Gln Arg Gln His Asp  
 180 185 190

40

45

50

His Leu Glu Ala Gln Lys Gln Glu Tyr Gln Gln Ala Val Gln Gln Leu  
 195 200 205

5

Glu Gln Lys Lys Phe Gln Gln Gly Ile Ala Pro Ser Gly Pro Ala Gly  
 210 215 220

10

Glu Leu Lys Phe Glu Pro His Thr  
 225 230

15

<210> 52

<211> 25

20

<212> DNA

<213> Synthetic

25

<400> 52

atgcaagaag taggaagact gagaa

25

30

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

35

<213> Rattus norvegicus

<400> 53

ttatgtgtgt ggctcaaact tca

23

40

<210> 54

<211> 699

45

<212> DNA

50

<213> Synthetic

<400> 54

5 atggagtatt taaaaacgct gagtgaggag aagaggaaag aagaagagtc taagtttgaa 60

gagatgaaga ggaagcacga agaccacccc aaagttaatc atcccggaag caaagatcaa 120

10 ctaaaagagg tttgggaaga gactgatgga ttggacccta atgactttga cccaagaca 180

tttttcaaat tacatgatgt taacaacgat ggattcctgg atgaacaaga attagaagca 240

15 ctattcacia gagagttgga gaaagtgtat aaccacaaa atgcagagga cgatatgata 300

gaaatggaag aggagaggct caggatgaga gaacacgtca tgagtgagat tgataacaac 360

aaagaccgat tggtgactct ggaggaattc ctgagagcta cagagaagaa agaattcctg 420

25 gagcctgata gctgggagac actggaccag caacagttat tcaccgagga cgagcttaaa 480

gagtatgaaa gcattattgc tatccaagag aacgagctta agaagagggc ggaagagctg 540

30 cagaaacaga aggaggatct gcagcggcag cacgaccacc tcgaggcgca gaagcaggag 600

tatcatcagg ccgtccagca cctggaacag aagaaacttc aacaaggcat tgctccatca 660

35 gggccagcgg gagagctgaa gtttgagcca cgtatgtaa 699

40 <210> 55

<211> 313

<212> PRT

45 <213> Synthetic

50

&lt;400&gt; 55

Met Gln Glu Val Gly Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys Ala Lys Leu Asp  
 5 1 5 10 15

Ala Leu Gln Asp Thr Gly Met Asn His His Leu Leu Leu Lys Gln Phe  
 10 20 25 30

Glu His Leu Asn His Gln Asn Pro Asp Thr Phe Glu Ser Lys Asp Leu  
 15 35 40 45

Asp Met Leu Ile Lys Ala Ala Thr Ala Asp Leu Glu Gln Tyr Asp Arg  
 20 50 55 60

Thr Arg His Glu Glu Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met Lys Glu His Glu  
 25 65 70 75 80

Arg Arg Glu Tyr Leu Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys Arg Lys Glu Glu  
 30 85 90 95

Glu Ala Lys Phe Ala Glu Met Lys Arg Lys His Glu Asp His Pro Lys  
 35 100 105 110

Val Asn His Pro Gly Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu  
 40 115 120 125

45  
 50

RU 2 418 002 C2

Thr Asp Gly Leu Asp Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys Thr Phe Phe Lys  
 130 135 140

5

Leu His Asp Val Asn Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu  
 145 150 155 160

10

Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu Asp Lys Val Tyr Asn Pro Gln Asn Ala  
 165 170 175

15

Glu Asp Asp Met Ile Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu  
 180 185 190

20

His Val Met Asn Glu Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg Leu Val Thr Leu  
 195 200 205

25

Glu Glu Phe Leu Arg Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe Leu Glu Pro Asp  
 210 215 220

30

Ser Trp Glu Thr Leu Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr Glu Glu Glu Leu  
 225 230 235 240

35

Lys Glu Tyr Glu Ser Ile Ile Ala Ile Gln Glu Ser Glu Leu Lys Lys  
 245 250 255

40

45

50

Lys Ala Asp Glu Leu Gln Lys Gln Lys Glu Glu Leu Gln Arg Gln His

260

265

270

5

Asp His Leu Glu Ala Gln Lys Gln Glu Tyr Gln Gln Ala Val Gln Gln

275

280

285

10

Leu Glu Gln Lys Lys Phe Gln Gln Gly Ile Ala Pro Ser Gly Pro Ala

290

295

300

15

Gly Glu Leu Lys Phe Glu Pro His Thr

20

305

310

25

<210> 56

<211> 56

<212> DNA

<213> Synthetic

30

<400> 56

ggttccgcgg gtctggttcc gcgtggttct gttcctatcg atgtggacaa gaccaa

56

35

<210> 57

<211> 36

<212> DNA

<213> Synthetic

40

<400> 57

cttcttgagc agccagctca tccagtctcg tcttca

45

36

50

<210> 58  
<211> 38  
<212> DNA  
5 <213> Synthetic

<400> 58  
10 gagctggctg ctcaagaagt aggaagactg cggatgct 38

<210> 59  
15 <211> 39  
<212> DNA  
<213> Synthetic

20 <400> 59  
ggttgcggcc gcactttatg tgtgtggctc aaacttcag 39

25 <210> 60  
<211> 58  
<212> DNA  
30 <213> Synthetic

<400> 60  
35 ggttactagt ggttctggtc atcaccatca ccatcactcc gcgggtctgg ttccgcgt 58

40 <210> 61  
<211> 397  
<212> PRT  
<213> Synthetic

45

50



&lt;400&gt; 61

5 Gly Ser Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr Lys Val His Asn Thr Glu Pro  
 1 5 10 15

10 Val Glu Asn Ala Arg Ile Glu Pro Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp  
 20 25 30

15 Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu Val Leu Glu Thr Asp Pro His Phe  
 35 40 45

20 Arg Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg  
 50 55 60

25 Leu Ser Gln Glu Leu Asp Leu Val Ser His Lys Val Arg Thr Arg Leu  
 65 70 75 80

30 Asp Glu Leu Ala Ala Gln Glu Val Gly Arg Leu Arg Met Leu Ile Lys  
 85 90 95

35 Ala Lys Leu Asp Ala Leu Gln Asp Thr Gly Met Asn His His Leu Leu  
 100 105 110

40 Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asn His Gln Asn Pro Asn Thr Phe Glu  
 115 120 125

45  
 50

Ser Arg Asp Leu Asp Met Leu Ile Lys Ala Ala Thr Ala Asp Leu Glu  
 130 135 140

5

Gln Tyr Asp Arg Thr Arg His Glu Glu Phe Lys Lys Tyr Glu Met Met  
 145 150 155 160

10

Lys Glu His Glu Arg Arg Glu Tyr Leu Lys Thr Leu Ser Glu Glu Lys  
 165 170 175

15

Arg Lys Glu Glu Glu Ser Lys Phe Glu Glu Met Lys Arg Lys His Glu  
 180 185 190

20

Asp His Pro Lys Val Asn His Pro Gly Ser Lys Asp Gln Leu Lys Glu  
 195 200 205

25

Val Trp Glu Glu Thr Asp Gly Leu Asp Pro Asn Asp Phe Asp Pro Lys  
 210 215 220

30

Thr Phe Phe Lys Leu His Asp Val Asn Asn Asp Gly Phe Leu Asp Glu  
 225 230 235 240

35

Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Arg Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asn  
 245 250 255

40

45

50

Pro Gln Asn Ala Glu Asp Asp Met Ile Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu  
 260 265 270

5

Arg Met Arg Glu His Val Met Ser Glu Ile Asp Asn Asn Lys Asp Arg  
 275 280 285

10

Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Arg Ala Thr Glu Lys Lys Glu Phe  
 290 295 300

15

Leu Glu Pro Asp Ser Trp Glu Thr Leu Asp Gln Gln Gln Leu Phe Thr  
 305 310 315 320

20

Glu Asp Glu Leu Lys Glu Tyr Glu Ser Ile Ile Ala Ile Gln Glu Asn  
 325 330 335

25

Glu Leu Lys Lys Arg Ala Glu Glu Leu Gln Lys Gln Lys Glu Asp Leu  
 340 345 350

30

Gln Arg Gln His Asp His Leu Glu Ala Gln Lys Gln Glu Tyr His Gln  
 355 360 365

35

Ala Val Gln His Leu Glu Gln Lys Lys Leu Gln Gln Gly Ile Ala Pro  
 370 375 380

40

45

50

Ser Gly Pro Ala Gly Glu Leu Lys Phe Glu Pro His Thr  
 385 390 395

5

<210> 62  
 <211> 86  
 <212> PRT  
 <213> Synthetic

10

<400> 62

15

Gly Ser Pro Ile Asp Val Asp Lys Thr Lys Val His Asn Thr Glu Pro  
 1 5 10 15

20

Val Glu Asn Ala Arg Ile Glu Pro Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp  
 20 25 30

25

Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu Val Leu Glu Thr Asp Pro His Phe  
 35 40 45

30

Arg Glu Lys Leu Gln Lys Ala Asp Ile Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg  
 50 55 60

35

Leu Ser Gln Glu Leu Asp Leu Val Ser His Lys Val Arg Thr Arg Leu  
 65 70 75 80

40

Asp Glu Leu Lys Arg Cys  
 85

45

50

<210> 63  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 5 <213> Synthetic  
  
 <400> 63  
 10 ggttccgcgg gtctggttcc gcgtggttct cctatcgatg tggacaagac caa 53  
  
 <210> 64  
 15 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Synthetic  
  
 20 <400> 64  
 ggttgcgcc gcttaacacc tottcagctc atccagtctc g 41  
  
 25  
 <210> 65  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 30 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 65  
 35  
 Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Asp  
 1 5 10 15  
  
 40  
 <210> 66  
 <211> 14  
  
 45  
  
 50

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5  
 <400> 66

Val Leu Glu Thr Asp Lys His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Lys

10 1 5 10

<210> 67  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15  
 20  
 <400> 67

Lys Gln Val Ile Asp Val Leu Glu Thr Asp

25 1 5 10

<210> 68  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

30  
 35  
 <400> 68

Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu

40 1 5 10 15

<210> 69  
 <211> 14

45

50

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

5

<400> 69

Val Leu Glu Thr Asp Pro His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Lys

10

1 5 10

<210> 70

15

<211> 10

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

20

<400> 70

Lys Gln Val Ile Glu Val Leu Glu Thr Asp

25

1 5 10

<210> 71

30

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

35

<400> 71

Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Glu Tyr Leu Lys Gln Val Ile Glu

40

1 5 10 15

<210> 72

45

<211> 14

50

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 72

Val Leu Glu Thr Asp Pro His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Lys

10 1 5 10

<210> 73

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

20 <400> 73

Lys Gln Val Ile Glu Val Leu Glu Thr Asp

25 1 5 10

<210> 74

30 <211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

35 <400> 74

ccagatactg gactttatta tgatgaatat ctcaagcaag tgattgat

48

40 <210> 75

<211> 42

45 <212> DNA

<213> Homo sapiens

50



<400> 75

gtgctggaaa cagataaaca cttcagagaa aagctccaga aa

42

5

<210> 76

<211> 30

10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 76

15

aagcaagtga ttgatgtgct ggaaacagat

30

20

<210> 77

<211> 48

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

25

<400> 77

ccagacacag gactttatta tgatgaatac ctcaagcaag tgattgaa

48

30

<210> 78

<211> 42

35

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 78

40

gtcttggaag cagatccgca tttcagagaa aagctccaga aa

42

45

<210> 79

50

<211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Rattus norvegicus

5

<400> 79  
 aagcaagtga ttgaagtctt ggaaacagat

30

10

<210> 80  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

15

<400> 80  
 ccagatactg gactttatta tgatgaatac ctcaagcaag tgattgaa

48

20

<210> 81  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

25

30

<400> 81  
 gtcttggaag cagatccaca tttcagagaa aagctccaga aa

42

35

<210> 82  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

40

<400> 82  
 aagcaagtga ttgaagtctt ggaaacagat

30

45

50

<210> 83  
 <211> 1386  
 <212> DNA  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 10 <221> CDS  
 <222> (1)..(1383)  
 <223>  
  
 15 <400> 83  
 atg cct ccc tct ggg ccc cga gga acc ctc ctt ctg ttg ccg ctg ctg 48  
 Met Pro Pro Ser Gly Pro Arg Gly Thr Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu  
 1 5 10 15  
 20  
 ctg ctg ctc ctg ctt cgc gcc gtg ctg gct gtc ccc ctg gag cga ggg 96  
 Leu Leu Leu Leu Leu Arg Ala Val Leu Ala Val Pro Leu Glu Arg Gly  
 25 20 25 30  
 gcg ccc aac aag gag gag acc cct gcg act gag agt ccc gac aca ggc 144  
 Ala Pro Asn Lys Glu Glu Thr Pro Ala Thr Glu Ser Pro Asp Thr Gly  
 30 35 40 45  
 ctg tac tac cac cgg tac ctc cag gag gtc atc gat gta ctg gag acg 192  
 Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asp Val Leu Glu Thr  
 35 50 55 60  
 gat ggg cat ttc cga gag aag ctg cag gct gcc aat gcg gag gac atc 240  
 Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala Ala Asn Ala Glu Asp Ile  
 40 65 70 75 80  
 45  
 50

aag agc ggg aag ctg agc cga gag ctg gac ttt gtc agc cac cac gtc 288  
 Lys Ser Gly Lys Leu Ser Arg Glu Leu Asp Phe Val Ser His His Val  
 5 85 90 95  
  
 cgc acc aag ctg gat gag ctc aag cga cag gag gtg tca cgg ctg cgg 336  
 Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Ser Arg Leu Arg  
 10 100 105 110  
  
 atg ctg ctc aag gcc aag atg gac gcc gag cag gat ccc aat gta cag 384  
 Met Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Glu Gln Asp Pro Asn Val Gln  
 15 115 120 125  
  
 gtg gat cat ctg aat ctc ctg aaa cag ttt gaa cac ctg gac cct cag 432  
 Val Asp His Leu Asn Leu Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asp Pro Gln  
 20 130 135 140  
  
 aac cag cat aca ttc gag gcc cgc gac ctg gag ctg ctg atc cag acg 480  
 Asn Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu Glu Leu Leu Ile Gln Thr  
 25 145 150 155 160  
  
 gcc acc cgg gac ctt gcc cag tac gac gca gcc cat cat gaa gag ttc 528  
 Ala Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala Ala His His Glu Glu Phe  
 30 165 170 175  
  
 aag cgc tac gag atg ctt aag gaa cac gag aga cgg cgt tat ctg gag 576  
 Lys Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu Arg Arg Arg Tyr Leu Glu  
 35 180 185 190  
  
 tca ctg gga gag gag cag aga aag gag gcg gag agg aag ctg gaa gag 624  
 Ser Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala Glu Arg Lys Leu Glu Glu  
 40 195 200 205  
  
 caa cag cgc cgg cac cgc gag cac cct aaa gtc aac gtg cct ggc agc 672  
 45  
  
 50

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
|    | Gln | Gln | Arg | Arg | His | Arg | Glu | His | Pro | Lys | Val | Asn | Val | Pro | Gly | Ser |      |
|    | 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |      |
| 5  | caa | gcc | cag | ttg | aag | gag | gtg | tgg | gag | gag | ctg | gat | gga | ctg | gac | ccc | 720  |
|    | Gln | Ala | Gln | Leu | Lys | Glu | Val | Trp | Glu | Glu | Leu | Asp | Gly | Leu | Asp | Pro |      |
|    | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |      |
| 10 | aac | agg | ttt | aac | ccc | aag | acc | ttc | ttc | ata | ctg | cat | gat | atc | aac | agt | 768  |
|    | Asn | Arg | Phe | Asn | Pro | Lys | Thr | Phe | Phe | Ile | Leu | His | Asp | Ile | Asn | Ser |      |
|    |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |      |
| 15 | gat | ggt | gtc | ctg | gat | gag | cag | gag | ctg | gag | gca | ctc | ttc | acc | aag | gag | 816  |
|    | Asp | Gly | Val | Leu | Asp | Glu | Gln | Glu | Leu | Glu | Ala | Leu | Phe | Thr | Lys | Glu |      |
|    |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |      |
| 20 | ctg | gag | aaa | gtg | tac | gac | cca | aag | aat | gag | gag | gac | gac | atg | cgg | gag | 864  |
|    | Leu | Glu | Lys | Val | Tyr | Asp | Pro | Lys | Asn | Glu | Glu | Asp | Asp | Met | Arg | Glu |      |
| 25 |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |      |
|    | atg | gag | gag | gag | cga | ctg | cgc | atg | cgg | gag | cat | gtg | atg | aag | aat | gtg | 912  |
|    | Met | Glu | Glu | Glu | Arg | Leu | Arg | Met | Arg | Glu | His | Val | Met | Lys | Asn | Val |      |
| 30 |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |      |
|    | gac | acc | aac | cag | gac | cgc | ctc | gtg | acc | ctg | gag | gag | ttc | ctc | gca | tcc | 960  |
| 35 | Asp | Thr | Asn | Gln | Asp | Arg | Leu | Val | Thr | Leu | Glu | Glu | Phe | Leu | Ala | Ser |      |
|    | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |      |
| 40 | act | cag | agg | aag | gag | ttt | ggg | gac | acc | ggg | gag | ggc | tgg | gag | aca | gtg | 1008 |
|    | Thr | Gln | Arg | Lys | Glu | Phe | Gly | Asp | Thr | Gly | Glu | Gly | Trp | Glu | Thr | Val |      |
|    |     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |
| 45 | gag | atg | cac | cct | gcc | tac | acc | gag | gaa | gag | ctg | agg | cgc | ttt | gaa | gag | 1056 |
| 50 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |

|    |   |             |
|----|---|-------------|
|    | Glu Met His Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu Leu Arg Arg Phe Glu Glu |             |
|    | 340   | 345 350     |
| 5  | gag ctg gct gcc cgg gag gca gag ctg aat gcc aag gcc cag cgc ctc | 1104        |
|    | Glu Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn Ala Lys Ala Gln Arg Leu |             |
|    | 355   | 360 365     |
| 10 | agc cag gag aca gag gct cta ggg cgg tcc cag gcc cgc ctg gag gcc | 1152        |
|    | Ser Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser Gln Gly Arg Leu Glu Ala |             |
|    | 370   | 375 380     |
| 15 | cag aag aga gag ctg cag cag gct gtg ctg cac atg gag cag cgg aag | 1200        |
|    | Gln Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu His Met Glu Gln Arg Lys |             |
|    | 385   | 390 395 400 |
| 20 | cag cag cag cag cag cag caa ggc cac aag gcc ccg gct gcc cac cct | 1248        |
|    | Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly His Lys Ala Pro Ala Ala His Pro |             |
|    | 405   | 410 415     |
| 25 | gag ggg cag ctc aag ttc cac cca gac aca gac gat gta cct gtc cca | 1296        |
|    | Glu Gly Gln Leu Lys Phe His Pro Asp Thr Asp Asp Val Pro Val Pro |             |
|    | 420   | 425 430     |
| 30 | gct cca gcc ggt gac cag aag gag gtg gac act tca gaa aag aaa ctt | 1344        |
|    | Ala Pro Ala Gly Asp Gln Lys Glu Val Asp Thr Ser Glu Lys Lys Leu |             |
|    | 435   | 440 445     |
| 35 | ctc gag cgg ctc cct gag gtt gag gtg ccc cag cat ctg tga         | 1386        |
|    | Leu Glu Arg Leu Pro Glu Val Glu Val Pro Gln His Leu             |             |
|    | 450   | 455 460     |
| 40 |   |             |
| 45 | <210> 84  |             |
| 50 |   |             |

<211> 461  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 84

10

Met Pro Pro Ser Gly Pro Arg Gly Thr Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu  
 1 5 10 15

15

Leu Leu Leu Leu Leu Arg Ala Val Leu Ala Val Pro Leu Glu Arg Gly  
 20 25 30

20

Ala Pro Asn Lys Glu Glu Thr Pro Ala Thr Glu Ser Pro Asp Thr Gly  
 35 40 45

25

Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asp Val Leu Glu Thr  
 50 55 60

30

Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala Ala Asn Ala Glu Asp Ile  
 65 70 75 80

35

Lys Ser Gly Lys Leu Ser Arg Glu Leu Asp Phe Val Ser His His Val  
 85 90 95

40

Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Ser Arg Leu Arg  
 100 105 110

45

50

Met Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Glu Gln Asp Pro Asn Val Gln  
 115 120 125

5

Val Asp His Leu Asn Leu Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asp Pro Gln  
 130 135 140

10

Asn Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu Glu Leu Leu Ile Gln Thr  
 145 150 155 160

15

Ala Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala Ala His His Glu Glu Phe  
 165 170 175

20

Lys Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu Arg Arg Arg Tyr Leu Glu  
 180 185 190

25

Ser Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala Glu Arg Lys Leu Glu Glu  
 195 200 205

30

Gln Gln Arg Arg His Arg Glu His Pro Lys Val Asn Val Pro Gly Ser  
 210 215 220

35

Gln Ala Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Leu Asp Gly Leu Asp Pro  
 225 230 235 240

40

45

50



RU 2418002 C2

Asn Arg Phe Asn Pro Lys Thr Phe Phe Ile Leu His Asp Ile Asn Ser  
 245 250 255

5

Asp Gly Val Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Lys Glu  
 260 265 270

10

Leu Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu Glu Asp Asp Met Arg Glu  
 275 280 285

15

Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val Met Lys Asn Val  
 290 295 300

20

Asp Thr Asn Gln Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Ala Ser  
 305 310 315 320

25

Thr Gln Arg Lys Glu Phe Gly Asp Thr Gly Glu Gly Trp Glu Thr Val  
 325 330 335

30

Glu Met His Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu Leu Arg Arg Phe Glu Glu  
 340 345 350

35

Glu Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn Ala Lys Ala Gln Arg Leu  
 355 360 365

40

45

50

RU 2 418 002 C2

Ser Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser Gln Gly Arg Leu Glu Ala  
 370 375 380

5

Gln Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu His Met Glu Gln Arg Lys  
 385 390 395 400

10

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly His Lys Ala Pro Ala Ala His Pro  
 405 410 415

15

Glu Gly Gln Leu Lys Phe His Pro Asp Thr Asp Asp Val Pro Val Pro  
 420 425 430

20

Ala Pro Ala Gly Asp Gln Lys Glu Val Asp Thr Ser Glu Lys Lys Leu  
 435 440 445

25

Leu Glu Arg Leu Pro Glu Val Glu Val Pro Gln His Leu  
 450 455 460

30

35

<210> 85  
 <211> 1308  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

40

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1308)  
 <223>

45

50

<400> 85

gtc ccc ctg gag cga ggg gcg ccc aac aag gag gag acc cct gcg act 48  
 Val Pro Leu Glu Arg Gly Ala Pro Asn Lys Glu Glu Thr Pro Ala Thr  
 5 1 5 10 15

gag agt ccc gac aca ggc ctg tac tac cac cgg tac ctc cag gag gtc 96  
 10 Glu Ser Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val  
 20 25 30

atc gat gta ctg gag acg gat ggg cat ttc cga gag aag ctg cag gct 144  
 15 Ile Asp Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
 35 40 45

gcc aat gcg gag gac atc aag agc ggg aag ctg agc cga gag ctg gac 192  
 20 Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys Ser Gly Lys Leu Ser Arg Glu Leu Asp  
 50 55 60

ttt gtc agc cac cac gtc cgc acc aag ctg gat gag ctc aag cga cag 240  
 25 Phe Val Ser His His Val Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln  
 65 70 75 80

gag gtg tca cgg ctg cgg atg ctg ctc aag gcc aag atg gac gcc gag 288  
 30 Glu Val Ser Arg Leu Arg Met Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Glu  
 85 90 95

cag gat ccc aat gta cag gtg gat cat ctg aat ctc ctg aaa cag ttt 336  
 35 Gln Asp Pro Asn Val Gln Val Asp His Leu Asn Leu Leu Lys Gln Phe  
 100 105 110

gaa cac ctg gac cct cag aac cag cat aca ttc gag gcc cgc gac ctg 384  
 40 Glu His Leu Asp Pro Gln Asn Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu  
 45 115 120 125

50

gag ctg ctg atc cag acg gcc acc cgg gac ctt gcc cag tac gac gca 432  
 Glu Leu Leu Ile Gln Thr Ala Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala  
 130 135 140  
 5  
 gcc cat cat gaa gag ttc aag cgc tac gag atg ctt aag gaa cac gag 480  
 Ala His His Glu Glu Phe Lys Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu  
 10 145 150 155 160  
 aga cgg cgt tat ctg gag tca ctg gga gag gag cag aga aag gag gcg 528  
 Arg Arg Arg Tyr Leu Glu Ser Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala  
 15 165 170 175  
 gag agg aag ctg gaa gag caa cag cgc cgg cac cgc gag cac cct aaa 576  
 Glu Arg Lys Leu Glu Glu Gln Gln Arg Arg His Arg Glu His Pro Lys  
 20 180 185 190  
 gtc aac gtg cct ggc agc caa gcc cag ttg aag gag gtg tgg gag gag 624  
 Val Asn Val Pro Gly Ser Gln Ala Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu  
 25 195 200 205  
 ctg gat gga ctg gac ccc aac agg ttt aac ccc aag acc ttc ttc ata 672  
 Leu Asp Gly Leu Asp Pro Asn Arg Phe Asn Pro Lys Thr Phe Phe Ile  
 30 210 215 220  
 ctg cat gat atc aac agt gat ggt gtc ctg gat gag cag gag ctg gag 720  
 Leu His Asp Ile Asn Ser Asp Gly Val Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu  
 225 230 235 240  
 35  
 gca ctc ttc acc aag gag ctg gag aaa gtg tac gac cca aag aat gag 768  
 Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu  
 245 250 255  
 40  
 45  
 50

gag gac gac atg cgg gag atg gag gag gag cga ctg cgc atg cgg gag 816  
 Glu Asp Asp Met Arg Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu  
 260 265 270  
 5  
 cat gtg atg aag aat gtg gac acc aac cag gac cgc ctc gtg acc ctg 864  
 His Val Met Lys Asn Val Asp Thr Asn Gln Asp Arg Leu Val Thr Leu  
 275 280 285  
 10  
 gag gag ttc ctc gca tcc act cag agg aag gag ttt ggg gac acc ggg 912  
 Glu Glu Phe Leu Ala Ser Thr Gln Arg Lys Glu Phe Gly Asp Thr Gly  
 290 295 300  
 15  
 gag ggc tgg gag aca gtg gag atg cac cct gcc tac acc gag gaa gag 960  
 Glu Gly Trp Glu Thr Val Glu Met His Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu  
 305 310 315 320  
 20  
 ctg agg cgc ttt gaa gag gag ctg gct gcc cgg gag gca gag ctg aat 1008  
 Leu Arg Arg Phe Glu Glu Glu Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn  
 325 330 335  
 25  
 gcc aag gcc cag cgc ctc agc cag gag aca gag gct cta ggg cgg tcc 1056  
 Ala Lys Ala Gln Arg Leu Ser Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser  
 340 345 350  
 30  
 cag ggc cgc ctg gag gcc cag aag aga gag ctg cag cag gct gtg ctg 1104  
 Gln Gly Arg Leu Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu  
 355 360 365  
 35  
 cac atg gag cag cgg aag cag cag cag cag cag cag caa ggc cac aag 1152  
 His Met Glu Gln Arg Lys Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly His Lys  
 370 375 380  
 40  
 gcc ccg gct gcc cac cct gag ggg cag ctc aag ttc cac cca gac aca 1200  
 45  
 50

Ala Pro Ala Ala His Pro Glu Gly Gln Leu Lys Phe His Pro Asp Thr  
 385 390 395 400

5 gac gat gta cct gtc cca gct cca gcc ggt gac cag aag gag gtg gac 1248  
 Asp Asp Val Pro Val Pro Ala Pro Ala Gly Asp Gln Lys Glu Val Asp  
 405 410 415

10 act tca gaa aag aaa ctt ctc gag cgg ctc cct gag gtt gag gtg ccc 1296  
 Thr Ser Glu Lys Lys Leu Leu Glu Arg Leu Pro Glu Val Glu Val Pro  
 420 425 430

15 cag cat ctg tga 1308  
 Gln His Leu  
 435

20 <210> 86  
 25 <211> 435  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 86

Val Pro Leu Glu Arg Gly Ala Pro Asn Lys Glu Glu Thr Pro Ala Thr  
 35 1 5 10 15

40 Glu Ser Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val  
 20 25 30

45 Ile Asp Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
 35 40 45

50

Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys Ser Gly Lys Leu Ser Arg Glu Leu Asp  
 50 55 60

5

Phe Val Ser His His Val Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln  
 65 70 75 80

10

Glu Val Ser Arg Leu Arg Met Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Glu  
 85 90 95

15

Gln Asp Pro Asn Val Gln Val Asp His Leu Asn Leu Leu Lys Gln Phe  
 100 105 110

20

Glu His Leu Asp Pro Gln Asn Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu  
 115 120 125

25

Glu Leu Leu Ile Gln Thr Ala Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala  
 130 135 140

30

Ala His His Glu Glu Phe Lys Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu  
 145 150 155 160

35

Arg Arg Arg Tyr Leu Glu Ser Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala  
 165 170 175

40

45

50

RU 2418002 C2

Glu Arg Lys Leu Glu Glu Gln Gln Arg Arg His Arg Glu His Pro Lys  
 180 185 190

5

Val Asn Val Pro Gly Ser Gln Ala Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu  
 195 200 205

10

Leu Asp Gly Leu Asp Pro Asn Arg Phe Asn Pro Lys Thr Phe Phe Ile  
 210 215 220

15

Leu His Asp Ile Asn Ser Asp Gly Val Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu  
 225 230 235 240

20

Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu  
 245 250 255

25

Glu Asp Asp Met Arg Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu  
 260 265 270

30

His Val Met Lys Asn Val Asp Thr Asn Gln Asp Arg Leu Val Thr Leu  
 275 280 285

35

Glu Glu Phe Leu Ala Ser Thr Gln Arg Lys Glu Phe Gly Asp Thr Gly  
 290 295 300

40

45

50



Glu Gly Trp Glu Thr Val Glu Met His Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu  
 305 310 315 320

5

Leu Arg Arg Phe Glu Glu Glu Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn  
 325 330 335

10

Ala Lys Ala Gln Arg Leu Ser Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser  
 340 345 350

15

Gln Gly Arg Leu Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu  
 355 360 365

20

His Met Glu Gln Arg Lys Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly His Lys  
 370 375 380

25

Ala Pro Ala Ala His Pro Glu Gly Gln Leu Lys Phe His Pro Asp Thr  
 385 390 395 400

30

Asp Asp Val Pro Val Pro Ala Pro Ala Gly Asp Gln Lys Glu Val Asp  
 405 410 415

35

Thr Ser Glu Lys Lys Leu Leu Glu Arg Leu Pro Glu Val Glu Val Pro  
 420 425 430

40

45

50

Gln His Leu

435

5

<210> 87

<211> 1380

10

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

15

<221> CDS

<222> (1)..(1380)

<223>

20

<400> 87

atg cct acc tct gtg ccc cgc ggg gcg cct ttc ctt ctc cta cca cct 48

Met Pro Thr Ser Val Pro Arg Gly Ala Pro Phe Leu Leu Leu Pro Pro

25

1 5 10 15

tta ctg atg ctg tct gct gtg ctg gca gtg cct gtg gac cgc gca gca 96

Leu Leu Met Leu Ser Ala Val Leu Ala Val Pro Val Asp Arg Ala Ala

30

20 25 30

cct cat cag gag gac aac cag gcc act gag acc ccg gac aca ggc ctg 144

35

Pro His Gln Glu Asp Asn Gln Ala Thr Glu Thr Pro Asp Thr Gly Leu

35 40 45

tac tac cat cgg tac ctc cag gag gtc atc aac gtg cta gag aca gat 192

40

Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asn Val Leu Glu Thr Asp

50 55 60

ggg cac ttc cgg gag aag ctg caa gct gcc aac gct gag gac att aag 240

45

50

|    |   |     |     |     |     |
|----|---|-----|-----|-----|-----|
|    | Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys |     |     |     |     |
|    | 65  | 70  | 75  | 80  |     |
| 5  | agt gga aag ctg agt caa gag ctg gac ttc gtc agc cac aac gtc cgc |     |     | 288 |     |
|    | Ser Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu Asp Phe Val Ser His Asn Val Arg |     |     |     |     |
|    |   | 85  | 90  | 95  |     |
| 10 | acc aag ctg gat gag ctc aag cga cag gag gta tca agg ctt cgg atg |     |     | 336 |     |
|    | Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Ser Arg Leu Arg Met |     |     |     |     |
|    |   | 100 | 105 | 110 |     |
| 15 | ctg ctc aag gcc aag atg gat gca aag cag gag cct aac ttg cag gtg |     |     | 384 |     |
|    | Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Lys Gln Glu Pro Asn Leu Gln Val |     |     |     |     |
|    |   | 115 | 120 | 125 |     |
| 20 | gac cac atg aac ctt ctg aag cag ttt gaa cac ctg gac cct cag aac |     |     | 432 |     |
|    | Asp His Met Asn Leu Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asp Pro Gln Asn |     |     |     |     |
| 25 |   | 130 | 135 | 140 |     |
| 30 | cag cac acg ttt gag gct cgg gac cta gag ctg ctg atc cag acg gcc |     |     | 480 |     |
|    | Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu Glu Leu Leu Ile Gln Thr Ala |     |     |     |     |
|    |   | 145 | 150 | 155 | 160 |
| 35 | acc cga gac ctc gcc cag tat gac gct gca cac cat gaa gag ttc aaa |     |     | 528 |     |
|    | Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala Ala His His Glu Glu Phe Lys |     |     |     |     |
|    |   | 165 | 170 | 175 |     |
| 40 | cgc tac gag atg ctc aag gaa cat gag cga aga cgt tac ctg gag tct |     |     | 576 |     |
|    | Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu Arg Arg Arg Tyr Leu Glu Ser |     |     |     |     |
|    |   | 180 | 185 | 190 |     |
| 45 | ctg gga gag gag cag cgg aag gag gct gag agg aag cta caa gag cag |     |     | 624 |     |

50

Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala Glu Arg Lys Leu Gln Glu Gln  
 195 200 205

5 cag cgc aga cac cgg gaa cac ccc aaa gtc aat gtt cct ggc agc caa 672  
 Gln Arg Arg His Arg Glu His Pro Lys Val Asn Val Pro Gly Ser Gln  
 210 215 220

10 gcc cag ttg aag gag gtg tgg gag gag cta gat gga ttg gac ccc aac 720  
 Ala Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Leu Asp Gly Leu Asp Pro Asn  
 225 230 235 240

15 agg ttc aac ccc aag acc ttc ttc ata ctg cat gac atc aac agc gat 768  
 Arg Phe Asn Pro Lys Thr Phe Phe Ile Leu His Asp Ile Asn Ser Asp  
 245 250 255

20 ggt gtc cta gat gag caa gaa ctg gaa gct ctg ttt acc aag gag ctg 816  
 Gly Val Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu  
 25 260 265 270

gag aag gtg tac gac ccg aag aac gag gag gac gac atg agg gag atg 864  
 Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu Glu Asp Asp Met Arg Glu Met  
 30 275 280 285

gag gag gag cgg ctg cgc atg cgg gag cat gtg atg aag aac gtg gac 912  
 Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val Met Lys Asn Val Asp  
 35 290 295 300

acc aac cag gac cga ctt gtg acc ctg gag gaa ttc ctg gca tcc aca 960  
 Thr Asn Gln Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Ala Ser Thr  
 40 305 310 315 320

45 cag agg aag gag ttt ggg gaa act gcg gag gga tgg aag aca gtg gaa 1008

50

|    |   |     |      |     |
|----|---|-----|------|-----|
|    | Gln Arg Lys Glu Phe Gly Glu Thr Ala Glu Gly Trp Lys Thr Val Glu |     |      |     |
|    | 325   | 330 | 335  |     |
| 5  | atg tat cca gcc tac aca gag gaa gag ctg aag cgt ttt gaa gag gag |     | 1056 |     |
|    | Met Tyr Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu Leu Lys Arg Phe Glu Glu Glu |     |      |     |
|    | 340   | 345 | 350  |     |
| 10 | ctt gct gcc cgg gag gct gag cta aat gcc aga gcc cag cgc ctc agc |     | 1104 |     |
|    | Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn Ala Arg Ala Gln Arg Leu Ser |     |      |     |
|    | 355   | 360 | 365  |     |
| 15 | cag gag aca gag gcc ctg ggg cgc tcc cag gac cgc cta gag gct cag |     | 1152 |     |
|    | Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser Gln Asp Arg Leu Glu Ala Gln |     |      |     |
| 20 | 370   | 375 | 380  |     |
|    | aag aga gag ctg cag cag gcc gtt ctg cag atg gag caa agg aag cag |     | 1200 |     |
|    | Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu Gln Met Glu Gln Arg Lys Gln |     |      |     |
| 25 | 385   | 390 | 395  | 400 |
|    | caa cag caa gag cag agc gct cgg cct tcc caa cct gat ggg cag ctg |     | 1248 |     |
| 30 | Gln Gln Gln Glu Gln Ser Ala Pro Pro Ser Gln Pro Asp Gly Gln Leu |     |      |     |
|    | 405   | 410 | 415  |     |
|    | cag ttc cgt gca gac aca ggg gat gct cct gtc cca gct cca gca ggt |     | 1296 |     |
| 35 | Gln Phe Arg Ala Asp Thr Gly Asp Ala Pro Val Pro Ala Pro Ala Gly |     |      |     |
|    | 420   | 425 | 430  |     |
|    | gac cag aaa gac gtg cct gct tct gaa aag aag gtt cca gag cag ccc |     | 1344 |     |
| 40 | Asp Gln Lys Asp Val Pro Ala Ser Glu Lys Lys Val Pro Glu Gln Pro |     |      |     |
|    | 435   | 440 | 445  |     |
| 45 | cct gtg ctg cca cag ctg gat tct cag cat tta taa                 |     | 1380 |     |

50

Pro Val Leu Pro Gln Leu Asp Ser Gln His Leu

450

455

5

<210> 88

<211> 459

10

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 88

15

Met Pro Thr Ser Val Pro Arg Gly Ala Pro Phe Leu Leu Leu Pro Pro

1

5

10

15

20

Leu Leu Met Leu Ser Ala Val Leu Ala Val Pro Val Asp Arg Ala Ala

20

25

30

25

Pro His Gln Glu Asp Asn Gln Ala Thr Glu Thr Pro Asp Thr Gly Leu

35

40

45

30

Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asn Val Leu Glu Thr Asp

35

50

55

60

Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys

40

65

70

75

80

Ser Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu Asp Phe Val Ser His Asn Val Arg

45

85

90

95

50

Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Ser Arg Leu Arg Met  
 100 105 110

5

Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Lys Gln Glu Pro Asn Leu Gln Val  
 115 120 125

10

Asp His Met Asn Leu Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asp Pro Gln Asn  
 130 135 140

15

Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu Glu Leu Leu Ile Gln Thr Ala  
 145 150 155 160

20

Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala Ala His His Glu Glu Phe Lys  
 165 170 175

25

Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu Arg Arg Arg Tyr Leu Glu Ser  
 180 185 190

30

Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala Glu Arg Lys Leu Gln Glu Gln  
 195 200 205

35

Gln Arg Arg His Arg Glu His Pro Lys Val Asn Val Pro Gly Ser Gln  
 210 215 220

40

45

50

Ala Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Leu Asp Gly Leu Asp Pro Asn  
 225 230 235 240

5

Arg Phe Asn Pro Lys Thr Phe Phe Ile Leu His Asp Ile Asn Ser Asp  
 245 250 255

10

Gly Val Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu  
 260 265 270

15

Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu Glu Asp Asp Met Arg Glu Met  
 275 280 285

20

Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val Met Lys Asn Val Asp  
 290 295 300

25

Thr Asn Gln Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Ala Ser Thr  
 305 310 315 320

30

Gln Arg Lys Glu Phe Gly Glu Thr Ala Glu Gly Trp Lys Thr Val Glu  
 325 330 335

35

Met Tyr Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu Leu Lys Arg Phe Glu Glu Glu  
 340 345 350

40

45

50



Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn Ala Arg Ala Gln Arg Leu Ser  
 355 360 365

5

Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser Gln Asp Arg Leu Glu Ala Gln  
 370 375 380

10

Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu Gln Met Glu Gln Arg Lys Gln  
 385 390 395 400

15

Gln Gln Gln Glu Gln Ser Ala Pro Pro Ser Gln Pro Asp Gly Gln Leu  
 405 410 415

20

Gln Phe Arg Ala Asp Thr Gly Asp Ala Pro Val Pro Ala Pro Ala Gly  
 420 425 430

25

Asp Gln Lys Asp Val Pro Ala Ser Glu Lys Lys Val Pro Glu Gln Pro  
 435 440 445

30

Pro Val Leu Pro Gln Leu Asp Ser Gln His Leu  
 450 455

35

40

<210> 89

<211> 1305

<212> DNA

45

<213> Rattus norvegicus

50

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1305)

5

<223>

<400> 89

10 gtg cct gtg gac cgc gca gca cct cat cag gag gac aac cag gcc act 48  
 Val Pro Val Asp Arg Ala Ala Pro His Gln Glu Asp Asn Gln Ala Thr  
 1 5 10 15

15 gag acc ccg gac aca ggc ctg tac tac cat cgg tac ctc cag gag gtc 96  
 Glu Thr Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val  
 20 25 30

20 atc aac gtg cta gag aca gat ggg cac ttc cgg gag aag ctg caa gct 144  
 Ile Asn Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
 35 40 45

25 gcc aac gct gag gac att aag agt gga aag ctg agt caa gag ctg gac 192  
 Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys Ser Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu Asp  
 50 55 60

30 ttc gtc agc cac aac gtc cgc acc aag ctg gat gag ctc aag cga cag 240  
 Phe Val Ser His Asn Val Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln  
 35 65 70 75 80

40 gag gta tca agg ctt cgg atg ctg ctc aag gcc aag atg gat gca aag 288  
 Glu Val Ser Arg Leu Arg Met Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Lys  
 85 90 95

45 cag gag cct aac ttg cag gtg gac cac atg aac ctt ctg aag cag ttt 336  
 Gln Glu Pro Asn Leu Gln Val Asp His Met Asn Leu Leu Lys Gln Phe  
 100 105 110

50

5 gaa cac ctg gac cct cag aac cag cac acg ttt gag gct cgg gac cta 384  
 Glu His Leu Asp Pro Gln Asn Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu  
 115 120 125

10 gag ctg ctg atc cag acg gcc acc cga gac ctc gcc cag tat gac gct 432  
 Glu Leu Leu Ile Gln Thr Ala Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala  
 130 135 140

15 gca cac cat gaa gag ttc aaa cgc tac gag atg ctc aag gaa cat gag 480  
 Ala His His Glu Glu Phe Lys Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu  
 145 150 155 160

20 cga aga cgt tac ctg gag tct ctg gga gag gag cag cgg aag gag gct 528  
 Arg Arg Arg Tyr Leu Glu Ser Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala  
 165 170 175

25 gag agg aag cta caa gag cag cag cgc aga cac cgg gaa cac ccc aaa 576  
 Glu Arg Lys Leu Gln Glu Gln Gln Arg Arg His Arg Glu His Pro Lys  
 180 185 190

30 gtc aat gtt cct ggc agc caa gcc cag ttg aag gag gtg tgg gag gag 624  
 Val Asn Val Pro Gly Ser Gln Ala Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu  
 195 200 205

35 cta gat gga ttg gac ccc aac agg ttc aac ccc aag acc ttc ttc ata 672  
 Leu Asp Gly Leu Asp Pro Asn Arg Phe Asn Pro Lys Thr Phe Phe Ile  
 210 215 220

40 ctg cat gac atc aac agc gat ggt gtc cta gat gag caa gaa ctg gaa 720  
 Leu His Asp Ile Asn Ser Asp Gly Val Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu  
 225 230 235 240

45  
 50

gct ctg ttt acc aag gag ctg gag aag gtg tac gac ccg aag aac gag 768  
 Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu  
 245 250 255  
 5

gag gac gac atg agg gag atg gag gag gag cgg ctg cgc atg cgg gag 816  
 Glu Asp Asp Met Arg Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu  
 260 265 270  
 10

cat gtg atg aag aac gtg gac acc aac cag gac cga ctt gtg acc ctg 864  
 His Val Met Lys Asn Val Asp Thr Asn Gln Asp Arg Leu Val Thr Leu  
 275 280 285  
 15

gag gaa ttc ctg gca tcc aca cag agg aag gag ttt ggg gaa act gcg 912  
 Glu Glu Phe Leu Ala Ser Thr Gln Arg Lys Glu Phe Gly Glu Thr Ala  
 290 295 300  
 20

gag gga tgg aag aca gtg gaa atg tat cca gcc tac aca gag gaa gag 960  
 Glu Gly Trp Lys Thr Val Glu Met Tyr Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu  
 305 310 315 320  
 25

ctg aag cgt ttt gaa gag gag ctt gct gcc cgg gag gct gag cta aat 1008  
 Leu Lys Arg Phe Glu Glu Glu Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn  
 325 330 335  
 30

gcc aga gcc cag cgc ctc agc cag gag aca gag gcc ctg ggg cgc tcc 1056  
 Ala Arg Ala Gln Arg Leu Ser Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser  
 340 345 350  
 35

cag gac cgc cta gag gct cag aag aga gag ctg cag cag gcc gtt ctg 1104  
 Gln Asp Arg Leu Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu  
 355 360 365  
 40

cag atg gag caa agg aag cag caa cag caa gag cag agc gct ccg cct 1152  
 45

50

Gln Met Glu Gln Arg Lys Gln Gln Gln Gln Glu Gln Ser Ala Pro Pro  
 370 375 380

5 tcc caa cct gat ggg cag ctg cag ttc cgt gca gac aca ggg gat gct 1200  
 Ser Gln Pro Asp Gly Gln Leu Gln Phe Arg Ala Asp Thr Gly Asp Ala  
 385 390 395 400

10 cct gtc cca gct cca gca ggt gac cag aaa gac gtg cct gct tct gaa 1248  
 Pro Val Pro Ala Pro Ala Gly Asp Gln Lys Asp Val Pro Ala Ser Glu  
 405 410 415

15 aag aag gtt cca gag cag ccc cct gtg ctg cca cag ctg gat tct cag 1296  
 Lys Lys Val Pro Glu Gln Pro Pro Val Leu Pro Gln Leu Asp Ser Gln  
 420 425 430

20 cat tta taa 1305  
 His Leu

25

<210> 90  
 <211> 434  
 30 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

35

<400> 90  
 Val Pro Val Asp Arg Ala Ala Pro His Gln Glu Asp Asn Gln Ala Thr  
 1 5 10 15

40

Glu Thr Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val  
 20 25 30

45

50

Ile Asn Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
 35 40 45

5

Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys Ser Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu Asp  
 50 55 60

10

Phe Val Ser His Asn Val Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln  
 65 70 75 80

15

Glu Val Ser Arg Leu Arg Met Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Lys  
 85 90 95

20

Gln Glu Pro Asn Leu Gln Val Asp His Met Asn Leu Leu Lys Gln Phe  
 100 105 110

25

Glu His Leu Asp Pro Gln Asn Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu  
 115 120 125

30

Glu Leu Leu Ile Gln Thr Ala Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala  
 130 135 140

35

Ala His His Glu Glu Phe Lys Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu  
 145 150 155 160

40

45

50

Arg Arg Arg Tyr Leu Glu Ser Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala  
 165 170 175

5

Glu Arg Lys Leu Gln Glu Gln Gln Arg Arg His Arg Glu His Pro Lys  
 180 185 190

10

Val Asn Val Pro Gly Ser Gln Ala Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu  
 195 200 205

15

Leu Asp Gly Leu Asp Pro Asn Arg Phe Asn Pro Lys Thr Phe Phe Ile  
 210 215 220

20

Leu His Asp Ile Asn Ser Asp Gly Val Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu  
 225 230 235 240

25

Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu  
 245 250 255

30

Glu Asp Asp Met Arg Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu  
 260 265 270

35

His Val Met Lys Asn Val Asp Thr Asn Gln Asp Arg Leu Val Thr Leu  
 275 280 285

40

45

50

Glu Glu Phe Leu Ala Ser Thr Gln Arg Lys Glu Phe Gly Glu Thr Ala  
 290 295 300

5

Glu Gly Trp Lys Thr Val Glu Met Tyr Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu  
 305 310 315 320

10

Leu Lys Arg Phe Glu Glu Glu Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn  
 325 330 335

15

Ala Arg Ala Gln Arg Leu Ser Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser  
 340 345 350

20

Gln Asp Arg Leu Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu  
 355 360 365

25

Gln Met Glu Gln Arg Lys Gln Gln Gln Gln Glu Gln Ser Ala Pro Pro  
 370 375 380

30

Ser Gln Pro Asp Gly Gln Leu Gln Phe Arg Ala Asp Thr Gly Asp Ala  
 385 390 395 400

35

Pro Val Pro Ala Pro Ala Gly Asp Gln Lys Asp Val Pro Ala Ser Glu  
 405 410 415

40

45

50



Lys Lys Val Pro Glu Gln Pro Pro Val Leu Pro Gln Leu Asp Ser Gln  
 420 425 430

5

His Leu

10

<210> 91

<211> 1380

<212> DNA

15

<213> Mus musculus

<220>

20

<221> CDS

<222> (1)..(1380)

<223>

25

<400> 91

atg cct acc tcg gtg ccc cgc ggg gcc cct ttt ctt ctc cta cca cct 48

Met Pro Thr Ser Val Pro Arg Gly Ala Pro Phe Leu Leu Leu Pro Pro

1 5 10 15

30

cta ctg atg ctg tct gct gtg ctg gca gtg ccc gtg gac cgc gca gca 96

Leu Leu Met Leu Ser Ala Val Leu Ala Val Pro Val Asp Arg Ala Ala

35

20 25 30

cct cct cag gag gac agc cag gcc act gag acc ccg gac acg ggc ctg 144

Pro Pro Gln Glu Asp Ser Gln Ala Thr Glu Thr Pro Asp Thr Gly Leu

40

35 40 45

tac tac cac cgg tac ctc cag gag gtc atc aac gtg cta gag aca gat 192

Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asn Val Leu Glu Thr Asp

45

50 55 60

50

5  
 ggg cac ttc cgg gag aag ctg cag gct gcc aac gct gag gac att aag 240  
 Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys  
 65 70 75 80

10  
 agt gga aag ctg agc caa gag ctg gac ttc gtc agc cac aac gtc cga 288  
 Ser Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu Asp Phe Val Ser His Asn Val Arg  
 85 90 95

15  
 acc aag ctg gat gag ctc aag cga cag gag gtg tcg agg ctg cgg atg 336  
 Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Ser Arg Leu Arg Met  
 100 105 110

20  
 ctg ctc aag gcc aag atg gat gca aag cag gag ccc aac ttg cag gtg 384  
 Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Lys Gln Glu Pro Asn Leu Gln Val  
 115 120 125

25  
 gac cac atg aac ctc ctg aag cag ttt gag cac ctg gac cct cag aac 432  
 Asp His Met Asn Leu Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asp Pro Gln Asn  
 130 135 140

30  
 cag cac acg ttt gag gct cgg gac cta gag ctg ctg atc cag acg gcc 480  
 Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu Glu Leu Leu Ile Gln Thr Ala  
 145 150 155 160

35  
 acc cga gac ctc gcc cag tat gac gct gca cac cat gaa gag ttc aaa 528  
 Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala Ala His His Glu Glu Phe Lys  
 165 170 175

40  
 cgc tac gag atg ctc aag gaa cat gag agg aga cga tac ctg gag tct 576  
 Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu Arg Arg Arg Tyr Leu Glu Ser  
 180 185 190

45  
  
 50

ctg gga gag gag cag cgg aag gag gcc gag agg aag ctc caa gag caa 624  
 Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala Glu Arg Lys Leu Gln Glu Gln  
 195 200 205  
 5  
 cag cgc aga cac cgg gaa cac ccc aaa gtc aat gtt cct ggc agc caa 672  
 Gln Arg Arg His Arg Glu His Pro Lys Val Asn Val Pro Gly Ser Gln  
 210 215 220  
 10  
 gcc cag ttg aag gag gtg tgg gag gag ttg gat gga ttg gac ccc aac 720  
 Ala Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Leu Asp Gly Leu Asp Pro Asn  
 225 230 235 240  
 15  
 agg ttc aac ccc aag acc ttc ttc ata ctg cat gac atc aac agt gat 768  
 Arg Phe Asn Pro Lys Thr Phe Phe Ile Leu His Asp Ile Asn Ser Asp  
 245 250 255  
 20  
 ggt gtc cta gat gag caa gaa ctg gaa gct ctc ttt acc aag gag ctg 816  
 Gly Val Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu  
 260 265 270  
 25  
 gag aag gtg tat gac ccg aag aat gag gag gat gac atg aga gag atg 864  
 Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu Glu Asp Asp Met Arg Glu Met  
 275 280 285  
 30  
 gag gaa gaa cgg ctt cgc atg cgg gag cac gtg atg aag aat gtg gac 912  
 Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val Met Lys Asn Val Asp  
 290 295 300  
 35  
 acc aac cag gac cgg ctt gtg acc ctg gag gag ttc ctg gca tcc acc 960  
 Thr Asn Gln Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Ala Ser Thr  
 305 310 315 320  
 40  
 cag agg aag gag ttc ggg gac act ggg gag ggg tgg aag aca gtg gaa 1008  
 45  
 50

Gln Arg Lys Glu Phe Gly Asp Thr Gly Glu Gly Trp Lys Thr Val Glu  
 325 330 335

5 atg tcc oca gcc tac aca gag gag gag ctg aag cgt ttt gaa gag gag 1056  
 Met Ser Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu Leu Lys Arg Phe Glu Glu Glu  
 340 345 350

10 ctg gct gcc cgg gaa gct gag ctg aat gcc agg gcc cag cgc ctc agc 1104  
 Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn Ala Arg Ala Gln Arg Leu Ser  
 355 360 365

15 cag gag aca gag gcc ctg ggg cgc tcc cag gac cgc ctg gag gca cag 1152  
 Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser Gln Asp Arg Leu Glu Ala Gln  
 370 375 380

20 aag aga gag ctg cag cag gct gtt ctg cag atg gag cag agg aag cag 1200  
 Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu Gln Met Glu Gln Arg Lys Gln  
 25 385 390 395 400

30 caa ctg caa gaa cag agc gct ccg cct tcc aaa cct gac ggg cag ctg 1248  
 Gln Leu Gln Glu Gln Ser Ala Pro Pro Ser Lys Pro Asp Gly Gln Leu  
 405 410 415

35 cag ttc cgt gca gac aca gat gac gct cct gtc cca gct cca gca ggt 1296  
 Gln Phe Arg Ala Asp Thr Asp Asp Ala Pro Val Pro Ala Pro Ala Gly  
 420 425 430

40 gac cag aaa gat gtg cct gct tct gag aag aag gtc cca gag cag ccc 1344  
 Asp Gln Lys Asp Val Pro Ala Ser Glu Lys Lys Val Pro Glu Gln Pro  
 435 440 445

45 cct gag ctg cca cag ctg gat tcc cag cat tta taa 1380

50

Pro Glu Leu Pro Gln Leu Asp Ser Gln His Leu

450

455

5

<210> 92

<211> 459

10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 92

15

Met Pro Thr Ser Val Pro Arg Gly Ala Pro Phe Leu Leu Leu Pro Pro

1

5

10

15

20

Leu Leu Met Leu Ser Ala Val Leu Ala Val Pro Val Asp Arg Ala Ala

20

25

30

25

Pro Pro Gln Glu Asp Ser Gln Ala Thr Glu Thr Pro Asp Thr Gly Leu

35

40

45

30

Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asn Val Leu Glu Thr Asp

50

55

60

35

Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys

65

70

75

80

40

Ser Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu Asp Phe Val Ser His Asn Val Arg

85

90

95

45

50

Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Ser Arg Leu Arg Met  
 100 105 110

5

Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Lys Gln Glu Pro Asn Leu Gln Val  
 115 120 125

10

Asp His Met Asn Leu Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asp Pro Gln Asn  
 130 135 140

15

Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu Glu Leu Leu Ile Gln Thr Ala  
 145 150 155 160

20

Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala Ala His His Glu Glu Phe Lys  
 165 170 175

25

Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu Arg Arg Arg Tyr Leu Glu Ser  
 180 185 190

30

Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala Glu Arg Lys Leu Gln Glu Gln  
 195 200 205

35

Gln Arg Arg His Arg Glu His Pro Lys Val Asn Val Pro Gly Ser Gln  
 210 215 220

40

45

50

RU 2 418 002 C2

Ala Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Leu Asp Gly Leu Asp Pro Asn  
 225 230 235 240

5

Arg Phe Asn Pro Lys Thr Phe Phe Ile Leu His Asp Ile Asn Ser Asp  
 245 250 255

10

Gly Val Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu  
 260 265 270

15

Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu Glu Asp Asp Met Arg Glu Met  
 275 280 285

20

Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val Met Lys Asn Val Asp  
 290 295 300

25

Thr Asn Gln Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Ala Ser Thr  
 305 310 315 320

30

Gln Arg Lys Glu Phe Gly Asp Thr Gly Glu Gly Trp Lys Thr Val Glu  
 325 330 335

35

Met Ser Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu Leu Lys Arg Phe Glu Glu Glu  
 340 345 350

40

45

50

Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn Ala Arg Ala Gln Arg Leu Ser  
 355 360 365

5

Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser Gln Asp Arg Leu Glu Ala Gln  
 370 375 380

10

Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu Gln Met Glu Gln Arg Lys Gln  
 385 390 395 400

15

Gln Leu Gln Glu Gln Ser Ala Pro Pro Ser Lys Pro Asp Gly Gln Leu  
 405 410 415

20

Gln Phe Arg Ala Asp Thr Asp Asp Ala Pro Val Pro Ala Pro Ala Gly  
 420 425 430

25

Asp Gln Lys Asp Val Pro Ala Ser Glu Lys Lys Val Pro Glu Gln Pro  
 435 440 445

30

Pro Glu Leu Pro Gln Leu Asp Ser Gln His Leu  
 450 455

35

40

<210> 93  
 <211> 1305  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

45

50



<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1305)

5

<223>

<400> 93

10 gtg ccc gtg gac cgc gca gca cct cct cag gag gac agc cag gcc act 48  
 Val Pro Val Asp Arg Ala Ala Pro Pro Gln Glu Asp Ser Gln Ala Thr  
 1 5 10 15

15 gag acc ccg gac acg ggc ctg tac tac cac cgg tac ctc cag gag gtc 96  
 Glu Thr Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val  
 20 25 30

20 atc aac gtg cta gag aca gat ggg cac ttc cgg gag aag ctg cag gct 144  
 Ile Asn Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
 35 40 45

25 gcc aac gct gag gac att aag agt gga aag ctg agc caa gag ctg gac 192  
 Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys Ser Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu Asp  
 50 55 60

30 ttc gtc agc cac aac gtc cga acc aag ctg gat gag ctc aag cga cag 240  
 Phe Val Ser His Asn Val Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln  
 35 65 70 75 80

40 gag gtg tcg agg ctg cgg atg ctg ctc aag gcc aag atg gat gca aag 288  
 Glu Val Ser Arg Leu Arg Met Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Lys  
 85 90 95

45 cag gag ccc aac ttg cag gtg gac cac atg aac ctc ctg aag cag ttt 336  
 Gln Glu Pro Asn Leu Gln Val Asp His Met Asn Leu Leu Lys Gln Phe  
 100 105 110

50

gag cac ctg gac cct cag aac cag cac acg ttt gag gct cgg gac cta 384  
 Glu His Leu Asp Pro Gln Asn Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu  
 115 120 125  
 5  
 gag ctg ctg atc cag acg gcc acc cga gac ctc gcc cag tat gac gct 432  
 Glu Leu Leu Ile Gln Thr Ala Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala  
 10 130 135 140  
 gca cac cat gaa gag ttc aaa cgc tac gag atg ctc aag gaa cat gag 480  
 Ala His His Glu Glu Phe Lys Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu  
 15 145 150 155 160  
 agg aga cga tac ctg gag tot ctg gga gag gag cag cgg aag gag gcc 528  
 Arg Arg Arg Tyr Leu Glu Ser Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala  
 20 165 170 175  
 gag agg aag ctc caa gag caa cag cgc aga cac cgg gaa cac ccc aaa 576  
 Glu Arg Lys Leu Gln Glu Gln Gln Arg Arg His Arg Glu His Pro Lys  
 25 180 185 190  
 gtc aat gtt cct ggc agc caa gcc cag ttg aag gag gtg tgg gag gag 624  
 Val Asn Val Pro Gly Ser Gln Ala Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu  
 30 195 200 205  
 ttg gat gga ttg gac ccc aac agg ttc aac ccc aag acc ttc ttc ata 672  
 Leu Asp Gly Leu Asp Pro Asn Arg Phe Asn Pro Lys Thr Phe Phe Ile  
 35 210 215 220  
 ctg cat gac atc aac agt gat ggt gtc cta gat gag caa gaa ctg gaa 720  
 Leu His Asp Ile Asn Ser Asp Gly Val Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu  
 40 225 230 235 240  
 45  
 50

|    |   |      |
|----|---|------|
|    | gct ctc ttt acc aag gag ctg gag aag gtg tat gac ccg aag aat gag | 768  |
|    | Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu |      |
|    | 245 250 255   |      |
| 5  |   |      |
|    | gag gat gac atg aga gag atg gag gaa gaa cgg ctt cgc atg cgg gag | 816  |
|    | Glu Asp Asp Met Arg Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu |      |
|    | 260 265 270   |      |
| 10 |   |      |
|    | cac gtg atg aag aat gtg gac acc aac cag gac cgg ctt gtg acc ctg | 864  |
|    | His Val Met Lys Asn Val Asp Thr Asn Gln Asp Arg Leu Val Thr Leu |      |
|    | 275 280 285   |      |
| 15 |   |      |
|    | gag gag ttc ctg gca tcc acc cag agg aag gag ttc ggg gac act ggg | 912  |
|    | Glu Glu Phe Leu Ala Ser Thr Gln Arg Lys Glu Phe Gly Asp Thr Gly |      |
|    | 290 295 300   |      |
| 20 |   |      |
|    | gag ggg tgg aag aca gtg gaa atg tcc cca gcc tac aca gag gag gag | 960  |
|    | Glu Gly Trp Lys Thr Val Glu Met Ser Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu |      |
|    | 305 310 315 320   |      |
| 25 |   |      |
|    | ctg aag cgt ttt gaa gag gag ctg gct gcc cgg gaa gct gag ctg aat | 1008 |
|    | Leu Lys Arg Phe Glu Glu Glu Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn |      |
|    | 325 330 335   |      |
| 30 |   |      |
|    | gcc agg gcc cag cgc ctc agc cag gag aca gag gcc ctg ggg cgc tcc | 1056 |
|    | Ala Arg Ala Gln Arg Leu Ser Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser |      |
|    | 340 345 350   |      |
| 35 |   |      |
|    | cag gac cgc ctg gag gca cag aag aga gag ctg cag cag gct gtt ctg | 1104 |
|    | Gln Asp Arg Leu Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu |      |
|    | 355 360 365   |      |
| 40 |   |      |
|    | cag atg gag cag agg aag cag caa ctg caa gaa cag agc gct ccg cct | 1152 |
|    |   |      |
| 45 |   |      |
|    |   |      |
| 50 |   |      |

Gln Met Glu Gln Arg Lys Gln Gln Leu Gln Glu Gln Ser Ala Pro Pro

370 375 380

5 tcc aaa cct gac ggg cag ctg cag ttc cgt gca gac aca gat gac gct 1200

Ser Lys Pro Asp Gly Gln Leu Gln Phe Arg Ala Asp Thr Asp Asp Ala

385 390 395 400

10 cct gtc cca gct cca gca ggt gac cag aaa gat gtg cct gct tct gag 1248

Pro Val Pro Ala Pro Ala Gly Asp Gln Lys Asp Val Pro Ala Ser Glu

405 410 415

15 aag aag gtc cca gag cag ccc cct gag ctg cca cag ctg gat tcc cag 1296

Lys Lys Val Pro Glu Gln Pro Pro Glu Leu Pro Gln Leu Asp Ser Gln

420 425 430

20 cat tta taa 1305

His Leu

25

30 <210> 94

<211> 434

<212> PRT

<213> Mus musculus

35

<400> 94

40 Val Pro Val Asp Arg Ala Ala Pro Pro Gln Glu Asp Ser Gln Ala Thr

1 5 10 15

45 Glu Thr Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val

20 25 30

50

Ile Asn Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
 35 40 45

5

Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys Ser Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu Asp  
 50 55 60

10

Phe Val Ser His Asn Val Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln  
 65 70 75 80

15

Glu Val Ser Arg Leu Arg Met Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Lys  
 85 90 95

20

Gln Glu Pro Asn Leu Gln Val Asp His Met Asn Leu Leu Lys Gln Phe  
 100 105 110

25

Glu His Leu Asp Pro Gln Asn Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu  
 115 120 125

30

Glu Leu Leu Ile Gln Thr Ala Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala  
 130 135 140

35

Ala His His Glu Glu Phe Lys Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu  
 145 150 155 160

40

45

50

RU 2418002 C2

Arg Arg Arg Tyr Leu Glu Ser Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala  
 165 170 175

5

Glu Arg Lys Leu Gln Glu Gln Gln Arg Arg His Arg Glu His Pro Lys  
 180 185 190

10

Val Asn Val Pro Gly Ser Gln Ala Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu  
 195 200 205

15

Leu Asp Gly Leu Asp Pro Asn Arg Phe Asn Pro Lys Thr Phe Phe Ile  
 210 215 220

20

Leu His Asp Ile Asn Ser Asp Gly Val Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu  
 225 230 235 240

25

Ala Leu Phe Thr Lys Glu Leu Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu  
 245 250 255

30

Glu Asp Asp Met Arg Glu Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu  
 260 265 270

35

His Val Met Lys Asn Val Asp Thr Asn Gln Asp Arg Leu Val Thr Leu  
 275 280 285

40

45

50

Glu Glu Phe Leu Ala Ser Thr Gln Arg Lys Glu Phe Gly Asp Thr Gly  
 290 295 300

5

Glu Gly Trp Lys Thr Val Glu Met Ser Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu  
 305 310 315 320

10

Leu Lys Arg Phe Glu Glu Glu Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn  
 325 330 335

15

Ala Arg Ala Gln Arg Leu Ser Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser  
 340 345 350

20

Gln Asp Arg Leu Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu  
 355 360 365

25

Gln Met Glu Gln Arg Lys Gln Gln Leu Gln Glu Gln Ser Ala Pro Pro  
 370 375 380

30

Ser Lys Pro Asp Gly Gln Leu Gln Phe Arg Ala Asp Thr Asp Asp Ala  
 385 390 395 400

35

Pro Val Pro Ala Pro Ala Gly Asp Gln Lys Asp Val Pro Ala Ser Glu  
 405 410 415

40

45

50

Lys Lys Val Pro Glu Gln Pro Pro Glu Leu Pro Gln Leu Asp Ser Gln

420

425

430

5

His Leu

10

<210> 95

<211> 77

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<400> 95

20

Val Pro Leu Glu Arg Gly Ala Pro Asn Lys Glu Glu Thr Pro Ala Thr

1

5

10

15

25

Glu Ser Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val

20

25

30

30

Ile Asp Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala

35

40

45

35

Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys Ser Gly Lys Leu Ser Arg Glu Leu Asp

50

55

60

40

Phe Val Ser His His Val Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu

65

70

75

45

50



<210> 96  
 <211> 77  
 <212> PRT  
 5 <213> Rattus norvegicus

<400> 96

10 Val Pro Val Asp Arg Ala Ala Pro His Gln Glu Asp Asn Gln Ala Thr  
 1 5 10 15

15 Glu Thr Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val  
 20 25 30

20 Ile Asn Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
 35 40 45

25 Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys Ser Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu Asp  
 50 55 60

30 Phe Val Ser His Asn Val Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu  
 35 65 70 75

<210> 97  
 40 <211> 77  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

45

50

<400> 97

5 Val Pro Val Asp Arg Ala Ala Pro Pro Gln Glu Asp Ser Gln Ala Thr  
1 5 10 15

10 Glu Thr Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val  
20 25 30

15 Ile Asn Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
35 40 45

20 Ala Asn Ala Glu Asp Ile Lys Ser Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu Asp  
50 55 60

25 Phe Val Ser His Asn Val Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu  
65 70 75

30

<210> 98

<211> 231

35 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 98

40 gtccccctgg agcgaggggc gcccaacaag gaggagaccc ctgcgactga gagtcccgac 60

acaggcctgt actaccaccg gtacctccag gaggatcatg atgtactgga gacggatggg 120

45 catttccgag agaagctgca ggctgccaat gcgaggaca tcaagagcgg gaagctgagc 180

50

cgagagctgg actttgtcag ccaccacgtc cgcaccaagc tggatgagct c 231

5

<210> 99

<211> 231

<212> DNA

10

<213> Rattus norvegicus

<400> 99

15

gtgcctgtgg accgcgagc acctcatcag gaggacaacc aggccactga gaccccggac 60

acaggcctgt actaccatcg gtacctccag gaggatcatca acgtgctaga gacagatggg 120

20

cacttccggg agaagctgca agctgccaac gctgaggaca ttaagagtgg aaagctgagt 180

caagagctgg acttcgtcag ccacaacgtc cgcaccaagc tggatgagct c 231

25

<210> 100

<211> 231

<212> DNA

30

<213> Mus musculus

<400> 100

35

gtgcccgtgg accgcgagc acctcctcag gaggacagcc aggccactga gaccccggac 60

acgggctgt actaccaccg gtacctccag gaggatcatca acgtgctaga gacagatggg 120

40

cacttccggg agaagctgca ggtgccaac gctgaggaca ttaagagtgg aaagctgagc 180

caagagctgg acttcgtcag ccacaacgtc cgaaccaagc tggatgagct c 231

45

50

<210> 101  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 101  
 10  
 Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asp  
 1                    5                    10                    15  
  
 15  
 Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
                   20                    25                    30  
  
 20  
  
 <210> 102  
 <211> 30  
 25 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
  
 <400> 102  
 30  
 Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asn  
 1                    5                    10                    15  
  
 35  
 Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
                   20                    25                    30  
  
 40  
  
 <210> 103  
 <211> 30  
 45  
  
 50

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 103

Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asn  
 10 1 5 10 15

Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
 15 20 25 30

20 <210> 104

<211> 90

<212> DNA

<213> Homo sapiens

25 <400> 104

cccgcacag gcctgtacta ccaccggtac ctccaggagg tcatcgatgt actggagacg 60

30 gatgggcatt tccgagagaa gctgcaggct 90

35 <210> 105

<211> 90

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

40 <400> 105

ccggacacag gcctgtacta ccacggtac ctccaggagg tcatcaacgt gctagagaca 60

45 gatgggcact tccgggagaa gctgcaagct 90

50

5  
 <210> 106  
 <211> 90  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

10  
 <400> 106  
 ccggacacgg gcctgtacta ccaccggtac ctccaggagg tcatcaacgt gctagagaca 60  
 gatgggcaact tccgggagaa gctgcaggct 90

15  
 <210> 107  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20  
 <400> 107  
 25  
 Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asp  
 1 5 10 15

30  
 <210> 108  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40  
 <400> 108  
 Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
 1 5 10

45

50

5  
 <210> 109  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10  
 <400> 109  
 Gln Glu Val Ile Asp Val Leu Glu Thr Asp  
 1 5 10

15  
 <210> 110  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

25  
 <400> 110  
 Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asn  
 1 5 10 15

30  
 <210> 111  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

40  
 <400> 111  
 Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
 1 5 10

45

50

5  
<210> 112  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Rattus norvegicus

10  
<400> 112  
  
Gln Glu Val Ile Asn Val Leu Glu Thr Asp  
1                   5                   10

15  
  
<210> 113  
<211> 16  
<212> PRT  
20  
<213> Mus musculus

25  
<400> 113  
  
Pro Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asn  
1                   5                   10                   15

30  
  
<210> 114  
<211> 14  
<212> PRT  
35  
<213> Mus musculus

40  
<400> 114  
  
Val Leu Glu Thr Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala  
1                   5                   10

45

50



5  
 <210> 115  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 115  
 10  
 Gln Glu Val Ile Asn Val Leu Glu Thr Asp  
 1 5 10

15  
 <210> 116  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 20  
 <213> Homo sapiens

<400> 116  
 25 cccgacacag gctgtacta ccaccggtac ctccaggagg tcatcgat 48

30  
 <210> 117  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

35  
 <400> 117  
 gtactggaga cggatgggca tttccgagag aagctgcagg ct 42

40  
 <210> 118  
 <211> 30

45

50

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5

<400> 118

caggagggtca tcgatgtact ggagacggat

30

10

<210> 119

<211> 48

<212> DNA

15

<213> Rattus norvegicus

<400> 119

ccggacacag gctgtacta ccatcggtac ctccaggagg tcatcaac

20

48

<210> 120

25

<211> 42

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

30

<400> 120

gtgctagaga cagatgggca cttccgggag aagctgcaag ct

42

35

<210> 121

<211> 30

<212> DNA

40

<213> Rattus norvegicus

<400> 121

caggagggtca tcaacgtgct agagacagat

45

30

50

<210> 122  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 5 <213> Mus musculus

<400> 122  
 10 ccggacacgg gcctgtacta ccaccggtac ctccaggagg tcatcaac 48

<210> 123  
 15 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

20 <400> 123  
 gtgctagaga cagatgggca cttccgggag aagctgcagg ct 42

25 <210> 124  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 30 <213> Mus musculus

<400> 124  
 35 caggaggtca tcaacgtgct agagacagat 30

#### Формула изобретения

1. Способ получения фактора, связанного с контролем над потреблением пищи  
 40 и/или массой тела, содержащий следующие этапы:

воздействие соединения тиазолидиндиона, имеющего PPAR $\gamma$ -агонистическую  
 активность, на клетку млекопитающего, и

45 получение генов, экспрессия которых индуцирована указанным соединением, и  
 селекция и идентификация гена, кодирующего белок, содержащий сигнальный  
 пептид из указанных полученных генов.

2. Полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, указанной в  
 любой из SEQ ID NO: 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 или 107-115, обладающий  
 активностью подавления потребления пищи и/или подавления прибавления в весе.

50 3. Полипептид по п.2, в котором аминокислотная последовательность указана в  
 любой из SEQ ID NO: 13-15.

4. Полипептид по п.3, в котором, по меньшей мере, один аминокислотный остаток  
 химически модифицирован соединением или пептидом.

5. Полипептид, имеющий активность подавления потребления пищи и/или подавления прибавления в весе, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую гомологию, по меньшей мере, в 80% с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115.

6. Полипептид по п.5, который состоит из аминокислотной последовательности, имеющей гомологию, по меньшей мере, в 80% с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 13-15.

7. Полипептид по п.5, где указанная активность подавления прибавления в весе является активностью подавления прибавления телесного жира.

8. Полипептид по п.6, в котором, по меньшей мере, один аминокислотный остаток химически модифицирован соединением или пептидом.

9. Фрагмент полипептида по п.5, обладающий активностью подавления потребления пищи и/или подавления прибавления в весе, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 39-41, 65-73, 101-103 или 107-115.

10. Фрагмент полипептида по п.9, в котором, по меньшей мере, один аминокислотный остаток химически модифицирован соединением или пептидом.

11. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, указанный в любом из пп.2, 5 и 7, где полипептид обладает активностью подавления потребления пищи и/или подавления прибавления в весе.

12. Молекула нуклеиновой кислоты, состоящая из нуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 или 116-124, кодирующая полипептид, обладающий активностью подавления потребления пищи и/или подавления прибавления в весе.

13. Молекула нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 18-20, 44-46, 74-82, 104-106, или 116-124, или ее частичной последовательностью при очень строгих условиях, и которая кодирует полипептид, имеющий активность подавления потребления пищи и/или подавления прибавления в весе.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.11-13, где указанная активность подавления прибавления в весе является активностью подавления прибавления телесного жира.

15. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.11-14.

16. Трансформант, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.11-14, экспрессирующий полипептид, обладающий активностью подавления потребления пищи и/или подавления прибавления в весе.

17. Фармацевтическая композиция для подавления потребления пищи и/или подавления прибавления в весе, содержащая полипептид по любому из пп.2, 5 и 7 или его фрагмент, сохраняющий свойства полипептида по любому из пп.2, 5 и 7, вектор по п.15 или трансформант по п.16, в качестве активного ингредиента.

18. Фармацевтическая композиция по п.17, в которой указанная активность подавления прибавления в весе является активностью подавления прибавления телесного жира.

19. Антитело против полипептида по любому из пп.2, 5 и 7.

20. Способ получения полипептида по любому из пп.2, 5 и 7, включающий следующие стадии (a) или (b):

(a) культивирование трансформанта по п.16 и извлечение продуцированного полипептида из трансформанта; или

(b) осуществление способа пептидного синтеза.

5 21. Аналитический способ прогнозирования или диагностики состояния повышенного потребления пищи или повышенного прибавления в весе, содержащий стадию:

обнаружения содержащегося количества молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, или полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115, в биологическом образце из млекопитающего; и прогнозирования или диагностики, что млекопитающее находится в состоянии 15 повышенного потребления пищи или повышенного прибавления в весе, когда указанное обнаруженное количество является более низким по сравнению с количеством, содержащимся в биологическом образце, полученном от нормального индивидуума.

22. Набор реактивов для применения в аналитическом способе по п.21, 20 содержащий:

по меньшей мере, один из: праймера для ПЦР, зонда или ДНК-чипа для обнаружения молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124; или антитело, распознающее полипептид, содержащий 25 аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 или 107-115, стандартный пептид, или модифицированный пептид для конкурентной реакции связывания.

23. Способ скрининга терапевтического или профилактического агента, 30 обладающего подавляющим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, содержащий следующие стадии:

приведение в контакт исследуемого вещества с клеткой млекопитающего, и обнаружение повышенной экспрессии гена в указанной клетке, содержащего нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 35 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, или повышенного количества полипептида, содержащегося внутриклеточно в указанной клетке или секретированного внеклеточно, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115.

40 24. Способ скрининга терапевтического или профилактического агента, обладающего подавляющим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, содержащий следующие стадии:

введение исследуемого вещества млекопитающему и обнаружение повышенной экспрессии гена, содержащего нуклеотидную 45 последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 или 116-124, или повышенной продукции полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 или 107-115, в биологическом образце из указанного 50 исследуемого животного.

25. Способ скрининга терапевтического или профилактического агента, обладающего подавляющим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, содержащий следующие стадии:

5 введение исследуемого вещества нокаутированному животному, не являющемуся человеком, в котором вся область или часть гена, содержащего нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 74-82, 104-106 и 116-124, была удалена, и обнаружение подавления потребления пищи или прибавления в весе у указанного животного, не являющегося человеком.

26. Терапевтический или профилактический агент, обладающий подавляющим действием в отношении потребления пищи и/или прибавления в весе, полученный в соответствии со способом по любому из пп.23-25.

10 27. Фармацевтическая композиция для подавления потребления пищи и/или подавления прибавления в весе, содержащая:

полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 13-15, 39-41, 65-73, 101-103 и 107-115, или его фрагмент, сохраняющий свойства полипептида по любому из пп.2, 5 и 7; или

15 вектор или трансформант, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 10-12, 18-20, 44-46, 65-73, 74-82, 104-106 или 116-124 в качестве активного ингредиента.

20

25

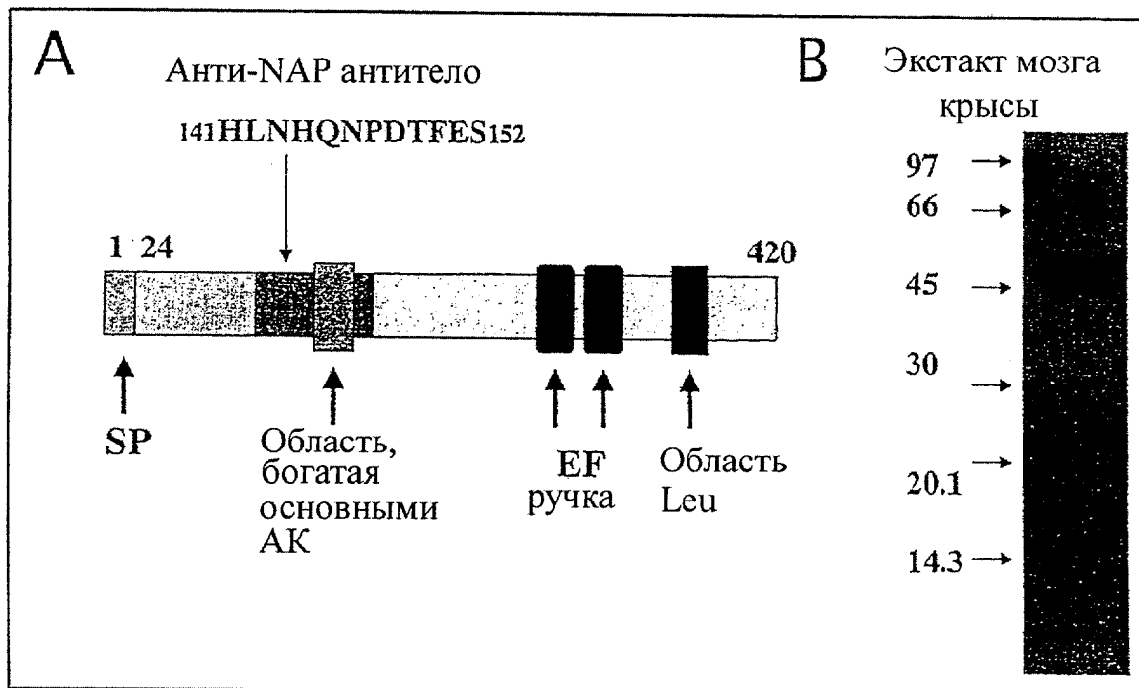
30

35

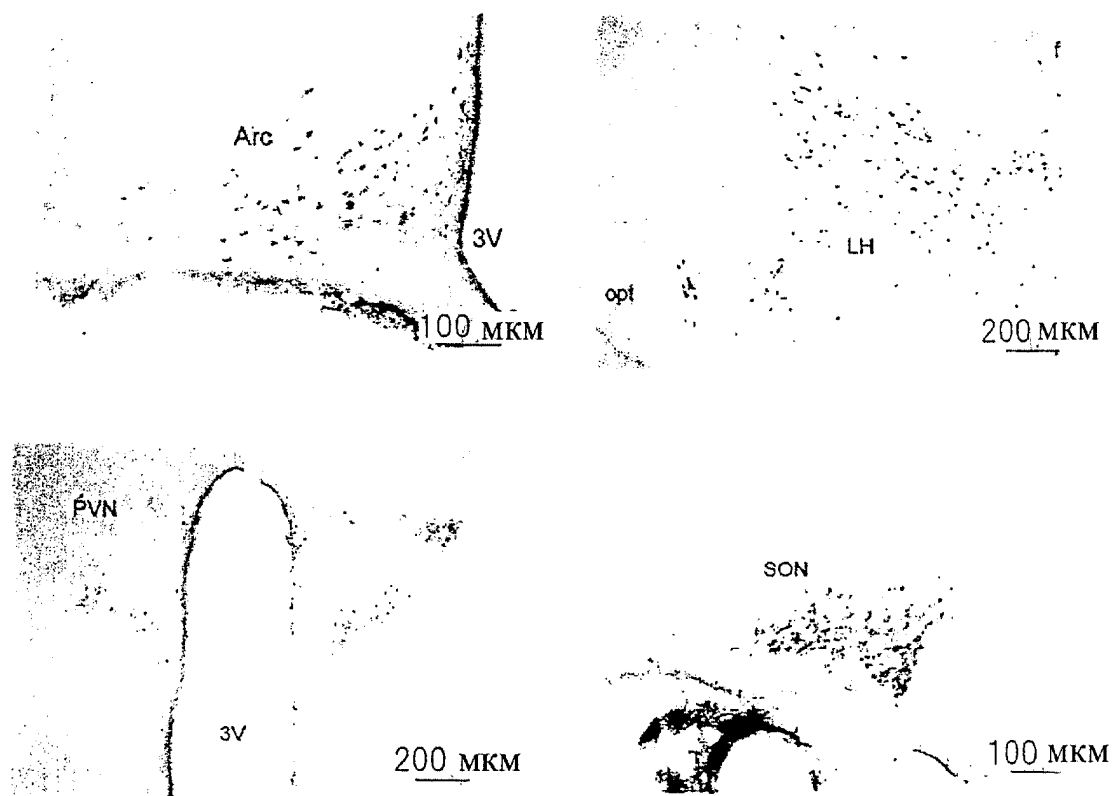
40

45

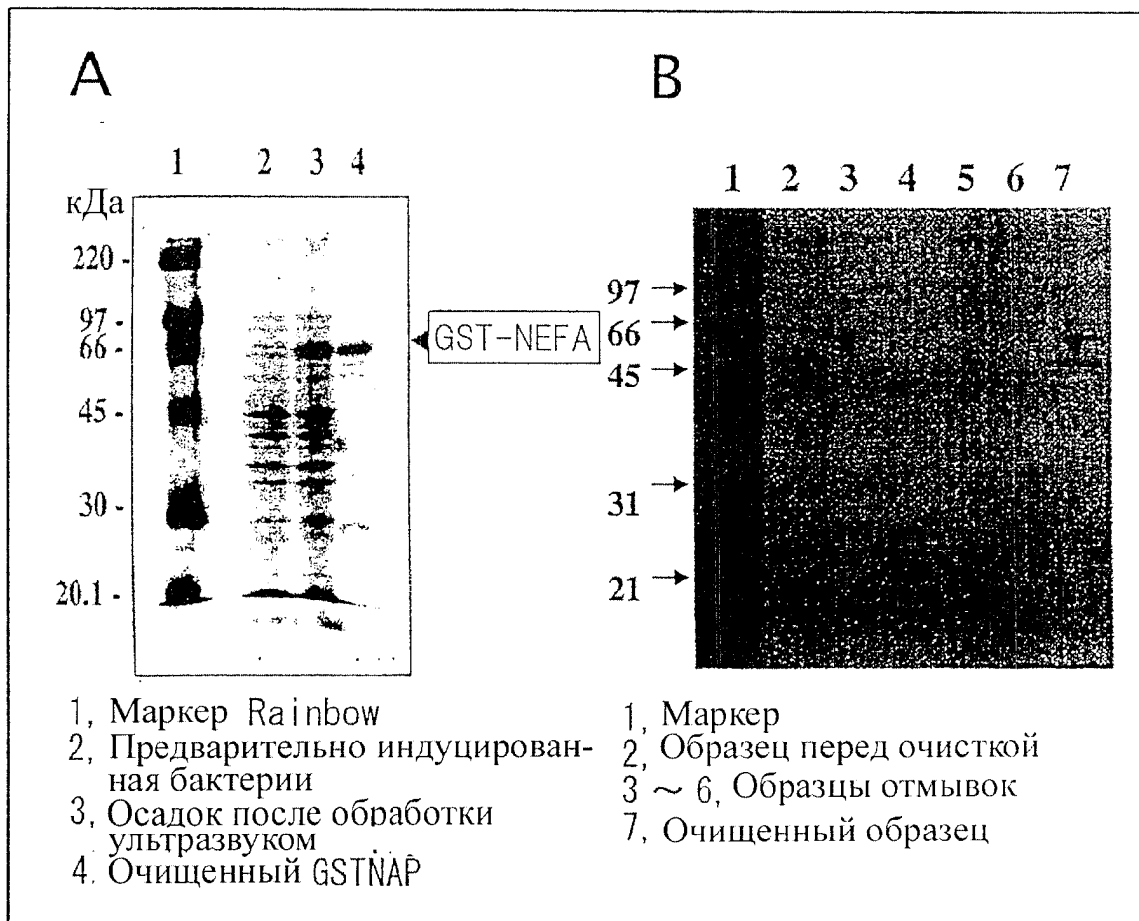
50



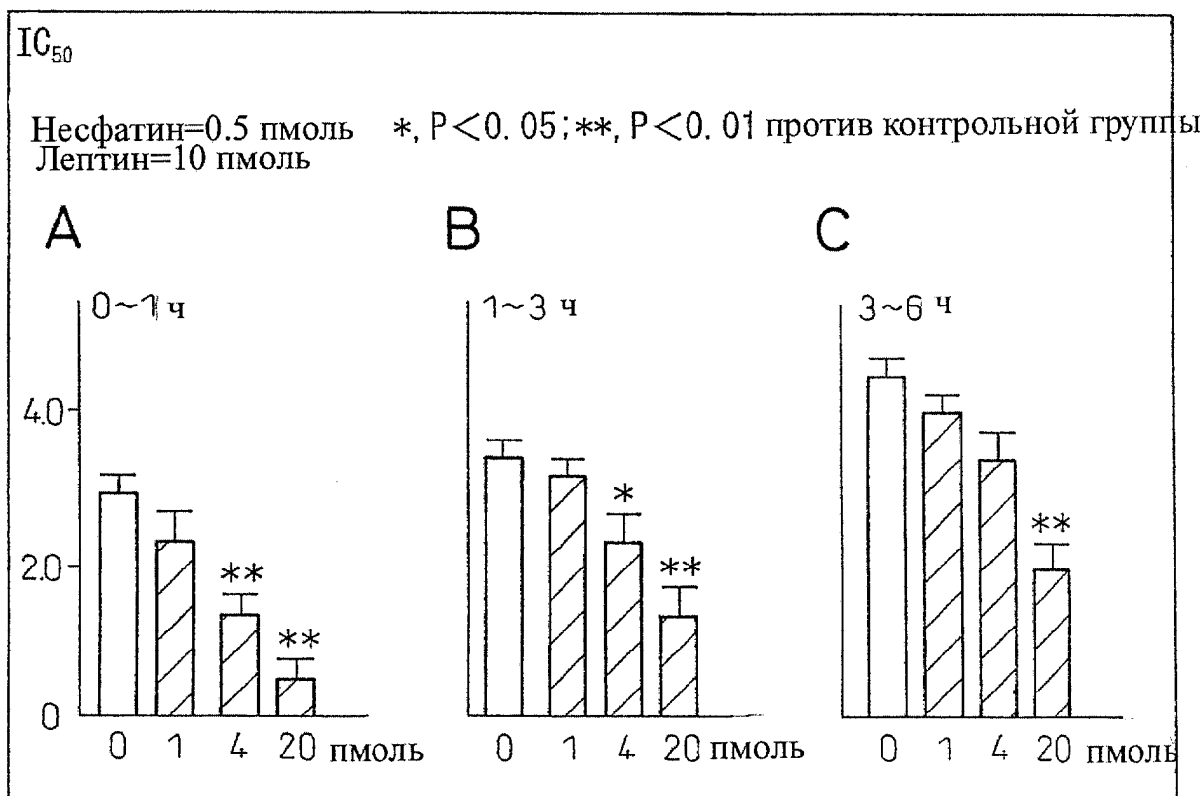
ФИГ. 2



ФИГ. 3

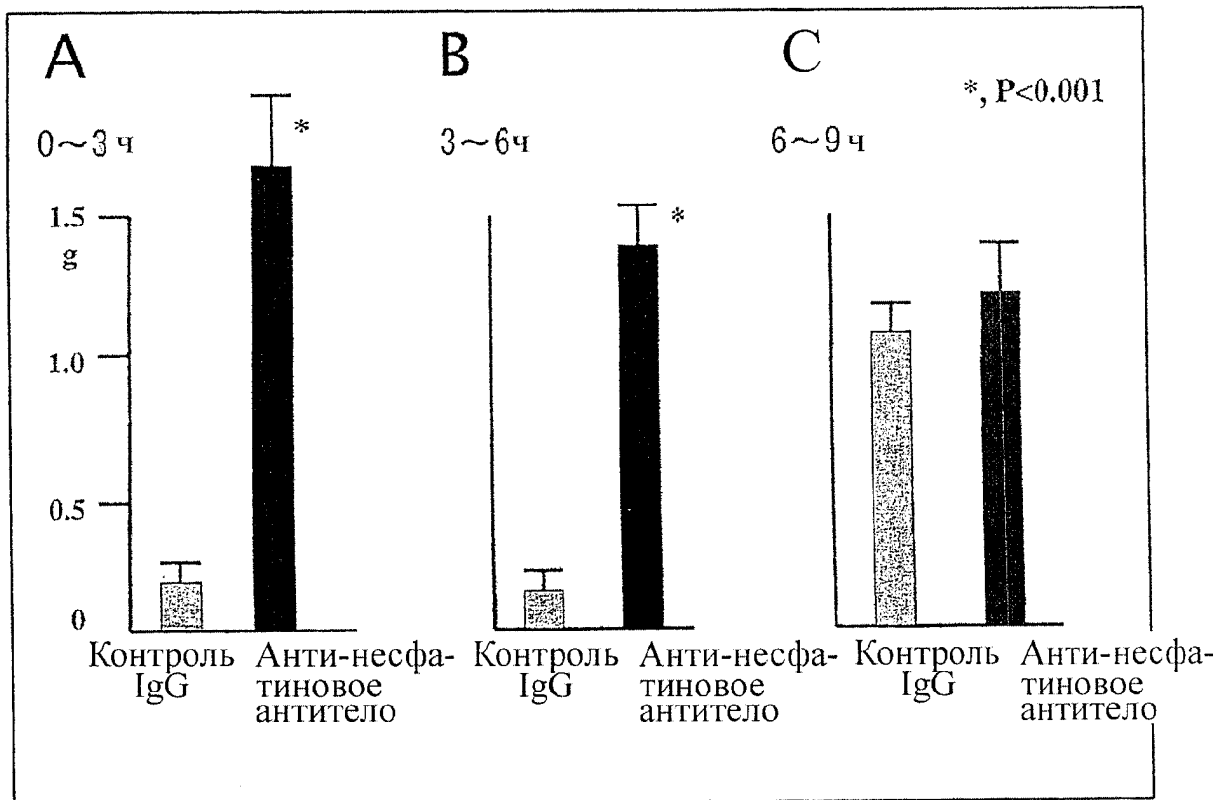


Фиг. 4

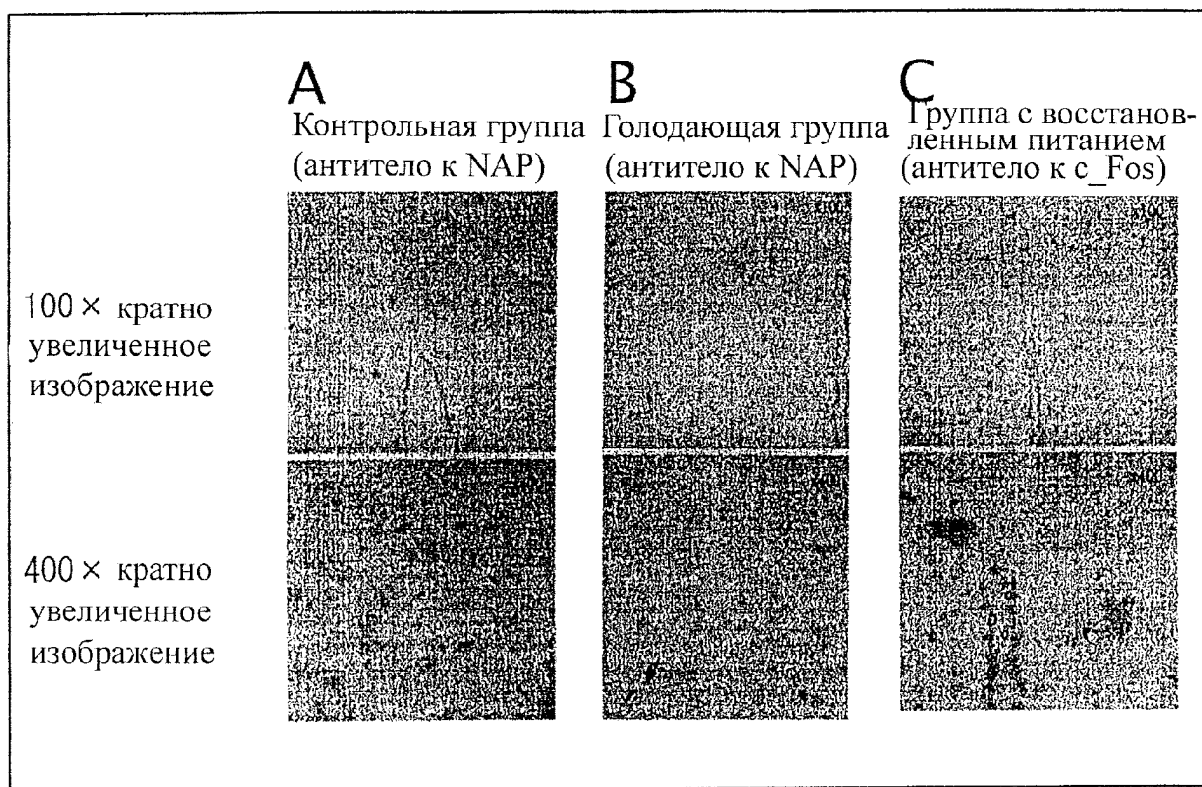


Фиг. 5

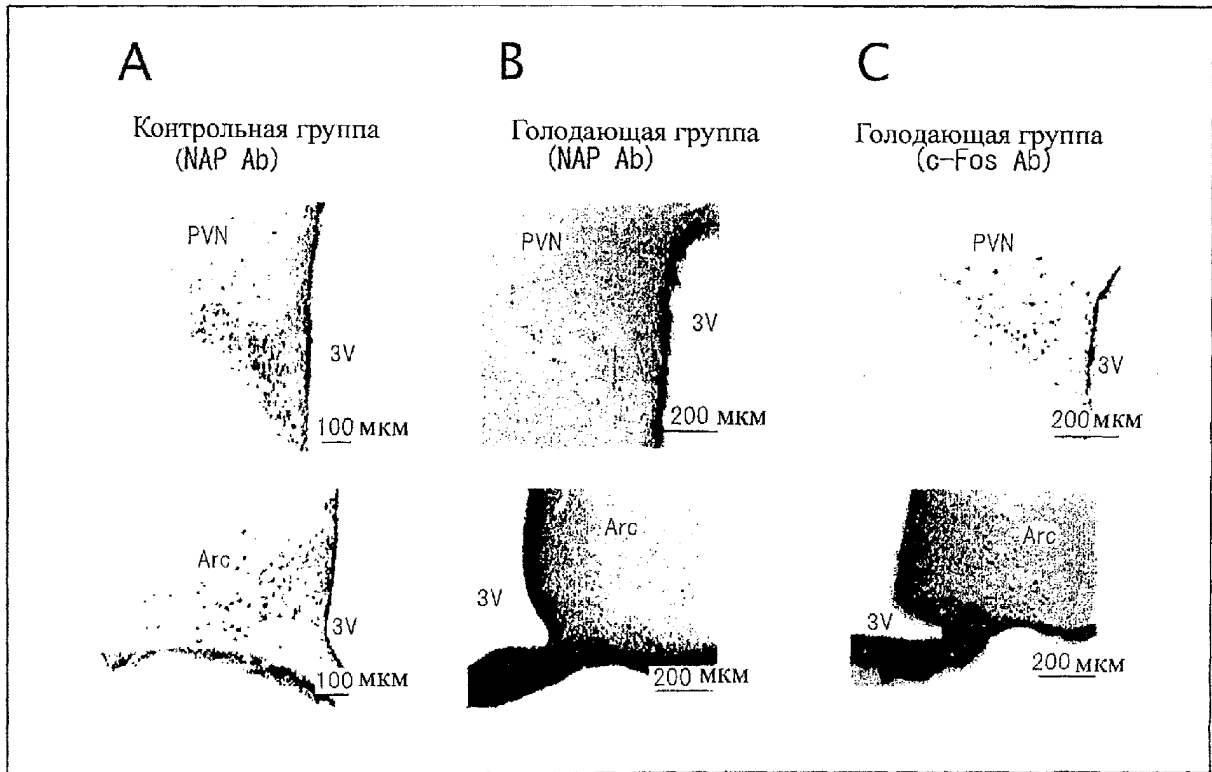




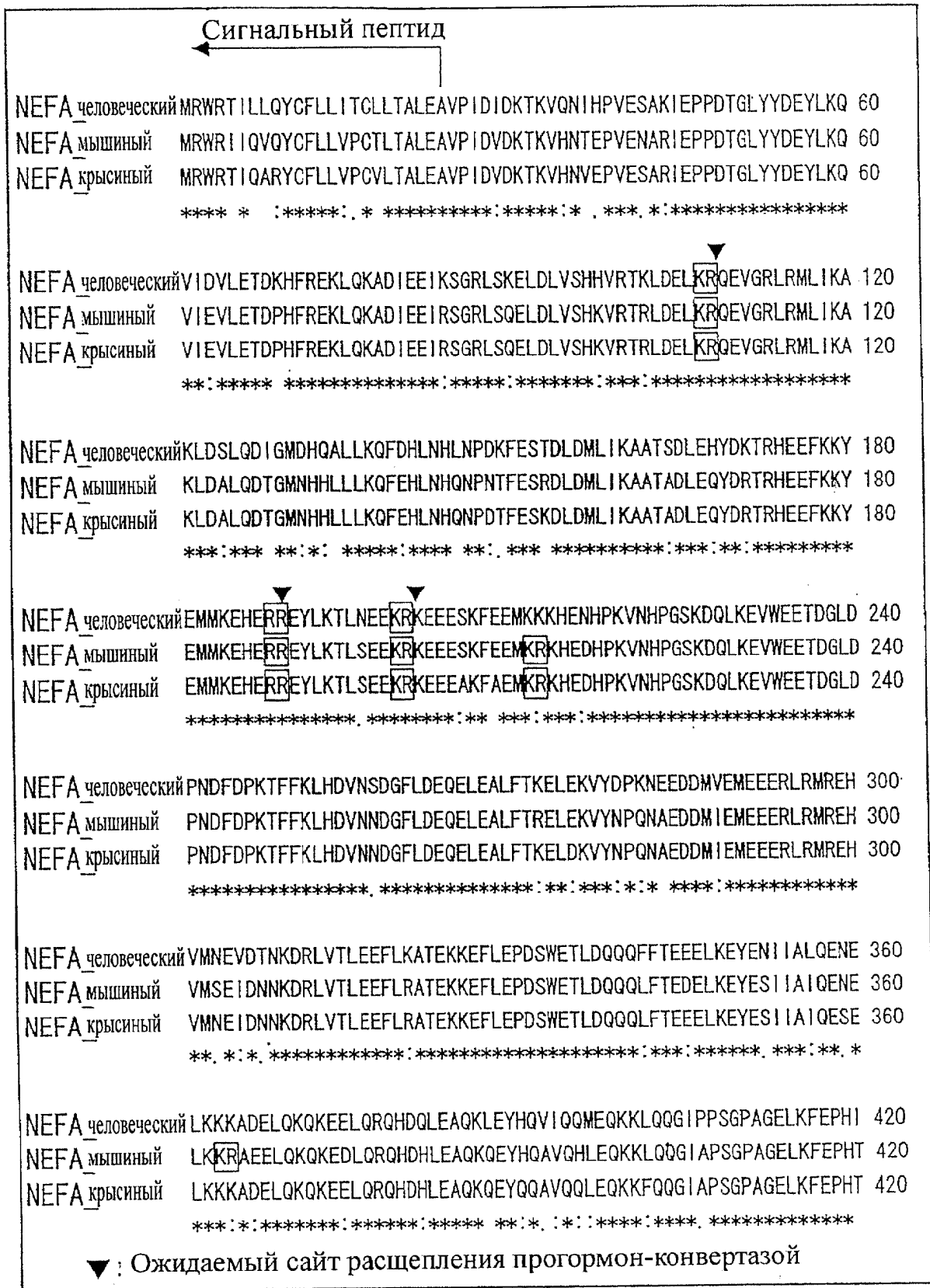
Фиг. 6



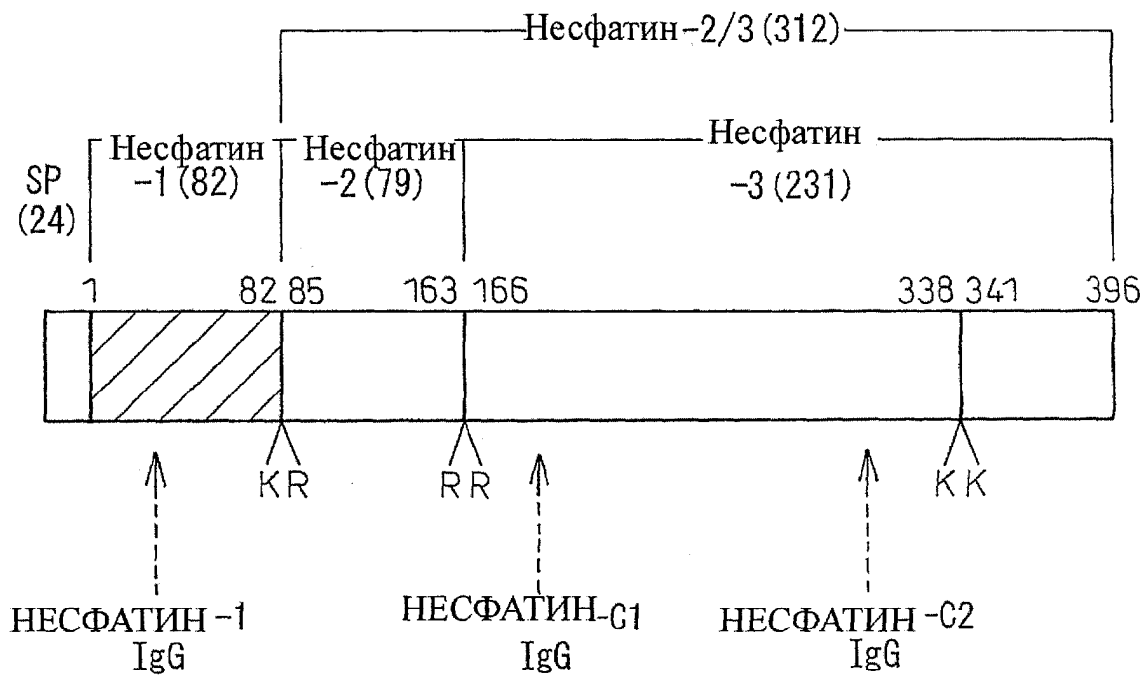
Фиг. 7



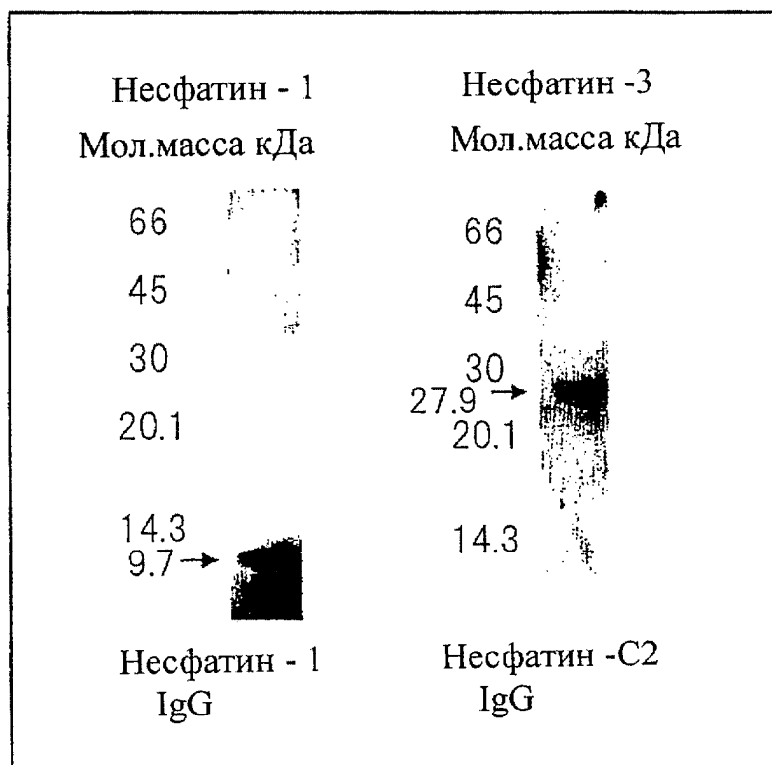
Фиг. 8



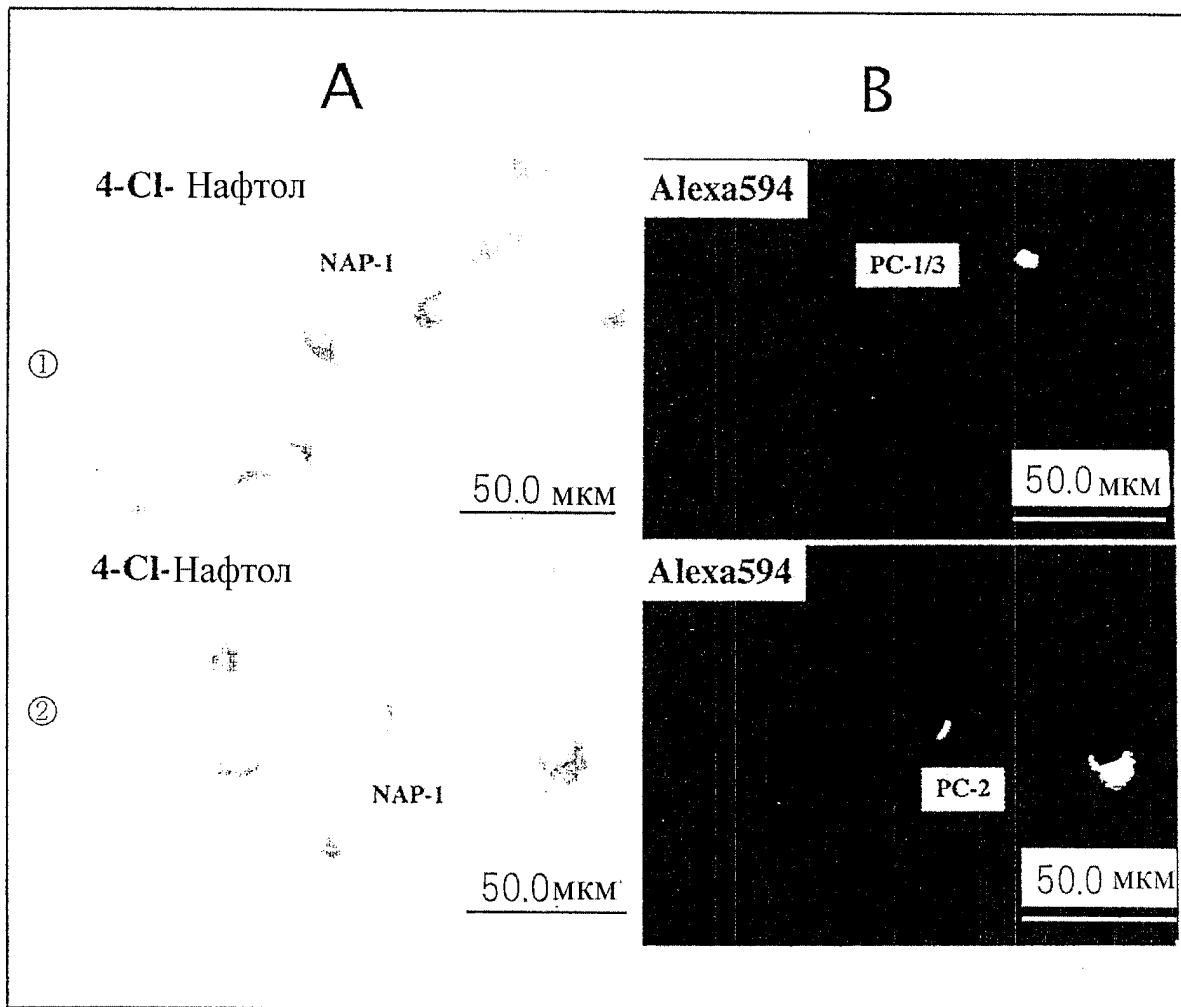
Фиг. 9А



Фиг. 9В

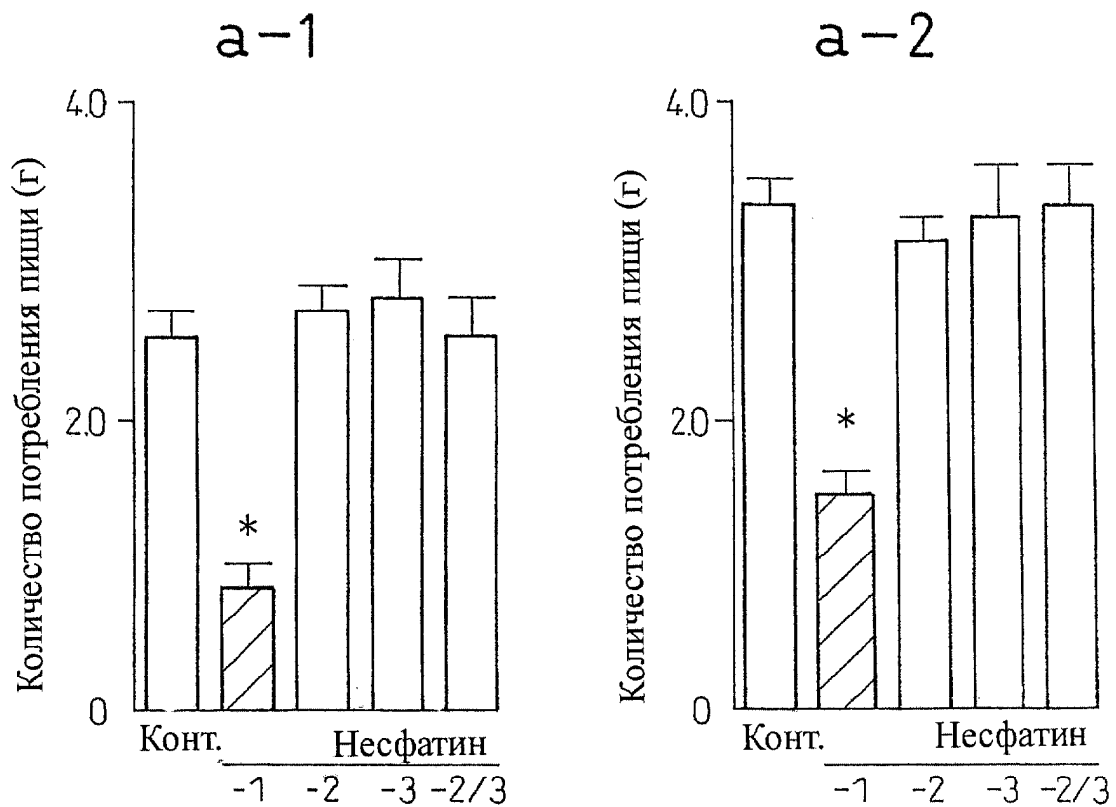


Фиг. 9С

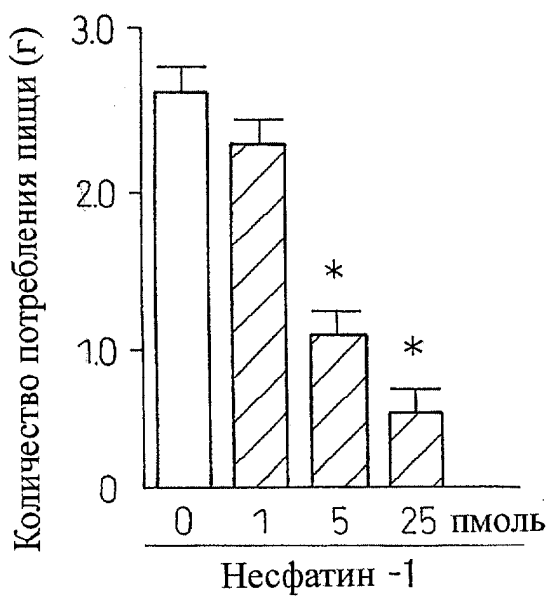


Фиг. 10

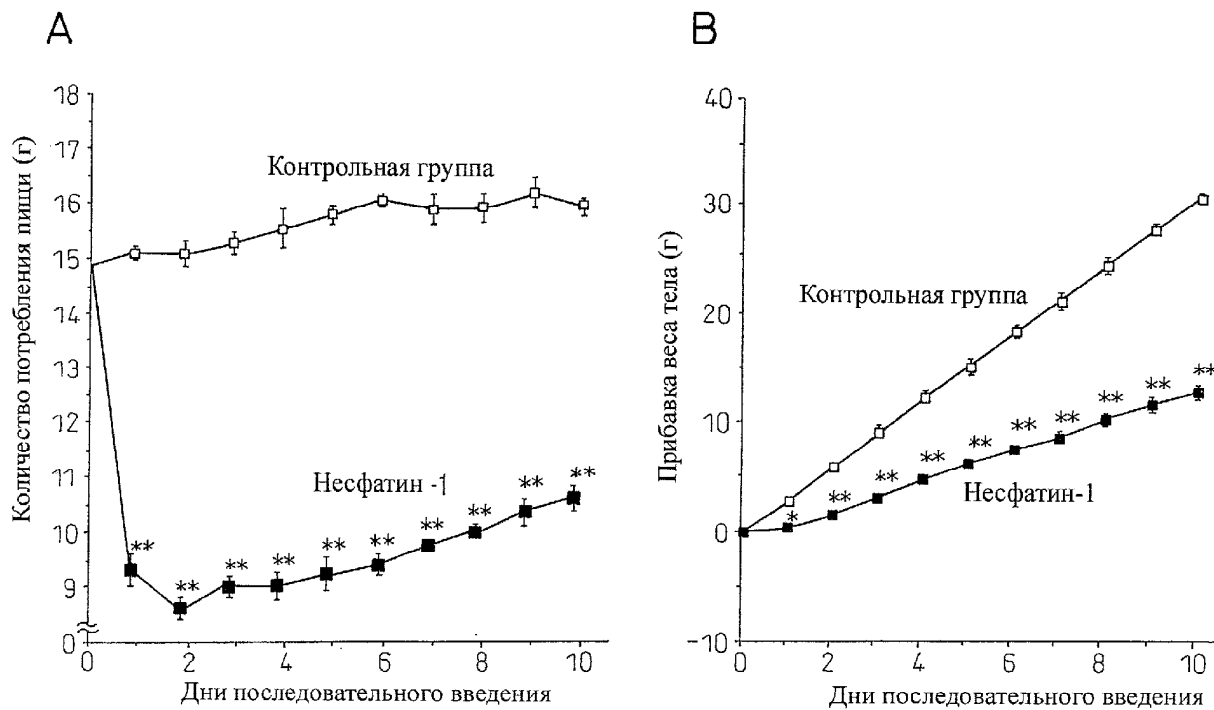
A



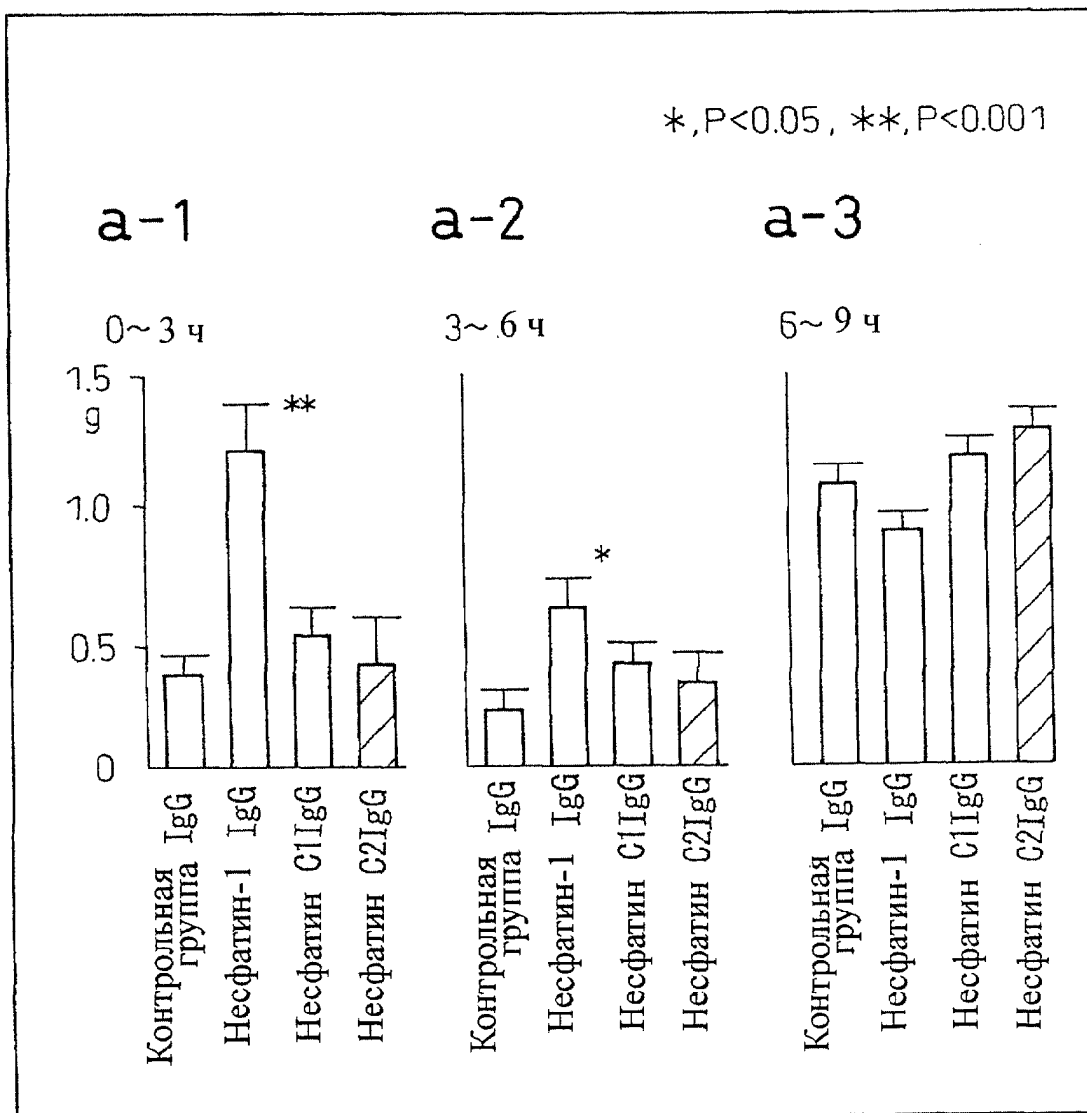
B



Фиг. 11

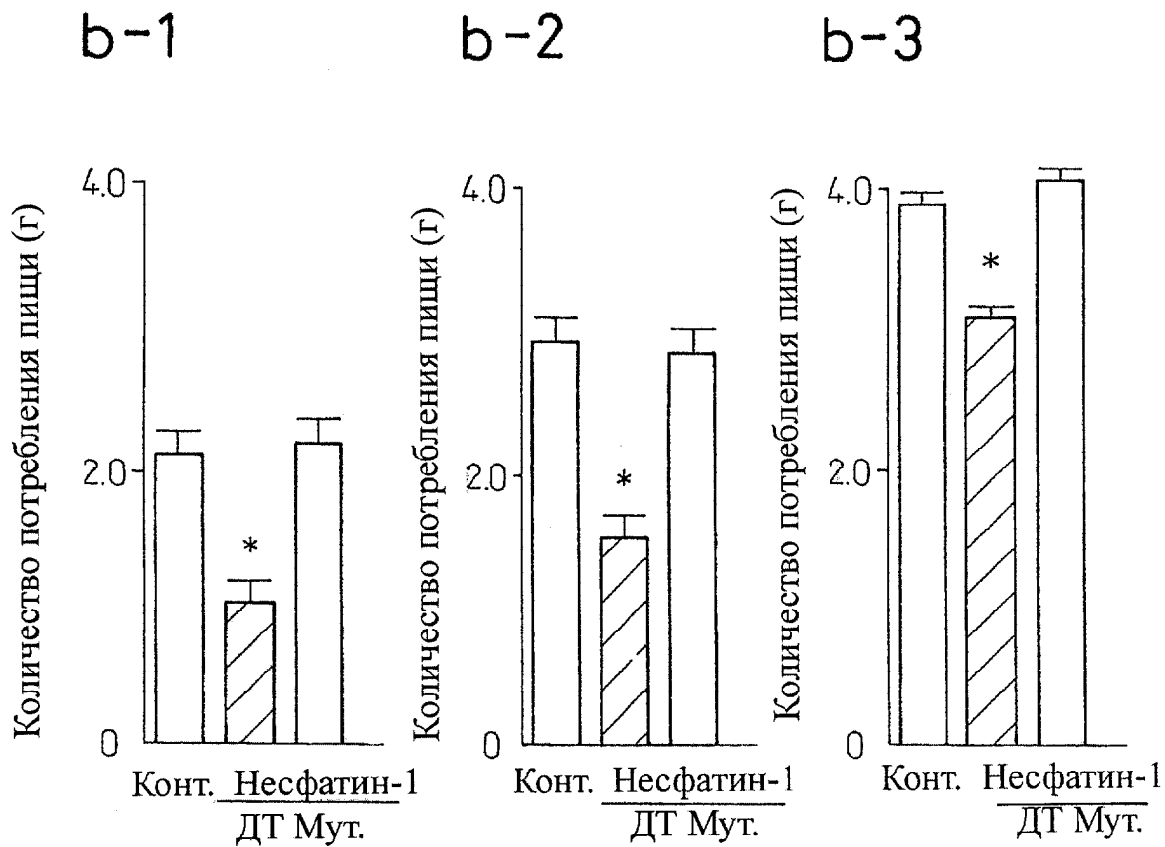


Фиг. 12

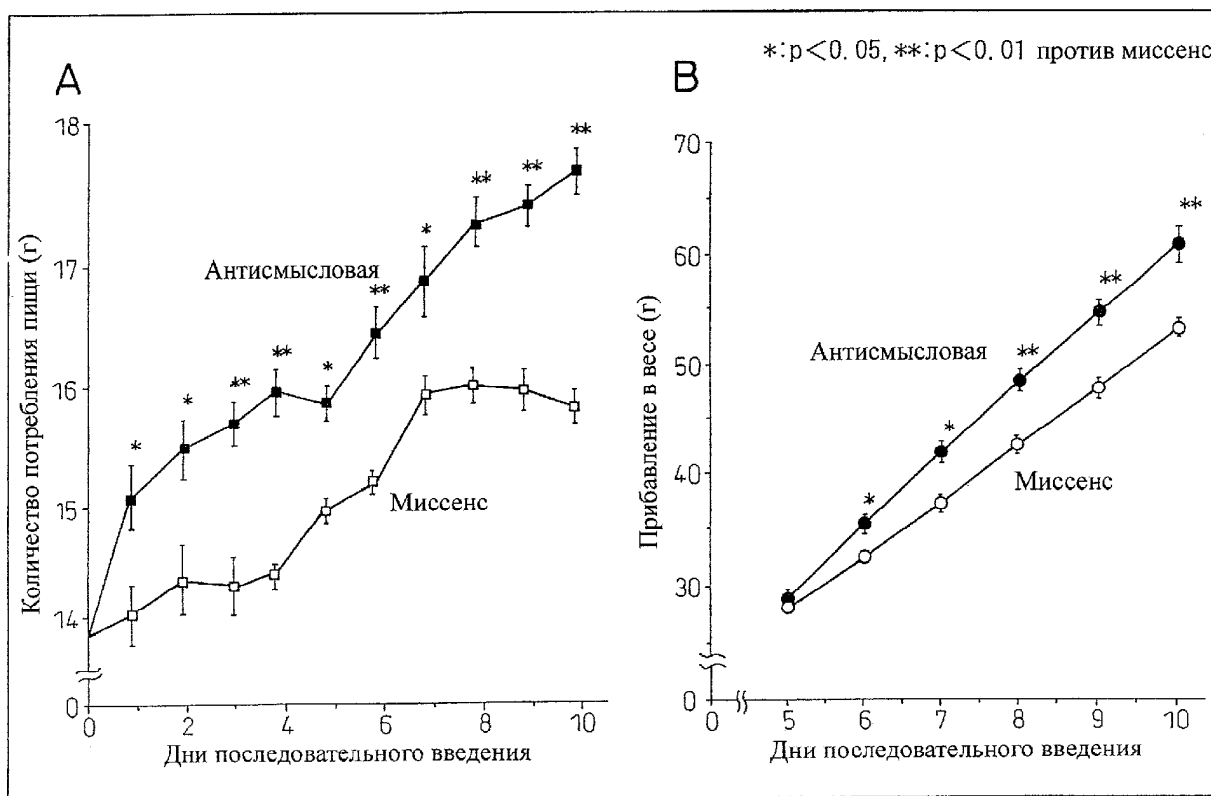


Фиг. 13А

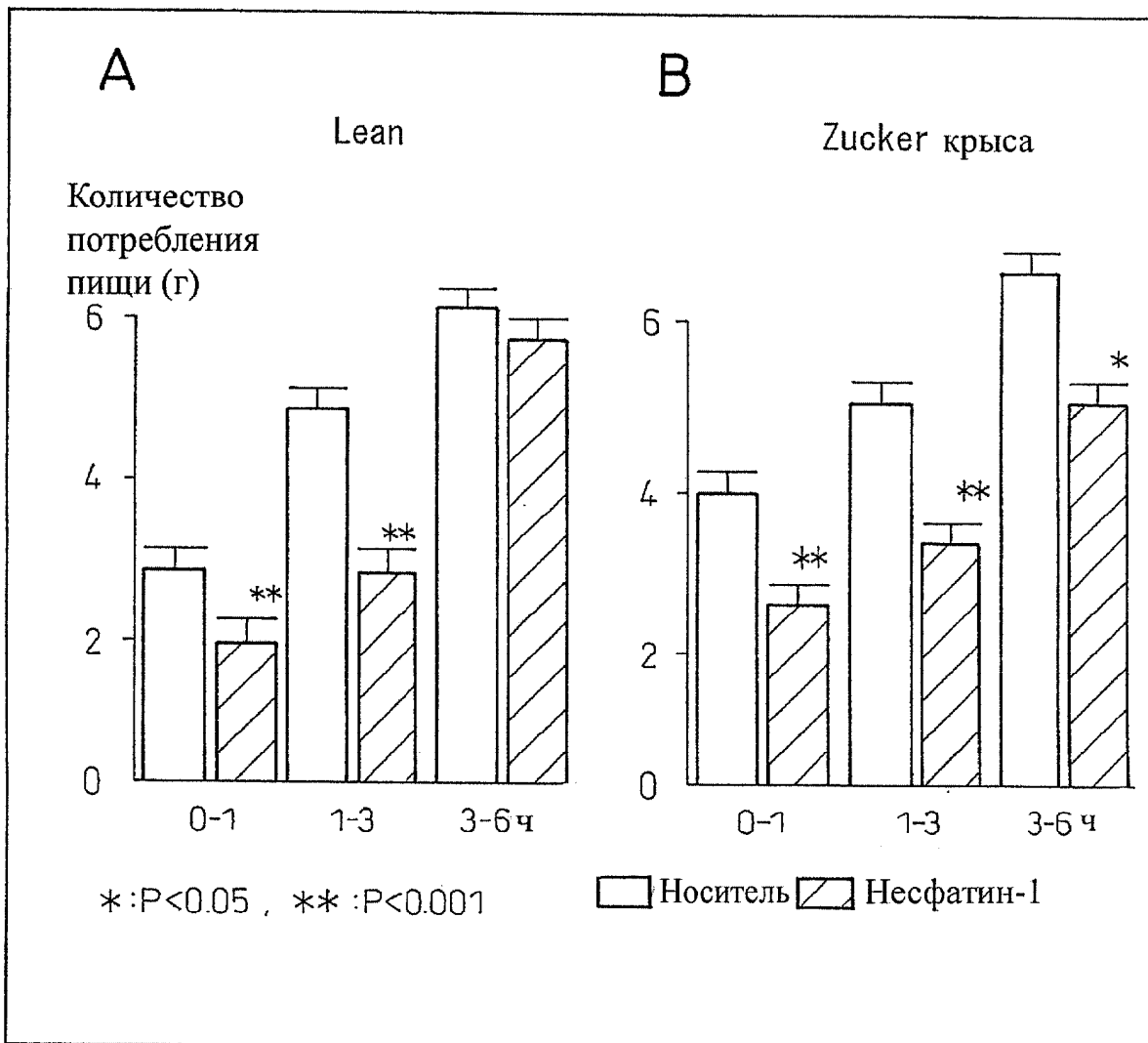




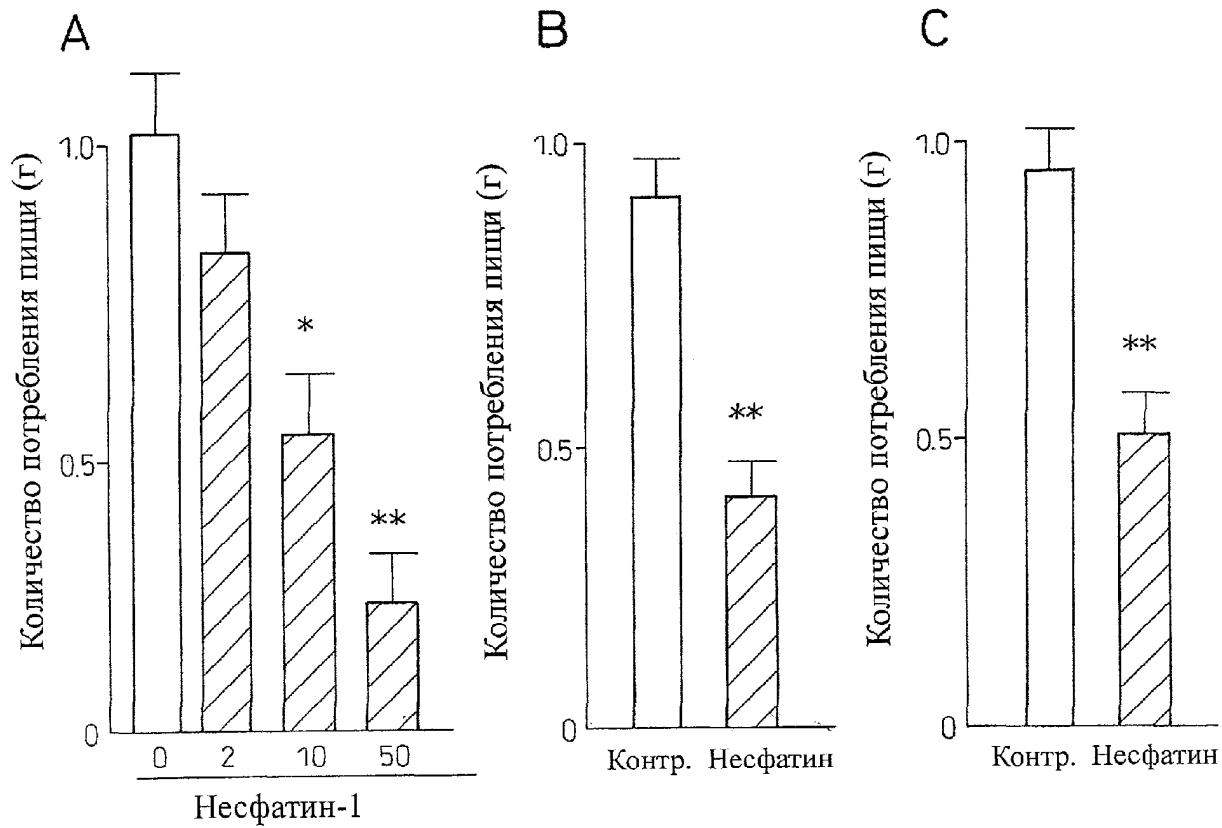
Фиг. 13В



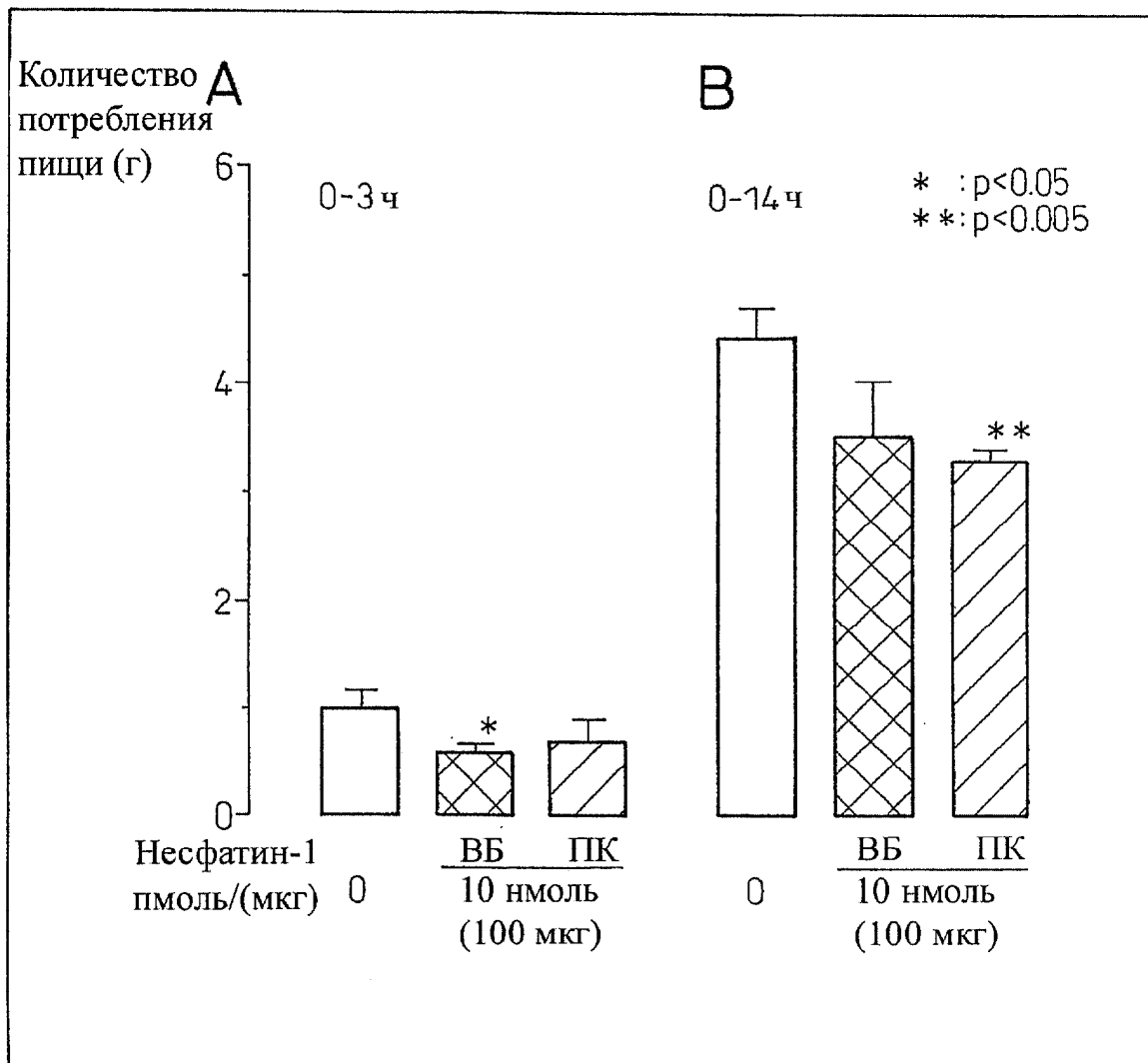
Фиг. 14



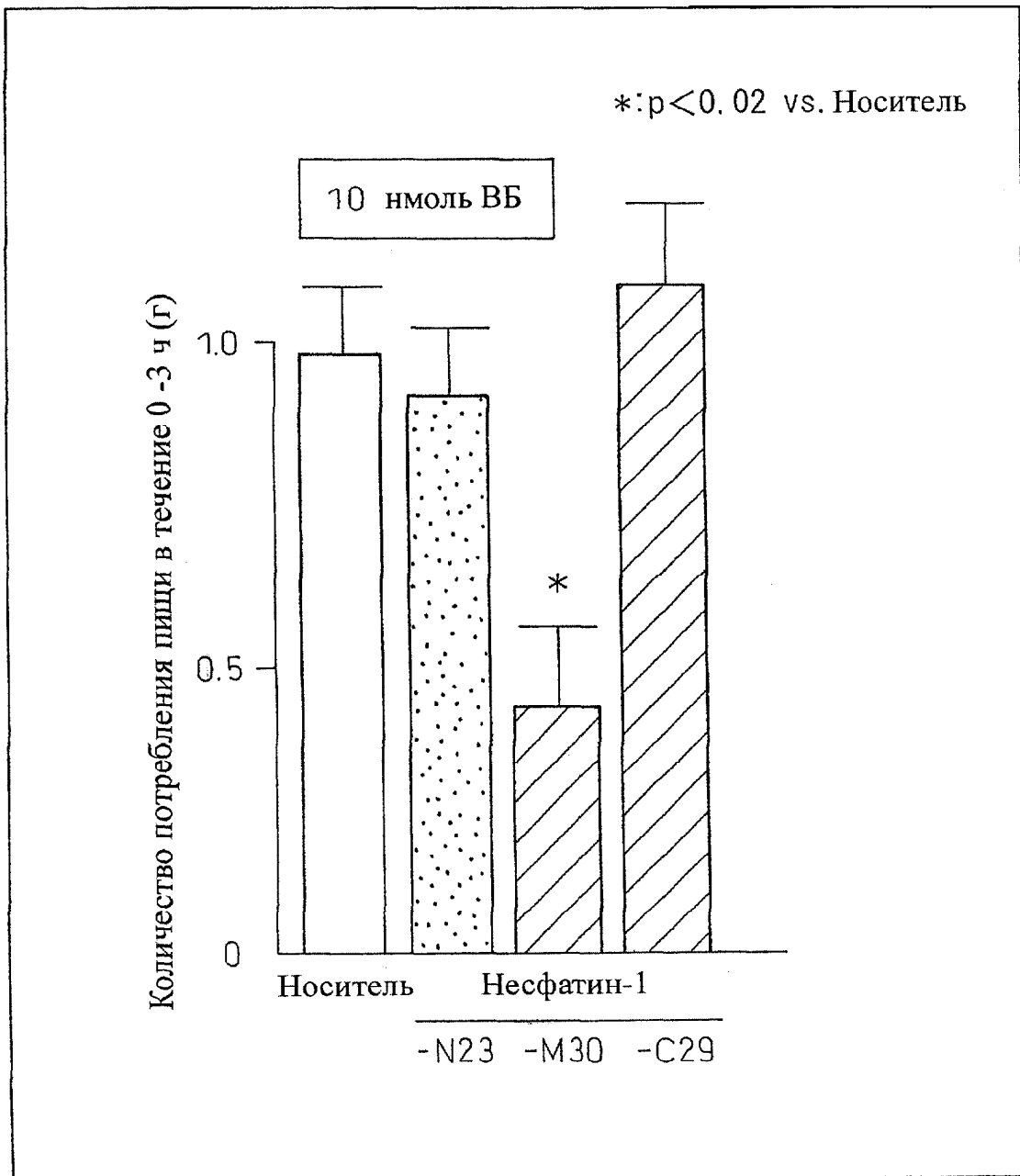
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

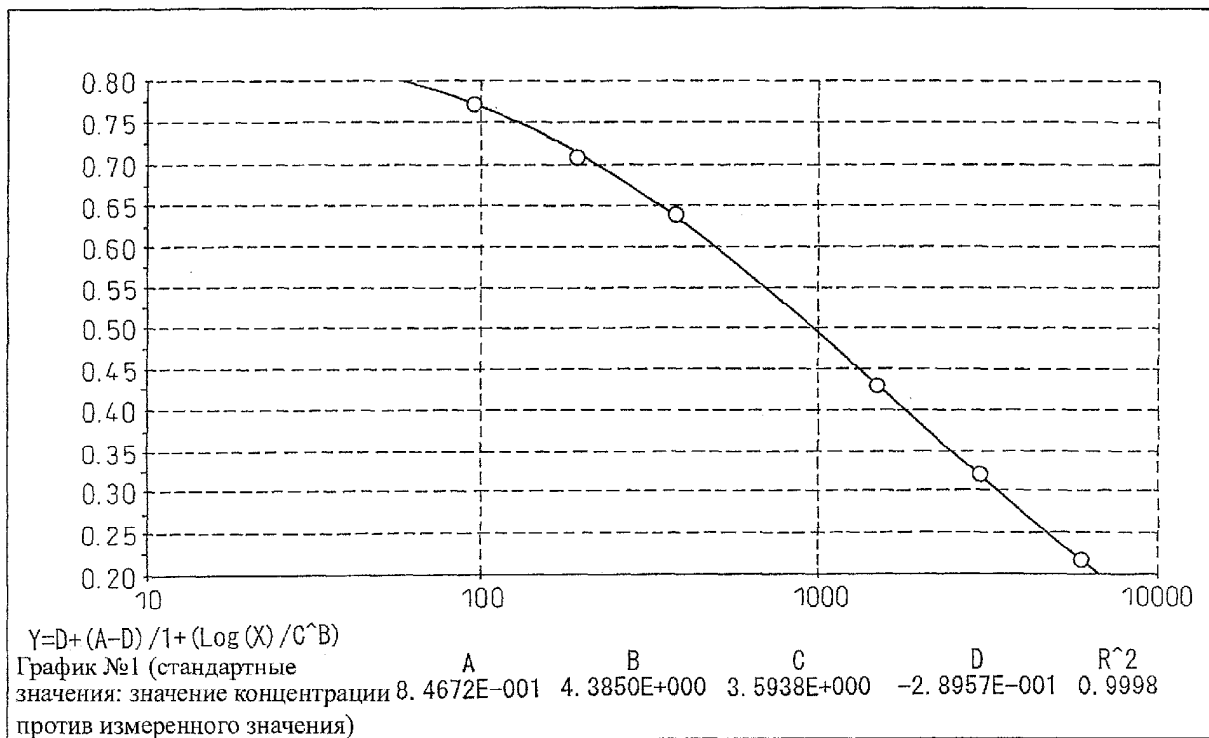


Фиг. 18А

Несфатин-1 человеческий VPIDIDKTKVQNIHPVESAKIEPPDTGLYYDEYLKQVIDVLETDKHFREKQLQKADIEEIK 60  
 Несфатин-1 крысиный VPIDVDKTKVHNVDPVESARIEPPDTGLYYDEYLKQVIEVLETDPHFREKQLQKADIEEIR 60  
 Несфатин-1 мышинный VPIDVDKTKVHNTEPVENARIEPPDTGLYYDEYLKQVIEVLETDPHFREKQLQKADIEEIR 60  
 \*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*.\*\*\*.\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:  
 |-----||-----||-----  
 Несфатин-1N23 23 24 Несфатин-1M30 53 54

Несфатин-1 человеческий SGRLSKELDLVSHNVRTKLDEL 82  
 Несфатин-1 крысиный SGRLSQELDLVSHKVRTRLDEL 82  
 Несфатин-1 мышинный SGRLSQELDLVSHKVRTRLDEL 82  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*:\*\*\*\*  
 |-----|  
 Несфатин-1C29 82

Фиг. 18В



Фиг. 19А-1

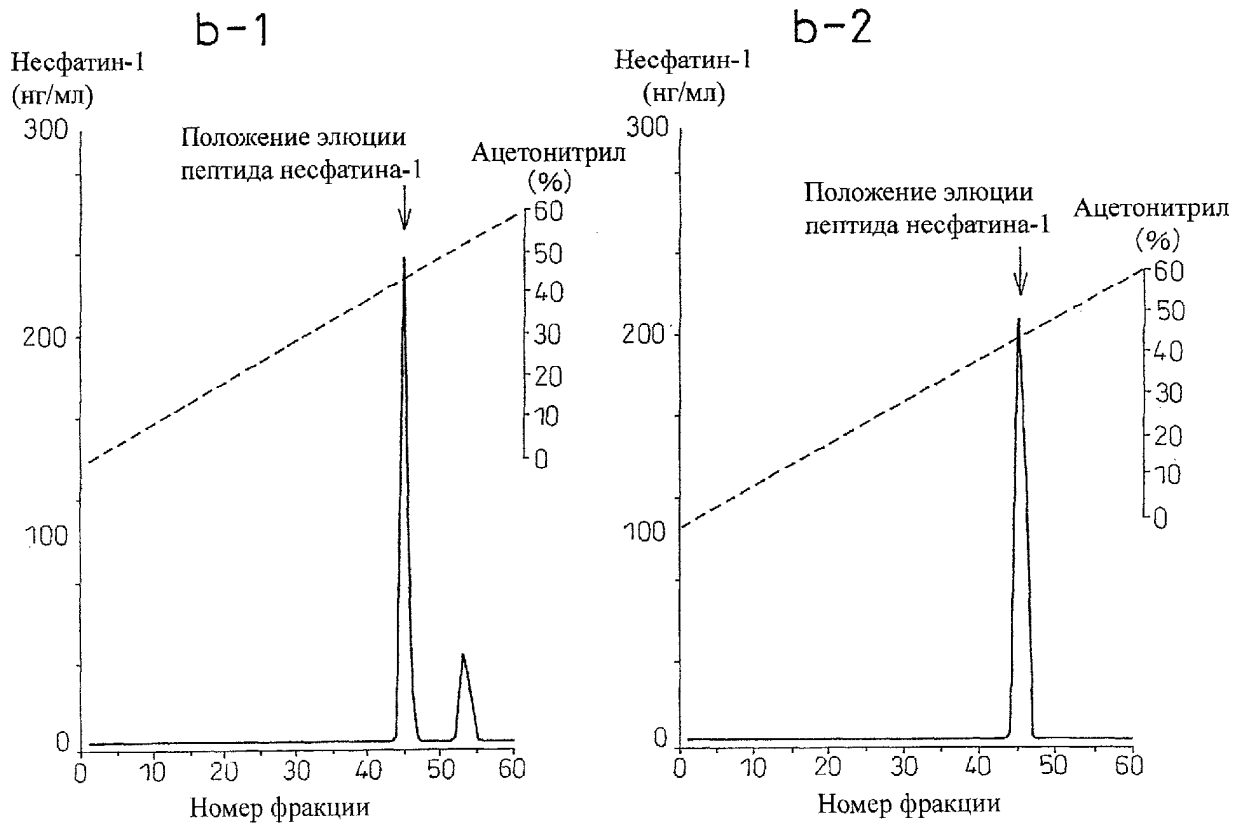
Измеренное значение (нг/мл)

| Образец | Измеренное значение (нг/мл) | Разведение |
|---------|-----------------------------|------------|
|         | 232                         | 1.0        |
|         | 233                         | 2.0        |

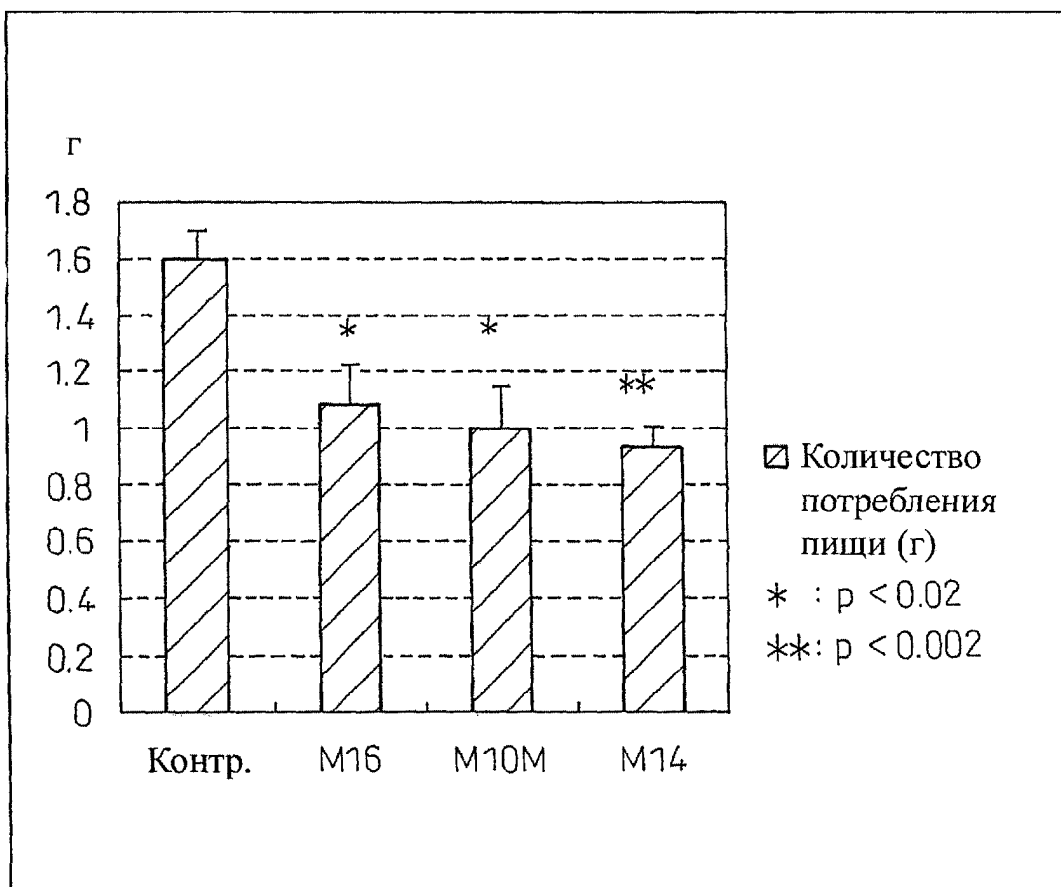
Цереброспинальная  
жидкость (FCS M1)

n=2

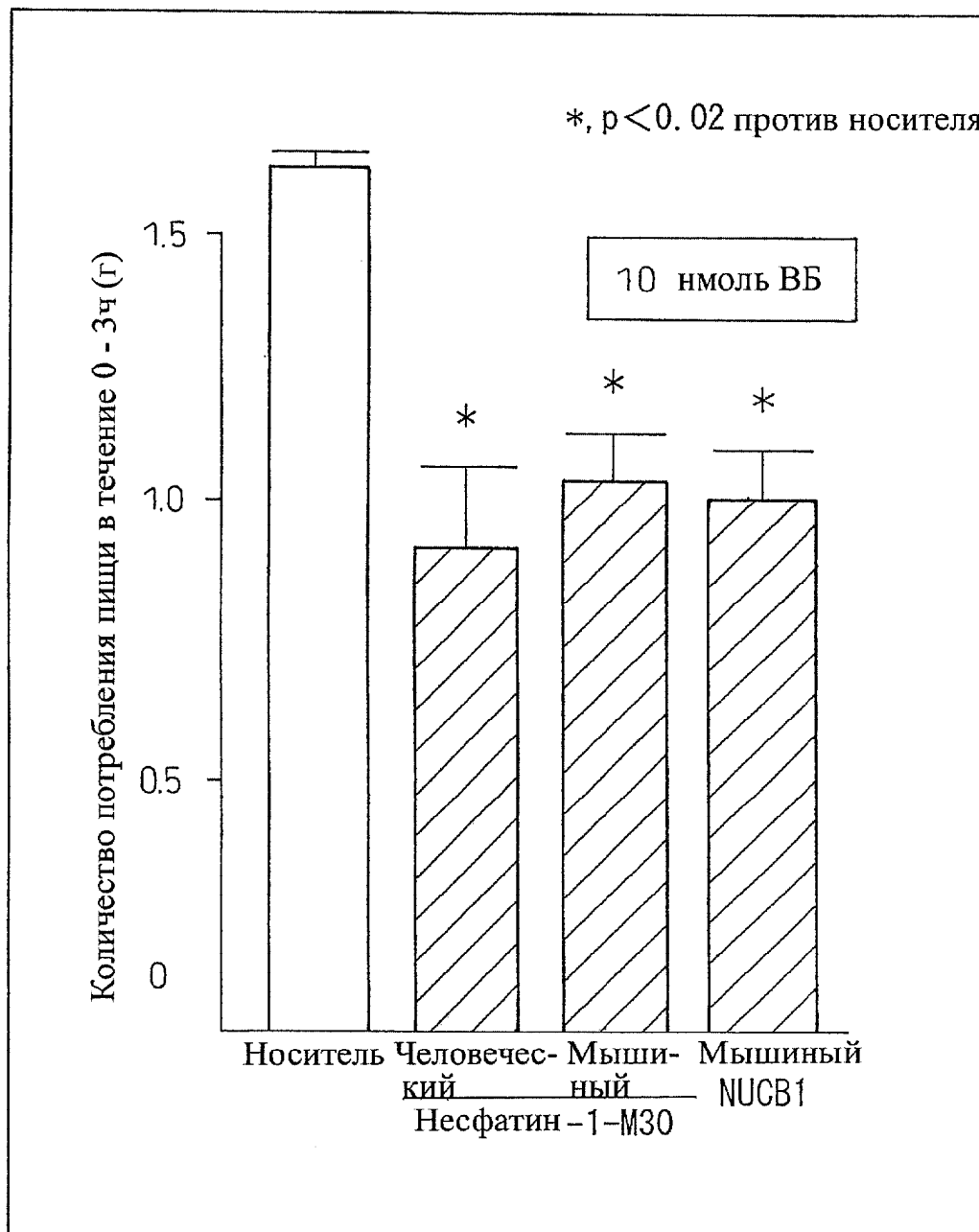
Фиг. 19А-2



Фиг. 19В



Фиг. 20



Фиг. 21А



|                       | — Сигнальный пептид —                                  | Несфатин -1—                   |                                  |
|-----------------------|--|--------------------------------|----------------------------------|
| Человеческий НЕСФАТИН | MRWR-TILLQYCFLLI                                       | TCLLTALEAVPIDIDKTKVQNIHPVESAKI | EPDPTGLYYDEYLK 59                |
| Крысиный НЕСФАТИН     | MRWR-TIQARYCFLLVPCVLT                                  | ALEAVPIDVDKTKVHNVEPVESARI      | EPDPTGLYYDEYLK 59                |
| Мышиный НЕСФАТИН      | MRWR-I IQVQYCFLLVPCMLT                                 | ALEAVPIDVDKTKVHNTEPVENARI      | EPDPTGLYYDEYLK 59                |
| Человеческий NUCB1    | MPPSGPRGTL   | LLLLLLLLLRAVLAVPLERGA          | PNKE-----ETPATESPDTGLYYHRYLQ 55  |
| Крысиный NUCB1        | MPTSVPRGAPFLLLP  | LLMLSAVLAVPVDRAAPHQE-----      | DNQATETPDTGLYYHRYLQ 55           |
| Мышиный NUCB1         | MPTSVPRGAPFLLLP  | LLMLSAVLAVPVDRAAPPQE-----      | DSQATETPDTGLYYHRYLQ 55           |
|                       | *  | *                              | :* *: ***: . . . :. *.*****.***: |
| = Несфатин -1M30 =    |  |                                |                                  |
| Человеческий НЕСФАТИН | QVIDVLETDKHFREKLQKADIEEIKSGRLSKELDLVSHHVRTKLD          | DELKRQEVGRLRMLIK               | 119                              |
| Крысиный НЕСФАТИН     | QVIDVLETDPHFREKLQKADIEEIRSGRLSQELDLVSHKVRTRL           | DELKRQEVGRLRMLIK               | 119                              |
| Мышиный НЕСФАТИН      | QVIDVLETDPHFREKLQKADIEEIRSGRLSQELDLVSHKVRTRL           | DELKRQEVGRLRMLIK               | 119                              |
| Человеческий NUCB1    | EVIDVLETDGHFREKLQAANAEDIKSGKLSRELDFVSHHVRTKLD          | DELKRQEVSRRLMLLK               | 115                              |
| Крысиный NUCB1        | EVINVLETDGHFREKLQAANAEDIKSGKLSQELDFVSHHVRTKLD          | DELKRQEVSRRLMLLK               | 115                              |
| Мышиный NUCB1         | EVINVLETDGHFREKLQAANAEDIKSGKLSQELDFVSHHVRTKLD          | DELKRQEVSRRLMLLK               | 115                              |
|                       | :***:***** ***** *: *:***:***:***:***:*****.*****:     |                                |                                  |
| Человеческий НЕСФАТИН | AKLDSLQD--IGMDHQALLKQFDHLNHLNPDKFESTDLDMLIK            | KAATSDLEHYDKTRHEEF             | 177                              |
| Крысиный НЕСФАТИН     | AKLDALQD--TGMNHHLLKQFEHLNHNQNPDTFESKDL                 | DMLIKAAATADLEQYDRTRHEEF        | 177                              |
| Мышиный НЕСФАТИН      | AKLDALQD--TGMNHHLLKQFEHLNHNQNPDTFESRDL                 | DMLIKAAATADLEQYDRTRHEEF        | 177                              |
| Человеческий NUCB1    | AKMDAEQDPNVQVDHLLKQFEHLDPQNQHTFEARDLELLIQ              | TATRDLAQYDAANHEEF              | 175                              |
| Крысиный NUCB1        | AKMDAQEPNLQVDHMLLKQFEHLDPQNQHTFEARDLELLIQ              | TATRDLAQYDAANHEEF              | 175                              |
| Мышиный NUCB1         | AKMDAQEPNLQVDHMLLKQFEHLDPQNQHTFEARDLELLIQ              | TATRDLAQYDAANHEEF              | 175                              |
|                       | **:* *: ::* *****:*, * ..**:* **:***:* ** ** :** :**** |                                |                                  |
| Человеческий НЕСФАТИН | KKYEMMKERREYKTLNEEKRKEEESKFEEEMKKKHENHPKVNHP           | GSKDQLKEVWEETD                 | 237                              |
| Крысиный НЕСФАТИН     | KKYEMMKERREYKTLSEEKRKEEESKFAEMKRRKHEDHPKVNHP           | GSKDQLKEVWEETD                 | 237                              |
| Мышиный НЕСФАТИН      | KKYEMMKERREYKTLSEEKRKEEESKFEEEMKRRKHEDHPKVNHP          | GSKDQLKEVWEETD                 | 237                              |
| Человеческий NUCB1    | KRYEMLKEHERRYLES LGEEQRKEAERKLEEQRRHREHPKVNVP          | GSQAQLKEVWEELD                 | 235                              |
| Крысиный NUCB1        | KRYEMLKEHERRYLES LGEEQRKEAERKLEEQRRHREHPKVNVP          | GSQAQLKEVWEELD                 | 235                              |
| Мышиный NUCB1         | KRYEMLKEHERRYLES LGEEQRKEAERKLEEQRRHREHPKVNVP          | GSQAQLKEVWEELD                 | 235                              |
|                       | *:***:*****.***:*,**:* ** * * :*:.*:***** ***: ***** * |                                |                                  |

Фиг. 21B

Человеческий НЕСФАТИН GLDPNDFDPKTFKFLHDVNSDGFLEQEALFTKELEKVVDPKNEEDDMVEMEEERLRM 297  
 Крысиный НЕСФАТИН GLDPNDFDPKTFKFLHDVNSDGFLEQEALFTKELDKVYNPQNAEDDM IEMEEERLRM 297  
 Мышиный НЕСФАТИН GLDPNDFDPKTFKFLHDVNSDGFLEQEALFTRELEKVVYNPQNAEDDM IEMEEERLRM 297  
 Человеческий NUCB1 GLDPNRFNPKTFF I LHD I NSDGVLEQEALFTKELEKVVDPKNEEDDMREEMEEERLRM 295  
 Крысиный NUCB1 GLDPNRFNPKTFF I LHD I NSDGVLEQEALFTKELEKVVDPKNEEDDMREEMEEERLRM 295  
 Мышиный NUCB1 GLDPNRFNPKTFF I LHD I NSDGVLEQEALFTKELEKVVDPKNEEDDMREEMEEERLRM 295

\*\*\*\*\* \*:\*\*\*\*\* \*\*\*:\*, \*\*, \*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*:\*\*\* \*\*\*:\*\*\*\*\*

Человеческий НЕСФАТИН REHVMNEVDTNKDRLVTLEEFKATEKKEFLEP-DSWETLDQQQFFTEEELKEYEN I I A L 356  
 Крысиный НЕСФАТИН REHVMNE I DNNKDRLVTLEEFKATEKKEFLEP-DSWETLDQQQLFTEEELKEYES I I A I 356  
 Мышиный НЕСФАТИН REHVMSE I DNNKDRLVTLEEFKATEKKEFLEP-DSWETLDQQQLFTEDELKEYES I I A I 356  
 Человеческий NUCB1 REQLMKNVDTNQDRLVTLEEFKATEKKEFLEP-DSWETLDQQQLFTEDELKEYES I I A I 356  
 Крысиный NUCB1 REHVMKNVDTNQDRLVTLEEFKATEKKEFLEP-DSWETLDQQQLFTEDELKEYES I I A I 356  
 Мышиный NUCB1 REHVMKNVDTNQDRLVTLEEFKATEKKEFLEP-DSWETLDQQQLFTEDELKEYES I I A I 356

\*\*:\* :\*: \*\*\*:\*\*\*\*\* :\*:\*\*\* :. :.\*:\*\*\* : \*\*:\*: :\* :\*

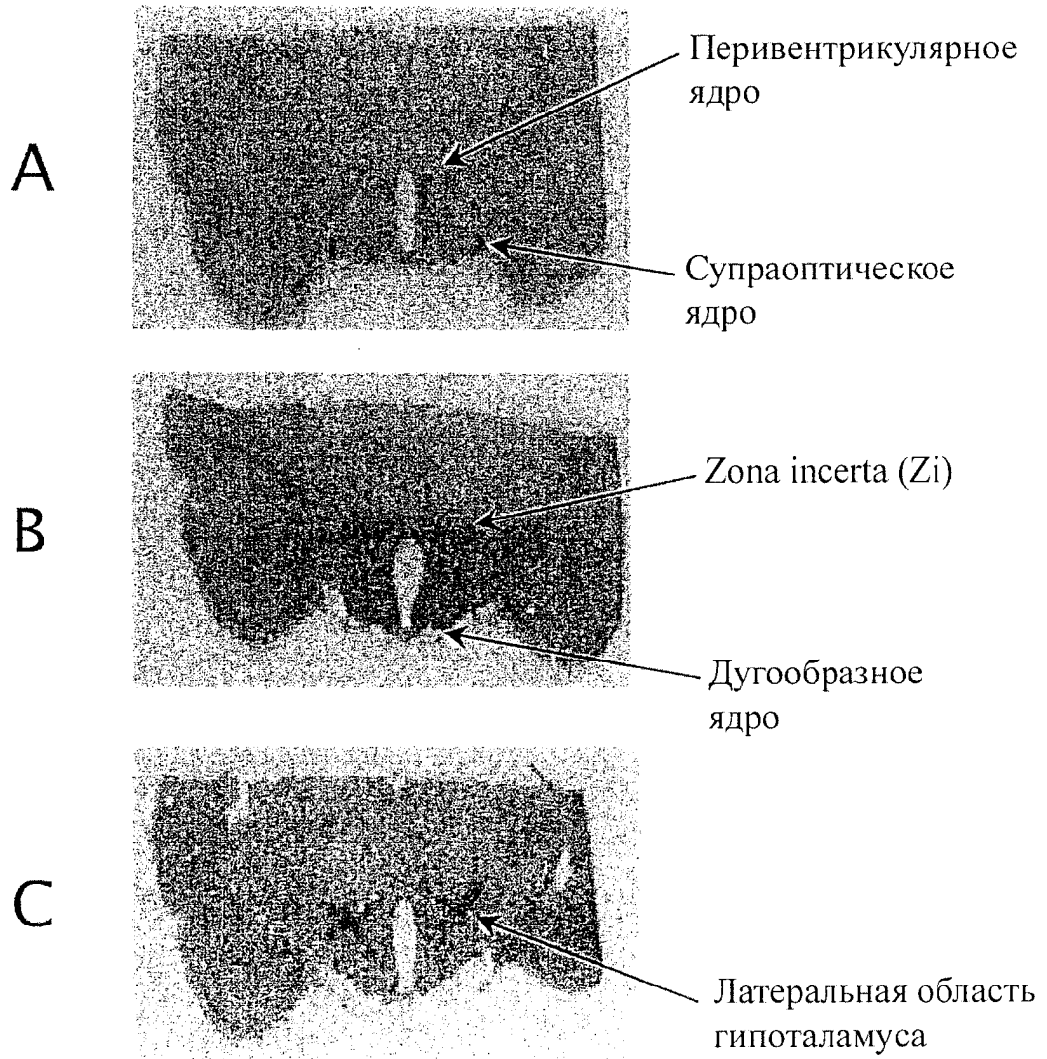
Человеческий НЕСФАТИН QENELKKKADELQKQKEELQRQHDLEAQKLEYHQV IQQMEQKKLQG----- I PPSGP 409  
 Крысиный НЕСФАТИН QESELKKKADELQKQKEELQRQHDLEAQKQGEYQQAQQLEQKFKQQG----- I APSGP 410  
 Мышиный НЕСФАТИН QENELKKRAEELQKQKEDLQRQHDLEAQKQGEYHQVQHLQKFKLQQG----- I APSGP 410  
 Человеческий NUCB1 REAELNAQAQRLSQETEALGRSQGRLEAKKRELLAVLHMEQRKQQQQQQGHKAPAAHP 415  
 Крысиный NUCB1 REAELNARAQRLSQETEALGRSQDRLEAQKRELQQAQVLMQEQKQQQQEQS---APPSQP 412  
 Мышиный NUCB1 REAELNARAQRLSQETEALGRSQDRLEAQKRELQ---QMEQRKQQLQEQS---APPSKP 408

\* \*\* :\*:\*. \* :\*. \* \* \* :. :\*\*\*: \* \* : :\*\*\*: \* \* .. : \*

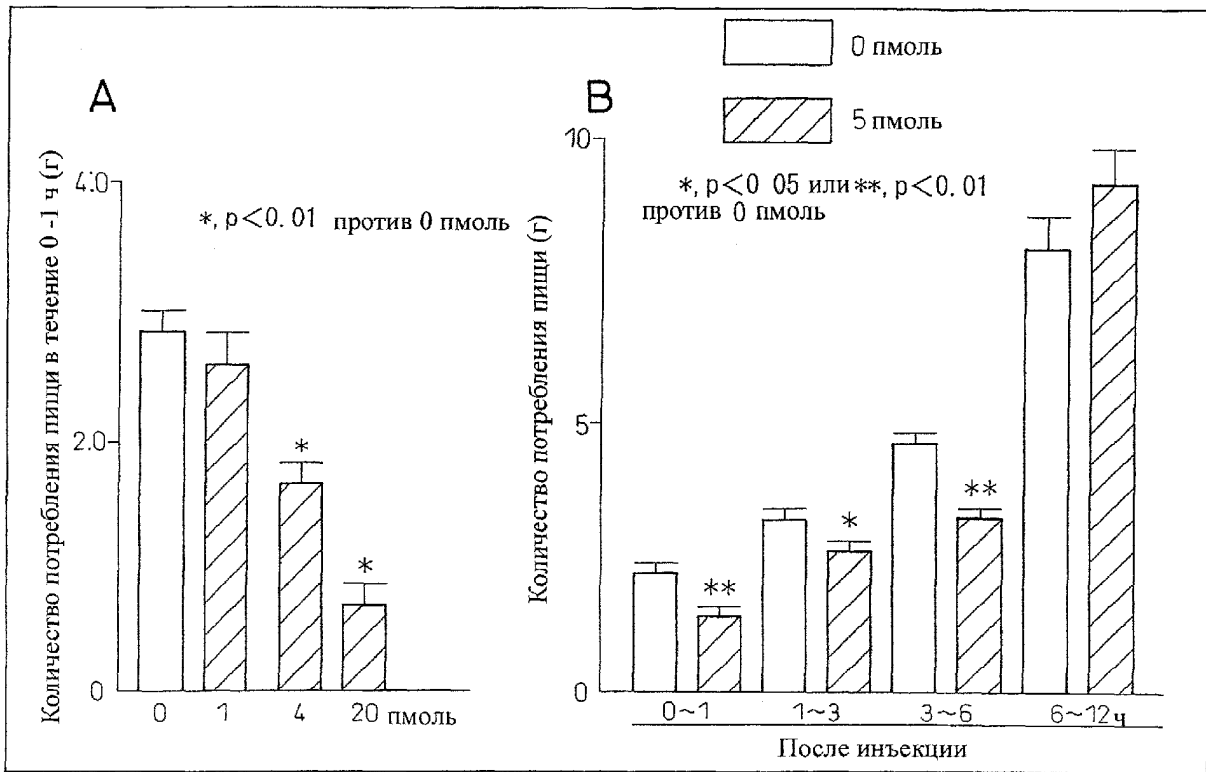
Человеческий НЕСФАТИН AGELKFERPI----- 419  
 Крысиный НЕСФАТИН AGELKFERHT----- 420  
 Мышиный НЕСФАТИН AGELKFERHT----- 420  
 Человеческий NUCB1 EGQLKFHPD TDVVPAPAGDQKEVD TSEKLLERLPEVEVP--QHL 460  
 Крысиный NUCB1 DGQLQFRADTGDAPVPAPAGDQKDVPA SEKKVPEQPPVLPQLDSQHL 459  
 Мышиный NUCB1 DGQLQFRADTDDAPVPAPAGDQKDVPA SEKKVPEQPPVLPQLDSQHL 455

\*:\*. \* ..

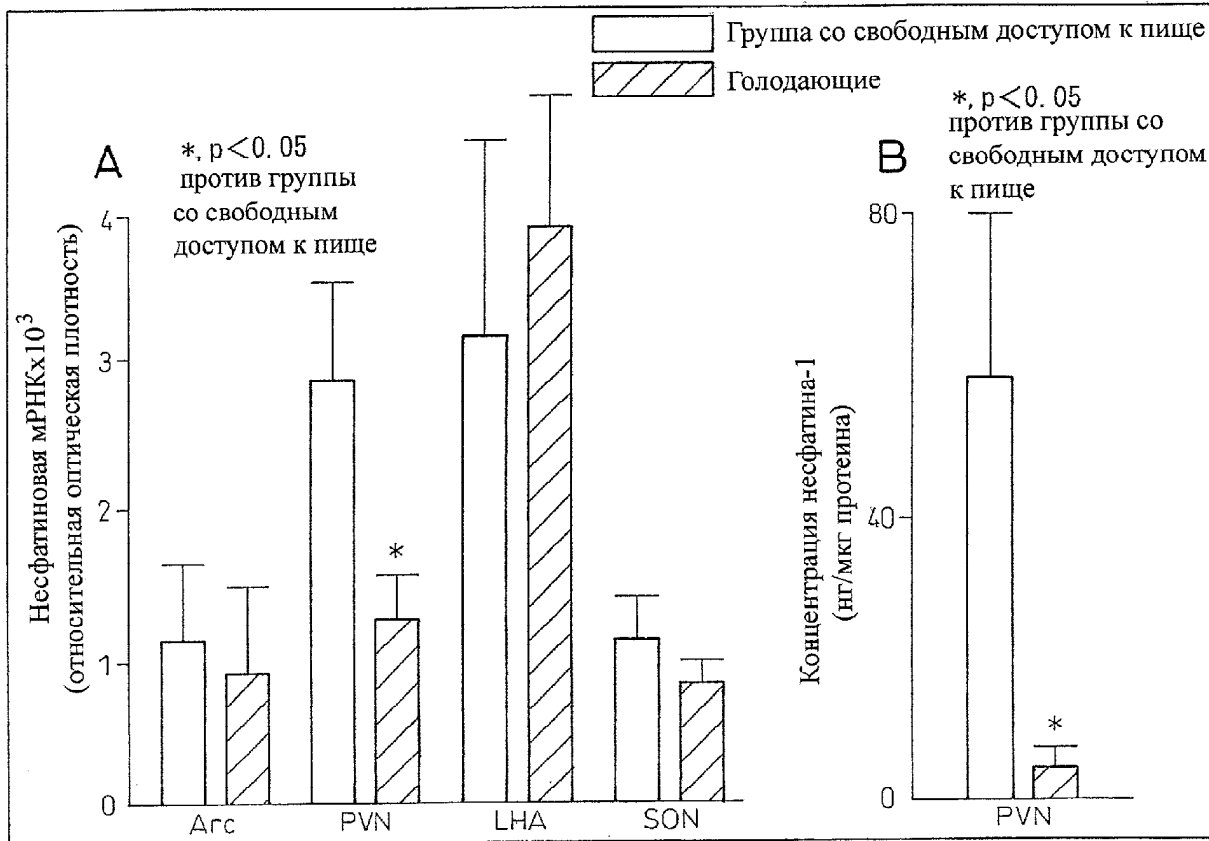
## Фиг. 21C



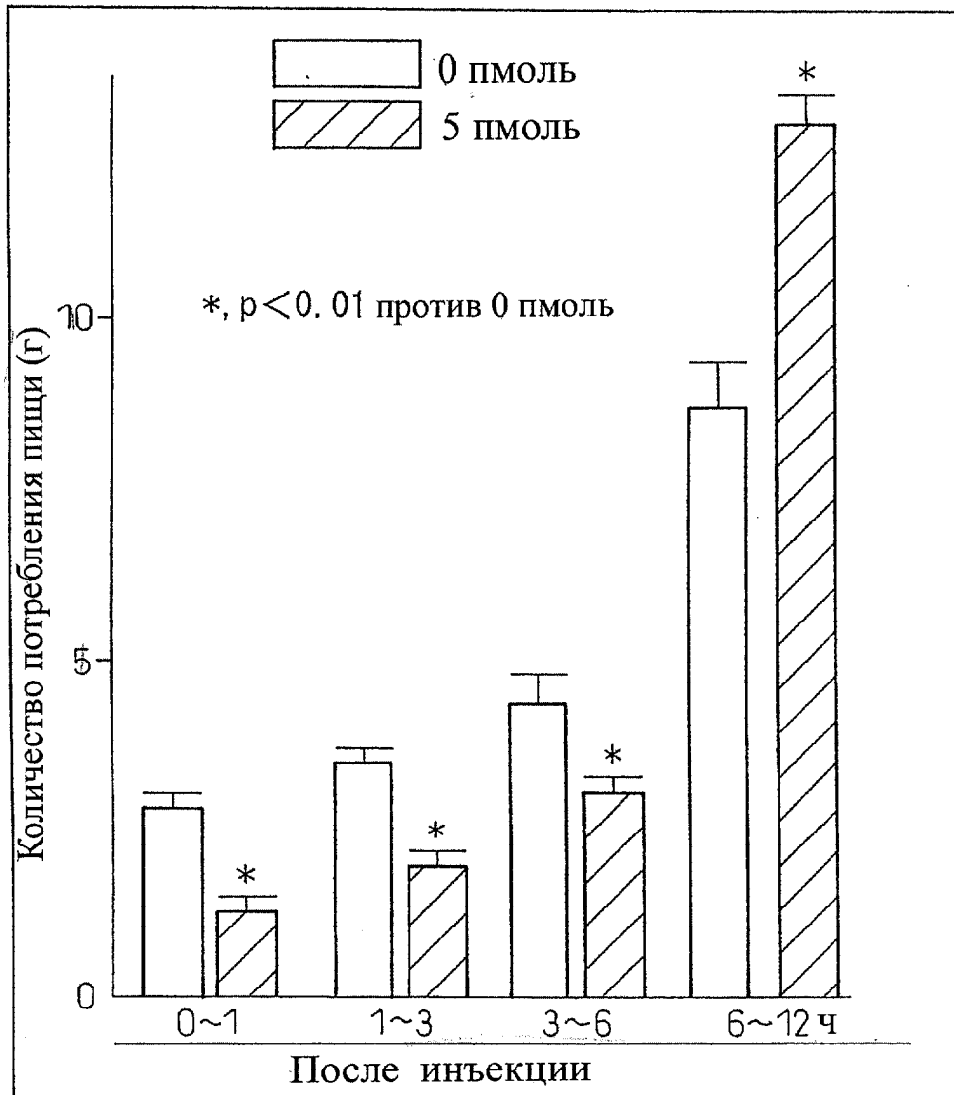
Фиг. 22



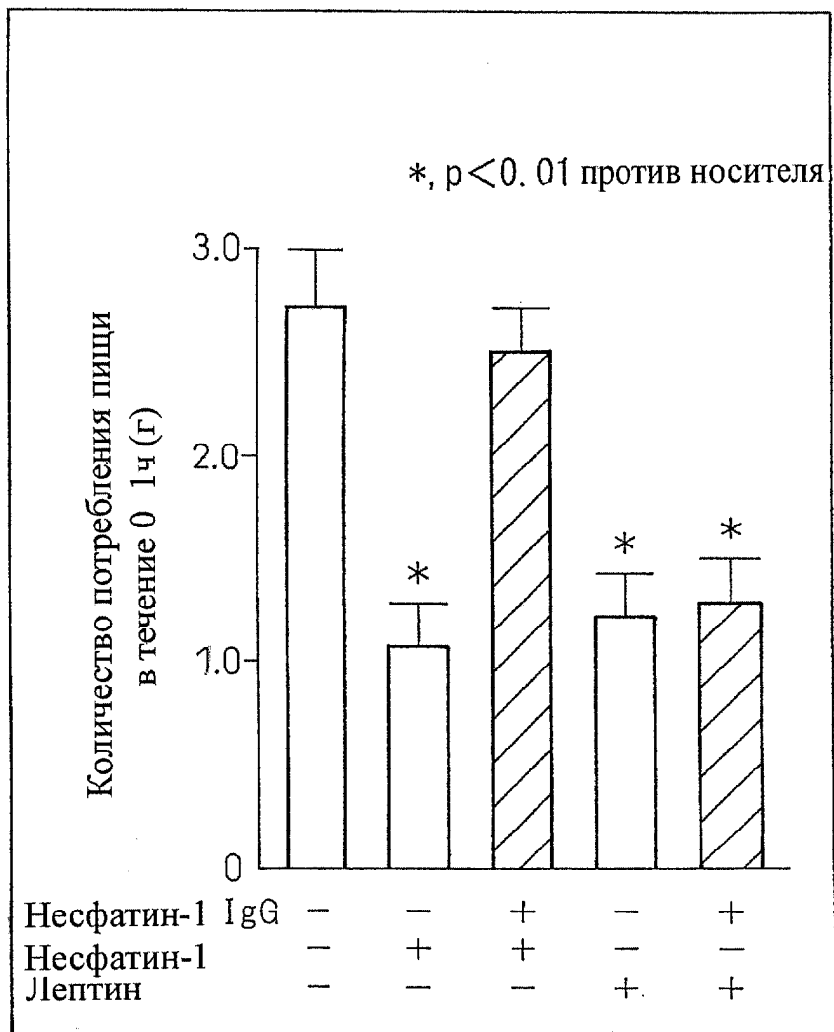
Фиг. 23



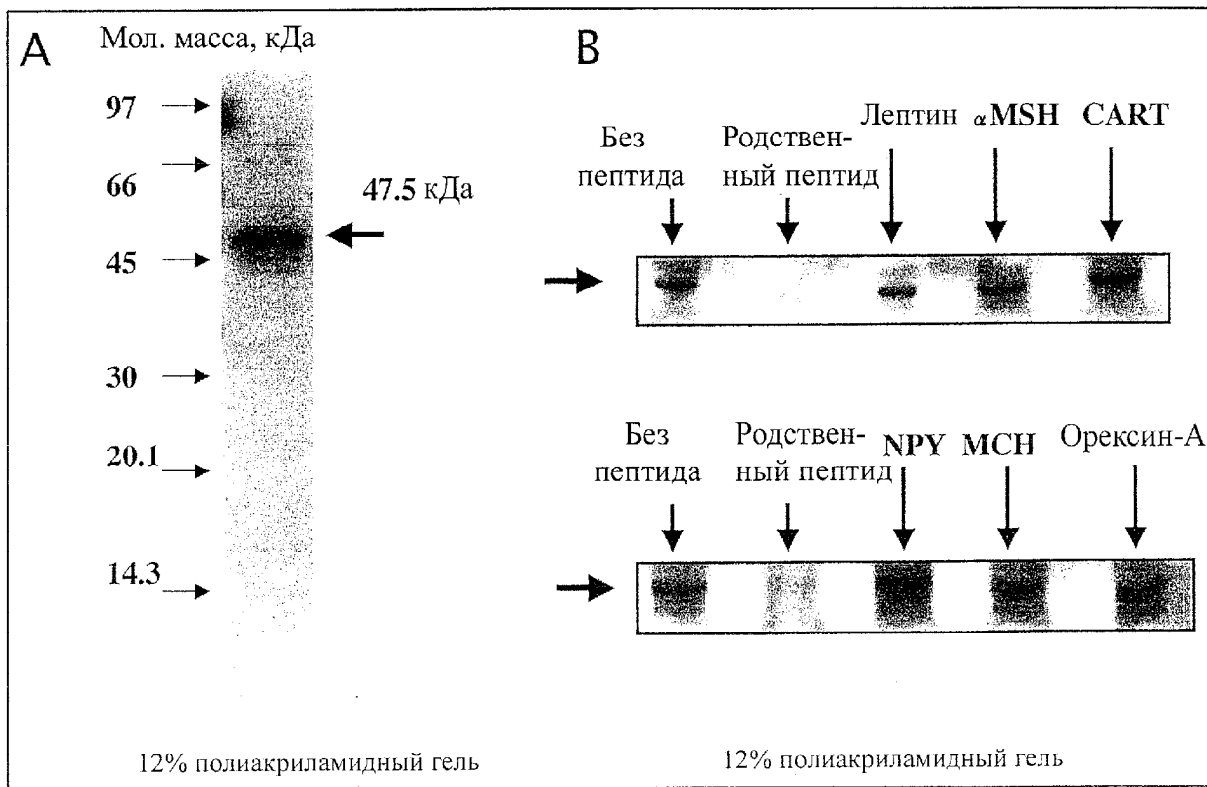
Фиг. 24



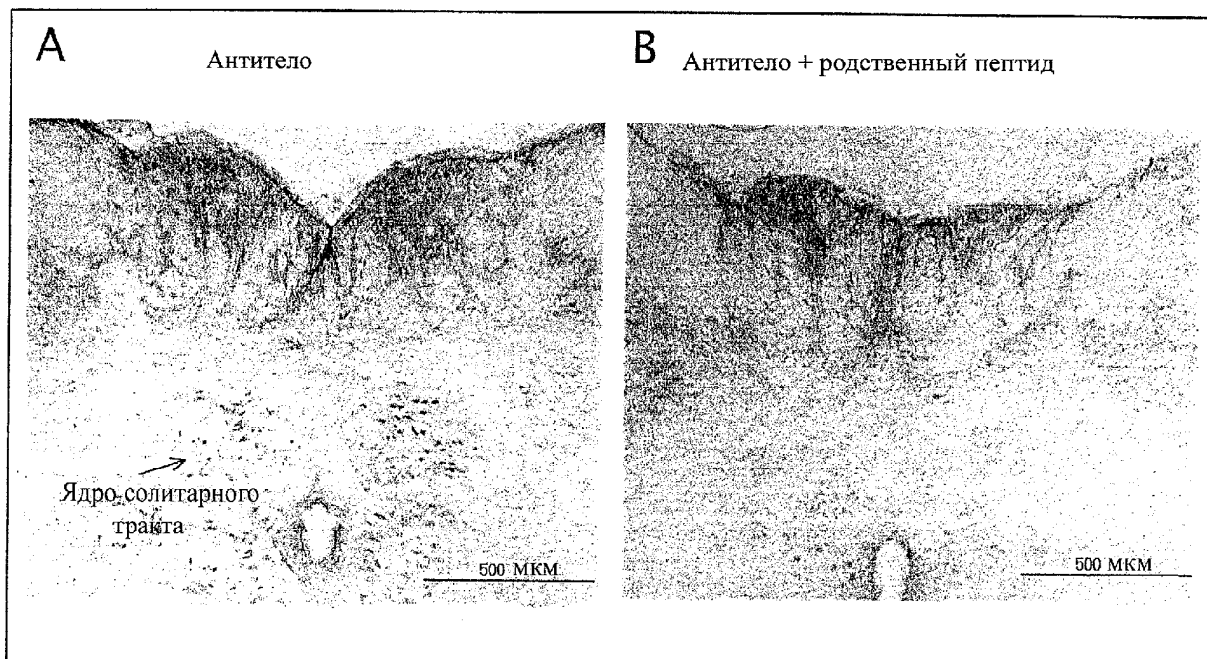
Фиг. 25



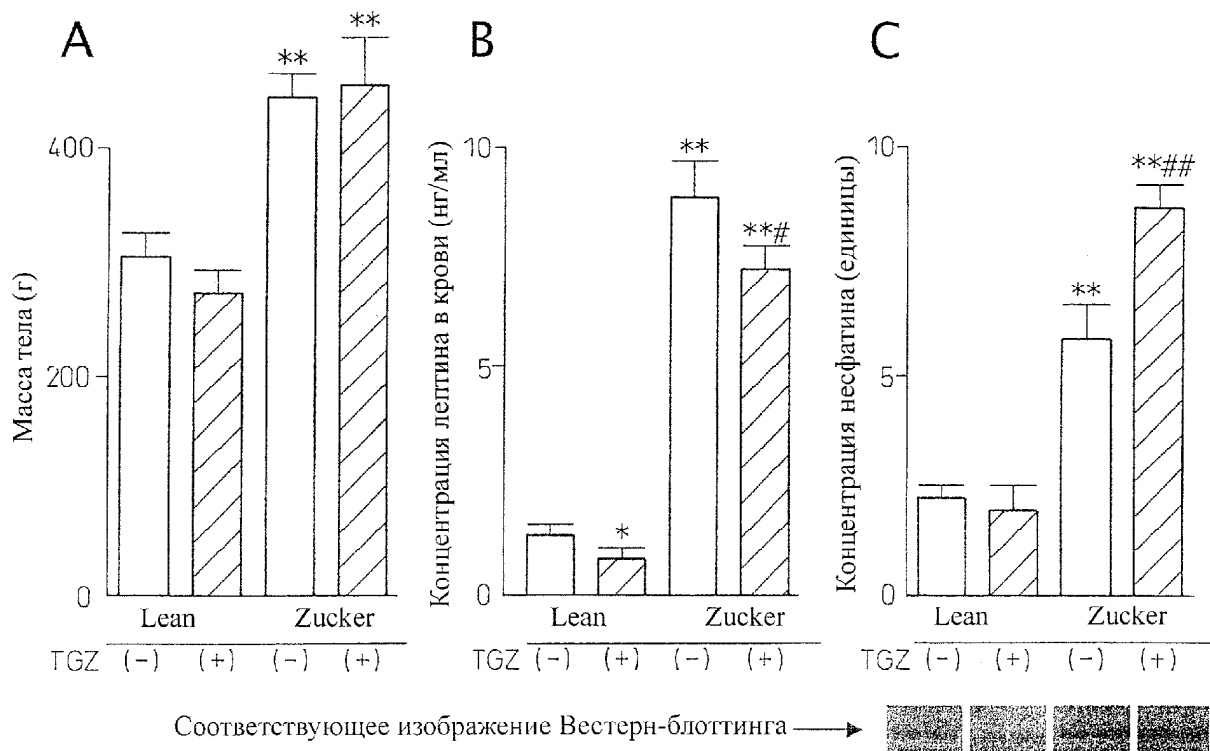
Фиг. 26



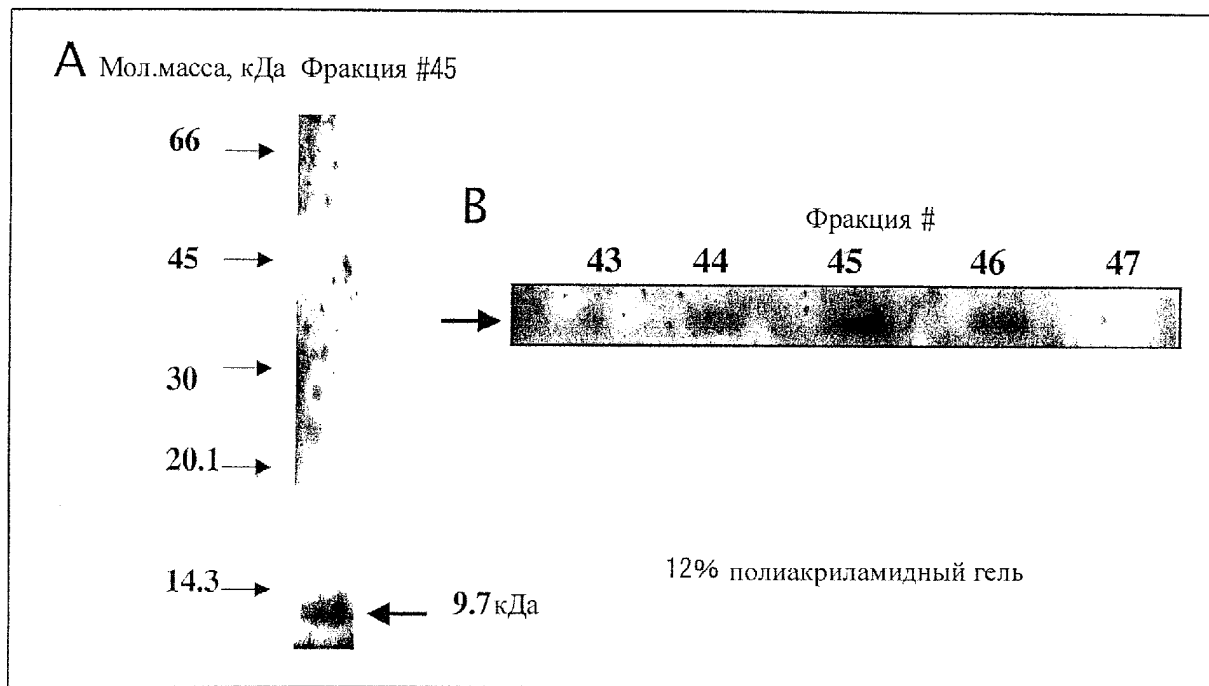
Фиг. 27



Фиг. 28

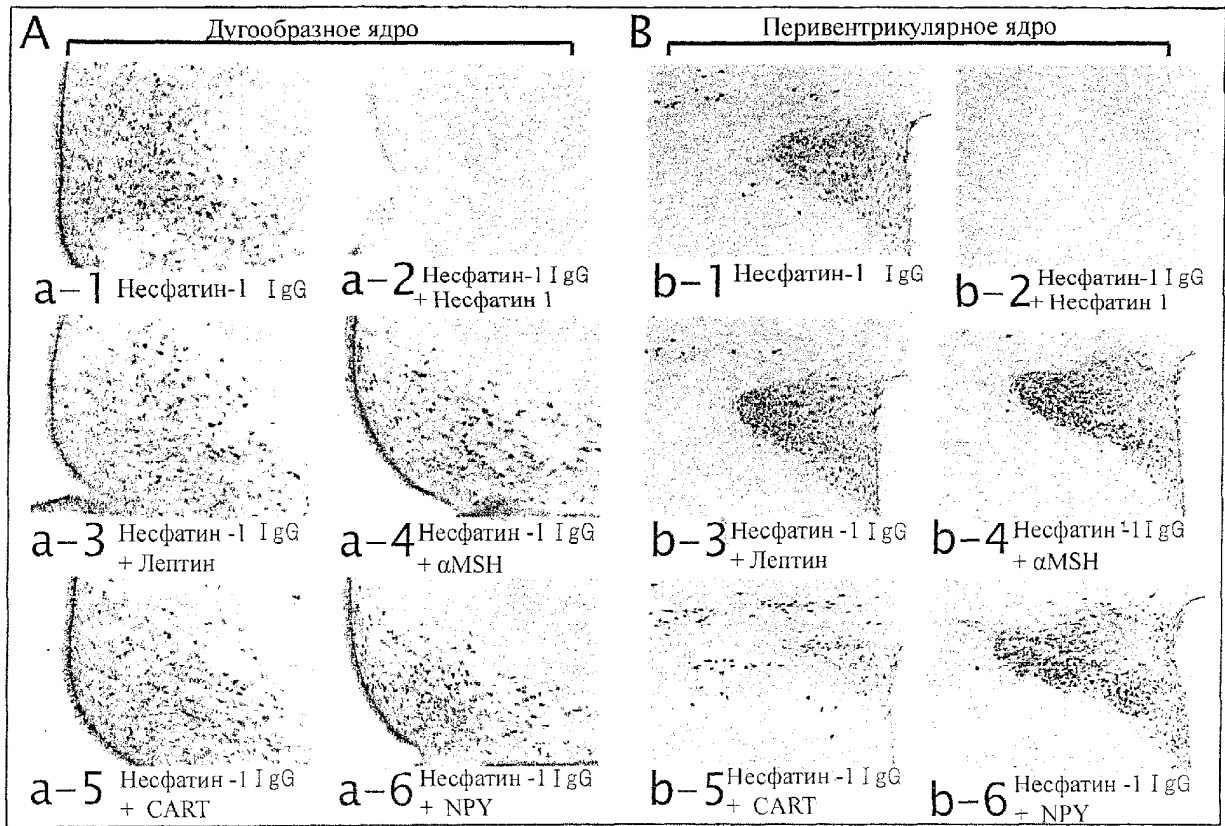


Фиг. 29

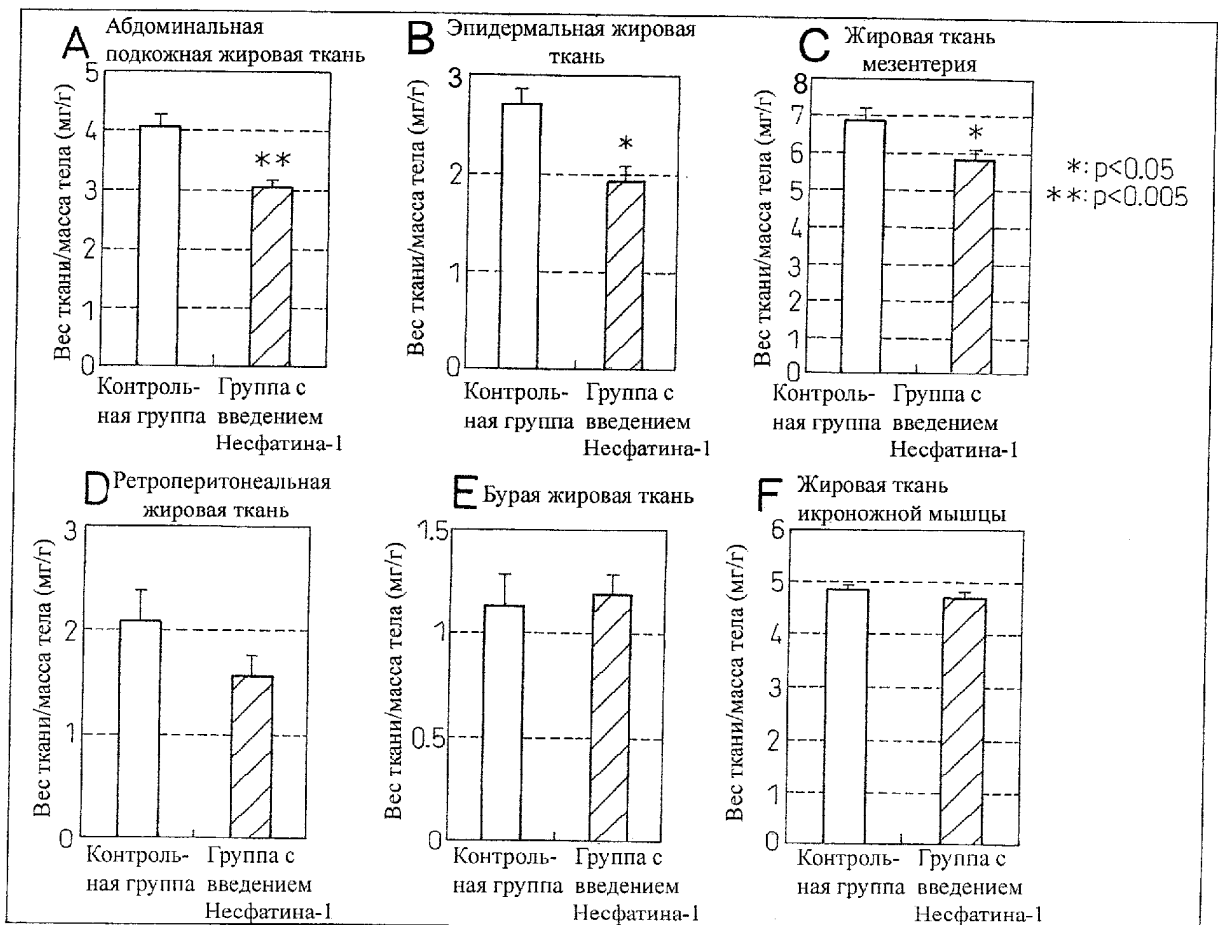


Фиг. 30

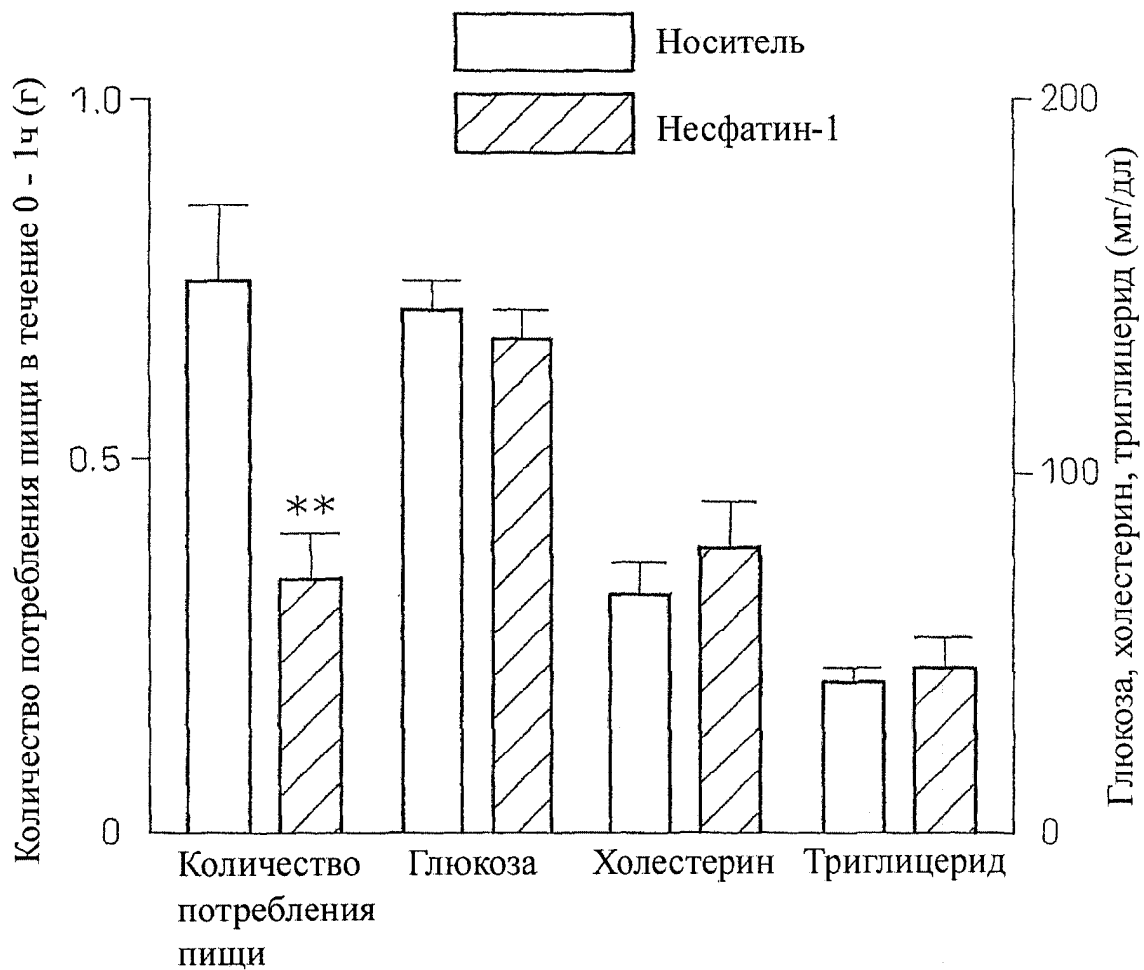




Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33