

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502432

(P2004-502432A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 5 0
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 138 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-508037 (P2002-508037)	(71) 出願人	591063187
(86) (22) 出願日	平成13年7月4日 (2001.7.4)		バイエル アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月6日 (2003.1.6)		ドイツ連邦共和国 レーフエルクーゼン (
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/007632		番地なし)
(87) 国際公開番号	W02002/002797		D-51368 Leverkusen,
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002.1.10)		Germany
(31) 優先権主張番号	60/216, 350	(74) 代理人	100062144
(32) 優先日	平成12年7月5日 (2000.7.5)		弁理士 青山 稜
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100086405
(31) 優先権主張番号	60/231, 295		弁理士 河宮 治
(32) 優先日	平成12年9月8日 (2000.9.8)	(74) 代理人	100068526
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田村 恭生
		(74) 代理人	100103230
			弁理士 高山 裕貢
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト11β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ1様酵素の調節

(57) 【要約】

ヒト11β-ヒドロキシステロイド デヒドロゲナーゼ1様酵素を調節する試薬、及びヒト11β-ヒドロキシステロイド デヒドロゲナーゼ1様酵素遺伝子産物と結合する試薬は、CNS障害、骨粗鬆症、肝疾患、肥満症、血圧異常または胎児発育異常、及び糖尿病（これらに制限されるわけではない）を含む機能障害又は疾患を予防し、回復し、または癒す役割を果たすことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 1 - H S D 1 様酵素ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、
 a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 % 一致するアミノ酸配列 ; および
 配列番号 2 に示すアミノ酸配列、から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む 1 1 -
 H S D 1 様酵素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
 b) 配列番号 1 に記載の配列を含むポリヌクレオチド、
 c) (a) および (b) に明記するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイ
 ブリダイズするポリヌクレオチド、
 d) 遺伝コードの縮重のため、その配列が (a) ~ (c) に明記するポリヌクレオチド配
 列から逸脱しているポリヌクレオチド、並びに
 e) (a) ~ (d) に明記するポリヌクレオチド配列の断片、誘導体またはアレル変異体
 を表すポリヌクレオチド、
 から成る群より選択されるポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによってコードされている、実質上精製された 1 1
 - H S D 1 様酵素ポリペプチド。

20

【請求項 5】

a) 請求項 3 に記載の宿主細胞を、 1 1 - H S D 1 様酵素ポリペプチドの発現に好適な
 条件下で培養する工程 ; および、
 b) 該宿主細胞培養から 1 1 - H S D 1 様酵素ポリペプチドを回収する工程、
 を含む、 1 1 - H S D 1 様酵素ポリペプチドを生産する方法。

【請求項 6】

a) 請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドを生物試料の核酸材料とハイブリダイズさ
 せ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成させる工程 ; および、
 b) 該ハイブリダイゼーション複合体を検出する工程、
 を含む、生物試料中の 1 1 - H S D 1 様酵素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチ
 ドを検出するための方法。

30

【請求項 7】

ハイブリダイゼーション前に、生物試料の核酸材料を増幅させる、請求項 6 に記載の方法
 。

【請求項 8】

生物試料を、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載の 1 1 - H S D
 1 様酵素ポリペプチドと特異的に相互作用する試薬と接触させる工程を含む、請求項 1 に
 記載のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載の 1 1 - H S D 1 様酵素ポリペプチドを
 検出するための方法。

40

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の方法を実施するための診断キット。

【請求項 10】

被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドによってコードされている任意
 の 1 1 - H S D 1 様酵素ポリペプチドと接触させる工程 ;
 該 1 1 - H S D 1 様酵素ポリペプチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、
 を含む 1 1 - H S D 1 様酵素の活性を低下させる物質をスクリーニングする方法であっ
 て、該ポリペプチドと結合する被験化合物を、 1 1 - H S D 1 様酵素の活性を低下させ
 る可能性のある治療物質として同定する方法。

50

【請求項 1 1】

被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドによってコードされる 1 1 - H S D 1 様酵素ポリペプチドと接触させる工程；および、
該ポリペプチドの 1 1 - H S D 1 様酵素活性を検出する工程、
を含む 1 1 - H S D 1 様酵素の活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、
1 1 - H S D 1 様酵素活性を増大させる被験化合物を 1 1 - H S D 1 様酵素の活性を増大させる可能性のある治療物質として同定し、そして該ポリペプチドの 1 1 - H S D 1 様酵素活性を減少させる被験化合物を 1 1 - H S D 1 様酵素の活性を減少させる可能性のある治療物質として同定する方法。

【請求項 1 2】

被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドと接触させ、該ポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合を検出する工程を含む、1 1 - H S D 1 様酵素の活性を減少させる物質をスクリーニングする方法であって、該ポリヌクレオチドに結合する被験化合物を 1 1 - H S D 1 様酵素の活性を減少させる可能性のある治療物質として同定する方法。

10

【請求項 1 3】

細胞を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載の 1 1 - H S D 1 様酵素ポリペプチドと特異的に結合する試薬と接触させ、それにより 1 1 - H S D 1 様酵素の活性を減少させる工程を含む、1 1 - H S D 1 様酵素の活性を減少させる方法。

20

【請求項 1 4】

請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれかに記載の方法によって同定される、1 1 - H S D 1 様酵素ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を調整する試薬。

【請求項 1 5】

請求項 2 に記載の発現ベクターまたは請求項 1 4 に記載の試薬および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 1 6】

疾患において 1 1 - H S D 1 様酵素の活性を調整する、請求項 1 5 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 1 7】

該疾患が、C N S 障害、骨粗鬆症、肝疾患、肥満症、血圧異常または胎児発育異常、および糖尿病である、請求項 1 6 に記載の使用。

30

【請求項 1 8】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする c D N A。

【請求項 1 9】

配列番号 1 を含む、請求項 1 8 に記載の c D N A。

【請求項 2 0】

配列番号 1 から成る、請求項 1 8 に記載の c D N A。

【請求項 2 1】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

40

【請求項 2 2】

該ポリヌクレオチドが配列番号 1 から成る、請求項 2 1 に記載の発現ベクター。

【請求項 2 3】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 4】

該ポリヌクレオチドが配列番号 1 から成る、請求項 2 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 5】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチド。

50

【請求項 26】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列から成る、請求項 25 に記載の精製されたポリペプチド。

【請求項 27】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 28】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする発現ベクターを含む宿主細胞を、該ポリペプチドが発現される条件下で培養し；そして該ポリペプチドを単離する工程を含む、該ポリペプチドを生産する方法。

【請求項 29】

該発現ベクターが配列番号 1 を含む、請求項 28 に記載の方法。

10

【請求項 30】

配列番号 1 に記載の 11 個の連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを、生物試料の核酸材料とハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成させ；そして、該ハイブリダイゼーション複合体を検出する工程を含む、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドのコード配列を検出する方法。

【請求項 31】

ハイブリダイズさせる工程の前に、該核酸材料を増幅させる工程をさらに含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

配列番号 1 に記載の 11 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；および、請求項 30 に記載の方法についての説明書、を含む、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドのコード配列を検出するためのキット。

20

【請求項 33】

生物試料を、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する試薬と接触させて、試薬 - ポリペプチド複合体を形成させる工程；および、該試薬 - ポリペプチド複合体を検出する工程、を含む、該ポリペプチドを検出するための方法。

【請求項 34】

該試薬が抗体である、請求項 33 に記載の方法。

30

【請求項 35】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する抗体；および請求項 33 に記載の方法についての説明書、を含む、該ポリペプチドを検出するためのキット。

【請求項 36】

被験化合物を、(1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 50% 一致するアミノ酸配列、および(2) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列、から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させる工程；および該ポリペプチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、を含むヒト 11 - HSD1 様酵素の活性を調整することができる物質をスクリーニングするための方法であって、該ポリペプチドに結合する被験化合物をヒト 11 - HSD1 様酵素の活性を調節する可能性のある物質として規定する方法。

40

【請求項 37】

接触させる工程が細胞においてである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

インビトロにおける細胞である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

接触させる工程が無細胞系においてである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

該ポリペプチドが検出可能な標識を含む、請求項 36 に記載の方法。

50

【請求項 4 1】

被験化合物が検出可能な標識を含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 2】

被験化合物が該ポリペプチドと結合している標識化リガンドに取って代わる、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 3】

該ポリペプチドが固体支持体と結合している、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 4】

被験化合物が固体支持体と結合している、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 5】

被験化合物を、(1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 50% 一致するアミノ酸配列、および、(2) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列、から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させる工程；および

該ポリペプチドの活性を検出する工程、

を含むヒト 11 - HSD 1 様酵素の活性を調整する物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドの活性を増大させる被験化合物を、ヒト 11 - HSD 1 様酵素の活性を増大させる可能性のある物質として同定し、該ポリペプチドの活性を減少させる被験化合物を、ヒト 11 - HSD 1 様酵素の活性を減少させる可能性のある物質として同定する方法。

10

【請求項 4 6】

接触させる工程が細胞においてである、請求項 4 5 に記載の方法。

20

【請求項 4 7】

インビトロにおける細胞である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

接触させる工程が無細胞系においてである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 9】

被験化合物を、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる産物と接触させる工程；および

該産物に対する被験化合物の結合を検出する工程、

を含むヒト 11 - HSD 1 様酵素の活性を調整する物質をスクリーニングする方法であって、該産物に結合する被験化合物をヒト 11 - HSD 1 様酵素の活性を調節する可能性のある物質として同定する方法。

30

【請求項 5 0】

該産物がポリペプチドである、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

該産物が RNA である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

細胞を、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる産物と特異的に結合する試薬と接触させ、それによりヒト 11 - HSD 1 様酵素の活性を減少させる工程を含む、ヒト 11 - HSD 1 様酵素の活性を減少させる方法。

40

【請求項 5 3】

該産物がポリペプチドである、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

該産物が抗体である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

該産物が RNA である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 6】

該試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

該試薬がリボザイムである、請求項 5 6 に記載の方法。

50

【請求項 58】

インビトロにおける細胞である、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 59】

該細胞がインビボにおいてである、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 60】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する試薬；および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 61】

該試薬が抗体である、請求項 60 に記載の医薬組成物。

【請求項 62】

配列番号 1 に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの産物と特異的に結合する試薬；および製薬的に許容し得る担体を含む医薬組成物。

10

【請求項 63】

該試薬がリボザイムである、請求項 62 に記載の医薬組成物。

【請求項 64】

該試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 62 に記載の医薬組成物。

【請求項 65】

該試薬が抗体である、請求項 62 に記載の医薬組成物。

【請求項 66】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする発現ベクター；および製薬的に許容し得る担体を含む医薬組成物。

20

【請求項 67】

該発現ベクターが配列番号 1 を含む、請求項 66 に記載の医薬組成物。

【請求項 68】

CNS 障害、骨粗鬆症、肝疾患、肥満症、血圧異常または胎児発育異常、および糖尿病より選択される 11 β -HSD1 様酵素機能障害関連疾患を処置する方法であって、それを必要とする患者に、ヒト 11 β -HSD1 様酵素の機能を調整する試薬の治療的有効量を投与し、それにより 11 β -HSD1 様酵素機能障害関連疾患の症状を回復させる方法。

【請求項 69】

該試薬が請求項 36 に記載の方法によって同定される、請求項 68 に記載の方法。

30

【請求項 70】

該試薬が請求項 45 に記載の方法によって同定される、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 71】

該試薬が請求項 49 に記載の方法によって同定される、請求項 68 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、ヒト 11 β -ヒドロキシステロイド デヒドロゲナーゼ 1 様酵素の調節に関する。

【0002】

(背景技術)

グルココルチコイドの組織内レベルは、酵素 11 β -ヒドロキシステロイド デヒドロゲナーゼによって調整されている。この酵素の 2 つのイソ型が単離されている。タイプ I 酵素 (11 β -HSD1) は、不活性な 11 β -ケト代謝物であるコルチゾン及び 11 β -デヒドロコルチコステロンから、それぞれ活性なグルココルチコイドであるコルチゾール (ヒトにおいて) またはコルチコステロン (げっ歯類において) を形成させるオキシレダクターゼとして主に作用する二機能性酵素である (Agurwalら、J. Biol. Chem. 264, 18939-46, 1989)。タイプ II イソ型 (11 β -HSD2) は非間接的に (unindirectionally) 作用し、不活性な 11 β -ケト代謝物を産する。これは NAD を利用してグルココルチコイドを、グルココルチコイドおよび

40

50

ミネラルコルチコイド受容体に対して親和性の低い11-ケト化合物に代謝する(Albistonら、Molec. Cell Endocr 105, R11-17, 1994; Funderら、Science 242, 583-85, 1988; Edwardsら、Lancet 2, 986-89, 1988)。

【0003】

マウスの遺伝子欠失実験は、この酵素が正常な血清グルココルチコイドレベルを維持するのに重要であり、かつ鍵となる肝臓糖新生酵素の活性化に関与することを示している。他の重要な作用部分としては、網脂肪(omental fat)、卵巣、腎臓、脳および脈管構造が挙げられる(Koozowskyら、J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69, 391-401, 1999)。11-HSD1活性は、10
 主要な血管や心臓の全てに見られ、抵抗血管ではその活性はより高い、このことは11-HSD1が血圧を調整する働きがあることを意味している(Walkerら、Endocrinol. 129, 3305-12, 1991)。11-HSD1 mRNAおよび11-HSD2 mRNAは、11-HSD1イソ型が優位な状態で、ラットの大動脈内皮細胞に併存している(Bremら、Hypertension 31, 459-62, 1998)。11-HSD1活性を選択的に阻害することで、大動脈環(リング)におけるフェニレフリンおよびアンジオテンシンIIの収縮効果が減弱される(Bremら、Hypertension 30, 449-54, 1997)。

【0004】

11-HSD1酵素は肝臓において最も濃度が高い。ヒト肝臓における免疫組織化学研究は、11-HSD1が中心静脈付近で濃縮されていることを示している(Rickettsら、J. Endocrinol. 156, 159-68, 1998)。肝臓11-HSD1は解毒機構に関与する(Oppermanら、Eur. J Biochem. 227, 202-08, 1995)。2つの11-HSD1イソ型のレベルは、胎児脳の発育過程で異なり、そして変化する。11-HSD1は、ラット腎臓およびヒト胎盤に大量に存在するが、経口避妊薬を接種している女性では低レベルである(Mol. Cell. Endocrin. 101, 121-27, 1999のKoozowskyによる総括を参照のこと)。

【0005】

ラット肝臓における11-HSD1 mRNAは、新生仔では低レベルで存在し、8週齢では増加してプラトーに達する(Koozowskiら、1990)。雄は、雌よりも約20倍以上の11-HSD1 mRNAを有しており、雌のそのレベルはエストラジオールおよび成長ホルモンによって抑制されている(Lowら、J. Endocrinol. 143, 541-48, 1994; Albistonら、Mol. Cell. Endocrinol. 109, 183-88, 1995)。

【0006】

11-HSD1発現に影響を及ぼす因子は知られている。肝癌細胞系2SFAZAにおける11-HSD1活性およびmRNA発現は、デキサメタゾンにより増大し、フォルスコリンやインスリン様成長因子1によって低下する(Voiceら、Biochem J. 317, 621-25, 1996)。ラット肝細胞やヒト肝細胞における研究では、40
 甲状腺ホルモンおよびプロゲステロンが11-HSD1活性に対して種特異的効果を発揮するが、メッセージレベルでは効果がないことが示された(Rickettsら、J. Clin. Endocrinol. Metab. 83, 1325-35, 1998)。晩期妊娠のラットをデキサメタゾンに曝す結果、子孫の成体の11-HSD1が変化することなく、グルココルチコイド受容体およびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼが有意に増加する(Nyirendaら、J. Clin. Invest. 101, 2174-81, 1998)。

【0007】

11-HSD1発現やその調節が、微妙な均衡状態にあり、組織および発育段階に特異的であることは、明らかである。例えば、発育段階特異的または組織特異的アゴニスト/

10

20

30

40

50

アンタゴニストを介して、治療効果を発揮するように調節できる類似の酵素をさらに同定する必要がある。

【0008】

(発明の概要)

本発明の目的は、ヒト11 - HSD1様酵素を調節する試薬および方法を提供することである。本発明のこの目的および他の目的は、以下に記載の1つまたはそれ以上の実施例により提供される。

【0009】

本発明の1つの態様は、配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも約50%一致するアミノ酸配列；および、配列番号2に示すアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、11 - HSD1様酵素ポリペプチドである。

10

【0010】

本発明のさらに別の態様は、細胞外基質(マトリックス)分解を低下させる物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約50%一致するアミノ酸配列；および、配列番号2に示すアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、11 - HSD1様酵素ポリペプチドと接触させる。

【0011】

被験化合物と11 - HSD1様酵素ポリペプチドとの間の結合を検出する。それにより、11 - HSD1様酵素ポリペプチドと結合する被験化合物を、細胞外マトリックス分解を低下させる可能性のある物質として同定する。この物質は11 - HSD1様酵素の活性を低下させることによって作用できる。

20

【0012】

本発明の別の態様は、細胞外マトリックス分解を低下させる物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%一致するヌクレオチド配列；および、配列番号1に示すヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む11 - HSD1様酵素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、と接触させる。

【0013】

該ポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合を検出する。該ポリヌクレオチドと結合する被験化合物を、細胞外マトリックス分解を低下させる可能性のある物質として同定する。該物質は、11 - HSD1様酵素 mRNA との相互作用を通じて11 - HSD1様酵素の量を低下させることによって作用できる。

30

【0014】

本発明の別の態様は、細胞外マトリックス分解を調節する物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約50%一致するアミノ酸配列；および、配列番号2に示すアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む11 - HSD1様酵素ポリペプチド、と接触させる。

40

【0015】

該ポリペプチドの11 - HSD1様酵素活性を検出する。それにより、被験化合物の非存在下における11 - HSD1様酵素活性と比較して、該ポリペプチドの11 - HSD1様酵素活性を増大させる被験化合物を、細胞外マトリックス分解を増大させる可能性のある物質として同定する。それにより、被験化合物の非存在下における11 - HSD1様酵素活性と比較して、該ポリペプチドの11 - HSD1様酵素活性を低下させる被験化合物を、細胞外マトリックス分解を低下させる可能性のある物質として同定する。

【0016】

本発明のさらなる別の態様は、細胞外マトリックス分解を低下させる物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、

50

配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と少なくとも約 50% 一致するヌクレオチド配列；および、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの 11 - HSD1 様酵素産物、と接触させる。

【0017】

該 11 - HSD1 様酵素産物に対する被験化合物の結合を検出する。それにより、11 - HSD1 様酵素産物と結合する被験化合物を、細胞外マトリックス分解を低下させる可能性のある物質として同定する。

【0018】

本発明のもっと別の態様は、細胞外マトリックス分解を減少させる方法である。細胞を、11 - HSD1 様酵素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと特異的に結合する試薬、または、

10

配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と少なくとも約 50% 一致するヌクレオチド配列；および、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされている産物、と接触させる。

【0019】

それにより、細胞における 11 - HSD1 様酵素活性を低下させる。

【0020】

従って、本発明は、ヒト 11 - HSD1 様酵素の作用部位で例えばアゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得る被験化合物を同定するのに用いることができる、ヒト 11 - HSD1 様酵素を提供する。ヒト 11 - HSD1 様酵素およびその断片もまた、該酵素をブロックし、その活性を効果的に減少させ得る特異的な抗体を産生せるのに有用である。

20

【0021】

(発明の詳しい説明)

本発明は、11 - HSD1 様酵素ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、

a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 50% 一致するアミノ酸配列；および、配列番号 2 に示すアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む 11 - HSD1 様酵素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

30

b) 配列番号 1 に記載の配列を含むポリヌクレオチド、

c) (a) および (b) に明記するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

d) 遺伝コードの縮重のため、その配列が (a) ~ (c) に明記するポリヌクレオチド配列から逸脱しているポリヌクレオチド、並びに

e) (a) ~ (d) に明記するポリヌクレオチド配列の断片、誘導体またはアレル変異体を表すポリヌクレオチド、

から成る群より選択されるポリヌクレオチド、に関する。

【0022】

さらに、本出願人は、新規 11 - HSD1 様酵素、特にヒト 11 - HSD1 様酵素が本発明の発見であることを、本出願により見出した。ヒト 11 - HSD1 様酵素には、配列番号 2 に示すアミノ酸配列 (ジーンバンク アクセッションナンバー AW163684) が含まれる。ヒト 11 - HSD1 様酵素はヒト配列を検索することで、ラット副腎皮質 (コルチコ) ステロイド 11 デヒドロゲナーゼ (配列番号 3、スイスプロット アクセッションナンバー P16232) と同定した。ヒト 11 - HSD1 様酵素は、スイスプロット アクセッションナンバー P16232 (図 7) と同一のラットタンパク質と、86 アミノ酸にわたって 43% 一致する。従って、本発明のヒト 11 - HSD1 様酵素は、以前に同定されたヒドロキシステロイド デヒドロゲナーゼと同じ目的、例えば種々の組織および胎児発育期間のステロイドレベルを慎重に均衡を保たせるのに有用であると期待される。さらに、ステロイド調節は、骨粗鬆症に重要な働きをすると期待される。

40

50

このように、ヒト 11 - HSD 1 様酵素は、CNS 障害、骨粗鬆症、血圧障害または胎児発育障害、および糖尿病などの障害を処置するための治療法に用いることができる。また、ヒト 11 - HSD 1 様酵素は、ヒト 11 - HSD 1 様酵素アゴニストおよびアンタゴニストをスクリーニングするのに用いることができ、そして診断方法に用いることができる。

【0023】

ポリペプチド

本発明に係る 11 - HSD 1 様ポリペプチドには、配列番号 2 に示すアミノ酸配列、または以下定義による生物学的に活性なその変異体より選択される、少なくとも 14、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、150、125、200 または 220 個の連続アミノ酸が含まれる。したがって、本発明の 11 - HSD 1 様ポリペプチドは、11 - HSD 1 様酵素タンパク質の一部、完全長の 11 - HSD 1 様酵素タンパク質、または 11 - HSD 1 様酵素タンパク質の全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。

10

【0024】

生物学的に活性な変異体

生物学的活性がある、即ちコルチゾールとコルチゾンとを相互交換する能力を保持している 11 - HSD 1 様ポリペプチド変異体のもまた、11 - HSD 1 様ポリペプチドである。天然または非天然 11 - HSD 1 様ポリペプチド変異体は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 44、50、55、60、65 または 70%、好ましくは、約 75、80、85、90、96、96 または 98% 一致するアミノ酸配列またはその断片を有することが好ましい。推定される 11 - HSD 1 様ポリペプチド変異体と配列番号 2 に記載のアミノ酸配列との間の一致パーセントは、Blast2 整列 (アライメント) プログラム (Bl o s u m 6 2 , E x p e c t 1 0 , s t a n d a r d g e n e t i c c o d e s) を用いて決定される。

20

【0025】

一致パーセントの変異は、例えばアミノ酸置換、挿入または欠失に起因し得る。アミノ酸置換は 1 対 1 のアミノ酸の置き換えとして定義される。置換されたアミノ酸が類似の構造のおよび/または化学的性質を有する場合、置換は事実上保存的である。保存的置換の例は、イソロイシンまたはバリンによるロイシンの置換、グルタメートによるアスパルテートの置換、またはセリンによるスレオニンの置換である。

30

【0026】

アミノ酸挿入または欠失はアミノ酸配列への、またはその内部での変化である。これらは典型的には約 1 ~ 5 アミノ酸の範囲で起こる。11 - HSD 1 様ポリペプチドの生物学的または免疫学的活性を破壊することなく、どのアミノ酸残基が置換、挿入または欠失できるかを決定する際の指針は、当分野で周知のコンピュータープログラム、例えば DNA STAR ソフトウェアを用いて見出すことができる。あるアミノ酸変化が生物学的に活性な 11 - HSD 1 様ポリペプチドに影響するか否かは、例えば以下の具体的実施例に記載のように、コルチゾンからコルチゾールへの変換を検定することにより容易に決定できる。

40

【0027】

融合タンパク質

融合タンパク質は、11 - HSD 1 様ポリペプチドアミノ酸配列に対する抗体の作製に、そして様々な検定系での使用に有用である。例えば、融合タンパク質は、11 - HSD 1 様ポリペプチドの一部と相互作用するタンパク質の同定に使用できる。タンパク質親和クロマトグラフィーまたはタンパク質 - タンパク質相互作用のためのライブラリーに基づく検定、例えば酵母 2 - ハイブリッドまたはファージディスプレイ系をこの目的のために使用できる。このような方法は当分野で周知であり、薬物スクリーニングとしても使用できる。

【0028】

50

11 - HSD1様ポリペプチド融合タンパク質は、ペプチド結合により互いに融合した二つのポリペプチドセグメントを含んでいる。第一のポリペプチドセグメントは、配列番号2または上記のような生物学的に活性な変異体の少なくとも14、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、150、125、200または250個の連続アミノ酸を含む。第一のポリペプチドセグメントはまた、完全長11 - HSD1様酵素タンパク質を含み得る。

【0029】

第二のポリペプチドセグメントは完全長タンパク質またはタンパク質断片であってよい。融合タンパク質の構築に一般的に使用するタンパク質は、 - ガラクトシダーゼ、 - グルクロニダーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、自己蛍光タンパク質 (青色蛍光タンパク質 (BFP) を包含する)、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (GST)、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) を包含する。さらに、融合タンパク質の構築には、ヒスチジン (His) 標識、FLAG標識、インフルエンザヘマグルチニン (HA) 標識、Myc標識、VSV - G標識、およびチオレドキシニン (Trx) 標識を包含するエピトープ標識を使用する。その他の融合構築は、マルトース結合タンパク質 (MBP)、S - 標識、Lexa DNA結合ドメイン (DBD) 融合物、GAL4 DNA結合ドメイン融合物、および単純ヘルペスウイルス (HSV) BP16タンパク質融合物を包含する。また、融合タンパク質はさらに、11 - HSD1様ポリペプチドコード配列と非相同タンパク質配列の間に位置する開裂部位を含むよう組み立てることができ、その結果、この11 - HSD1様酵素ポリペプチドは、開裂され、非相同部分を無くすように精製できる。

【0030】

融合タンパク質は当分野で周知のように化学合成できる。好ましくは、融合タンパク質は二つのポリペプチドセグメントを共有結合で連結することにより、または分子生物学分野で標準的な方法により調製する。例えば、当分野で知られているように、第二のポリペプチドセグメントをコードしているヌクレオチドを有する適切なリーディングフレームに配列番号1、4、5、または6より選ばれるコード配列を含むDNA構築物を作製し、このDNA構築物を宿主細胞で発現させることによる組換えDNA法を用いて、融合タンパク質を調製できる。融合タンパク質構築用の多くのキットが、Promega Corporation (Madison, WI)、Stratagene (La Jolla, CA)、CLONTECH (Mountain View, CA)、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA)、およびQuantum Biotechnologies (Montreal, Canada; 1 - 888 - DNA - KITS) といった企業から入手できる。

【0031】

種相同体の同定

11 - HSD1様ポリペプチドのポリヌクレオチド (下記) を使用して他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングするために好適なプローブまたはプライマーを作製し、11 - HSD1様ポリペプチドの相同体をコードしているcDNAを同定し、そして当分野で周知のようにこのcDNAを発現させて、ヒト11 - HSD1様ポリペプチドの種相同体を得ることができる。

【0032】

ポリヌクレオチド

ヒト11 - HSD1様酵素アクセッションNo. のコード配列は、ジーンバンク アクセッションNo. AW163684 (配列番号1)、AW162782 (配列番号4)、AI554725 (配列番号5) およびAI436330 (配列番号6) によって同定されるヒトクローンに見出される。

【0033】

10

20

30

40

50

11 - HSD1様ポリペプチドは、一本鎖または二本鎖であってよく、11 - HSD1様ポリペプチドのコード配列またはそのコード配列の相補物を包含する。ヒト11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている縮重ヌクレオチド配列、および、配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50、55、60、65、70、好ましくは約75、90、96または98%一致するホモローガスなヌクレオチド配列もまた、11 - HSD1様ポリヌクレオチドである。二つのポリヌクレオチド配列間の配列一致パーセントは、ALIGNのようなコンピュータプログラムを用いて決定するが、これは、ギャップオープンペナルティー - 12およびギャップエクステンションペナルティー - 2によるアフィンギャップ検索を用いるFASTAアルゴリズムを使用するものである。相補的DNA (cDNA) 分子、種相同体および生物学的に活性な11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている11 - HSD1様ポリヌクレオチドの変異体もやはり11 - HSD1様ポリヌクレオチドである。

【0034】

ポリヌクレオチド変異体および相同体の同定

上記の11 - HSD1様ポリヌクレオチド変異体および相同体もまた11 - HSD1様ポリヌクレオチドである。典型的には、相同11 - HSD1様ポリヌクレオチド配列は、当分野で周知のように、ストリンジェントな条件下で候補ポリヌクレオチドを既知の11 - HSD1様ポリヌクレオチドにハイブリダイズさせることにより同定できる。例えば、以下の洗浄条件 - - 2X SSC (0.3M NaCl, 0.03Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.1% SDS、室温 2回、各々30分間；次いで2x SSC、0.1% SDS、50 1回、30分間；次いで2x SSC、室温 2回、各々10分間 - - を使用して、最大約25 - 30%の塩基対ミスマッチ (不対合) を含む相同配列を同定できる。より好ましくは、相同核酸鎖は15 - 25%の塩基対ミスマッチを、さらに好ましくは5 - 15%の塩基対ミスマッチを含む。

【0035】

本明細書に開示する11 - HSD1様ポリヌクレオチドの種相同体はさらに、適当なプローブまたはプライマーを作製し、他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることによって同定できる。11 - HSD1様ポリヌクレオチドのヒト変異体は、例えばヒトcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることにより同定できる。二本鎖DNAの T_m は相同性が1%低下する毎に1 - 1.5 低下することがよく知られている (Bonnerら、J. Mol. Biol. 81, 123 (1973))。故にヒト11 - HSD1様ポリヌクレオチドの変異体または他の種の11 - HSD1様ポリヌクレオチドは、推定の相同11 - HSD1様ポリヌクレオチドを、配列番号1、4、5または6に記載のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズさせて被験ハイブリッドを作製することによって同定できる。被験ハイブリッドの融解温度を完全に相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含むハイブリッドの融解温度と比較し、被験ハイブリッドの中の塩基対ミスマッチの数またはパーセントを算出する。

【0036】

ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件に従い11 - HSD1様ポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズするヌクレオチド配列もまた11 - HSD1様ポリヌクレオチドである。ストリンジェントな洗浄条件は当分野で周知且つ理解されており、例えばSambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd ed., 1989, 9.50 - 9.51頁に開示されている。

【0037】

典型的には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のためには、温度と塩濃度の組み合わせを、検討中のハイブリッドの理論的 T_m よりおよそ12 - 20 低くなるよう選択すべきである。配列番号1、4、5、または6に示すヌクレオチド配列を有する11 - HSD1様ポリヌクレオチドまたはその相同体と、それらのヌクレオチド配列のい

ずれか1つと少なくとも約50、好ましくは約75、90、96、または98%一致するポリヌクレオチド配列とのハイブリッドの T_m は、例えばBoltonおよびMcCarthy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1390 (1962)の式:

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\%G + C) - 0.63 (\% \text{ホルムアミド}) - 600/l,$$

[式中、 l = 塩基対で表したハイブリッドの長さ]

を用いて算出できる。

ストリンジェントな洗浄条件としては例えば、 $4 \times SSC$ (65)、または50%ホルムアミド、 $4 \times SSC$ (42)、または $0.5 \times SSC$ 、0.1% SDS (65)が挙げられる。高度ストリンジェントな洗浄条件は、例えば $0.2 \times SSC$ (65)などである。

10

【0038】

ポリヌクレオチドの調製

11 - HSD1様ポリヌクレオチドは、膜構成成分、タンパク質および脂質といった他の細胞成分を含まないよう単離できる。ポリヌクレオチドは細胞から調製でき、標準的核酸精製技術を用いて単離、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のような増幅技術を用いて合成、もしくは自動合成機を用いることによって調製できる。ポリヌクレオチドを単離する方法は機械的であり、当分野で知られている。ポリヌクレオチドを取得するためこのような任意の技術を用いて、単離された11 - HSD1様ポリヌクレオチドを得ることができる。例えば、制限酵素およびプローブを用いて11 - HSD1様酵素ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド断片を単離できる。単離したポリヌクレオチドは他の分子を含まないか、あるいは少なくとも70、80、または90%含まない調製物である。

20

【0039】

11 - HSD1様酵素cDNA分子は、11 - HSD1様酵素mRNAを鋳型に用いて標準的分子生物学技術にて調製できる。その後11 - HSD1様酵素cDNA分子は、当分野で周知でありSambrookら。(1989)のようなマニュアルに開示される分子生物学技術を用いて複製できる。ヒトゲノムDNAまたはcDNAのいずれかを鋳型として使用して本発明に係るポリヌクレオチドのさらなるコピーを得るため、PCRのような増幅技術を用いることができる。

30

【0040】

別法として、合成化学技術を用いて11 - HSD1様ポリヌクレオチドを合成することもできる。遺伝コードの縮重により、配列番号2に示すアミノ酸配列を有する11 - HSD1様ポリペプチドまたはその生物学的に活性な変異体をコードする別のヌクレオチド配列の合成を可能にする。

【0041】

ポリヌクレオチド伸長

本明細書に開示する部分配列を用いて、それを導いた対応する完全長の遺伝子を同定することができる。当業者には周知の標識化法を使用して、この部分配列を、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて ^{32}P でニックトランスレーションまたは末端標識化することができる(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davisら、eds., Elsevier Press, N.Y., 1986)。ヒト組織から調製したライブラリーを、標識化目的配列を用いて直接スクリーニングすることができ、あるいは細菌コロニースクリーニングを容易にするため、そのライブラリーを一括してpBluescript(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif. 92037)に変換することができる(Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989, pg. 1.20)を参照のこと)。

40

【0042】

50

両方の方法は当分野で周知である。簡単には、pBlue scriptのライブラリーを含む細菌コロニーを適したフィルターまたは プラークを含む細菌ラウン (lawn) を変性させ、そのDNAをフィルターに固定する。そのフィルターを、Davisら、1986により表されたハイブリダイゼーション条件を用いて、標識化プローブでハイブリダイズさせる。 またはpBlue script中にクローニングした部分配列を陽性対照 (ポジティブコントロール)として用いることで、バックグラウンド結合を評価し、正確なクローン同定に必要なハイブリダイゼーションと洗浄のストリンジェンシー (厳格性) を調整することができる。得られたオートラジオグラムを、コロニーまたはプラークの複製プレートと比較する; 各々の曝露スポットが、陽性コロニーまたはプラークに相当する。そのコロニーまたはプラークを選び出して増殖させ、さらに分析およびシーケンシングを行なうために、コロニーからDNAを単離する。 10

【0043】

一方が部分配列由来のプライマー、もう一方がベクター由来のプライマーを用いたPCRを使用して、陽性cDNAクローンを分析し、それが含むさらなる配列含量を決定する。当初の部分配列よりも大きいベクター-挿入PCR産物を有するクローンを、制限酵素消化およびDNAシーケンシングして分析し、それらがノーザンブロット分析から決定されたmRNAサイズと同じサイズか、または類似の挿入物を含むか否かを決定する。

【0044】

一度、1つまたはそれ以上のオーバーラップcDNAクローンを同定すれば、そのクローンの完全配列を決定することができる。複、オーバーラップクローン (通常、それぞれのヌクレオチド部位にて3~5のオーバーラップ配列)の配列分析から、cDNA配列を決定する結果、非常に正確な最終配列を得る。 20

【0045】

PCRに基づく様々な方法を用いて、本明細書中に開示した核酸配列を伸長させ、プロモーターおよび調節要素といった上流配列を検出することができる。例えば制限部位PCRは、既知の座に隣接する未知配列を検索するため、ユニバーサルプライマーを使用する (Sarkar, PCR Methods Applic. 2, 318-322, 1993)。まず、ゲノムDNAを、リンカー配列に対するプライマーと既知領域に特異的なプライマーの存在下で増幅する。次に、増幅させた配列を、同じリンカープライマーと最初のもの内部にある別の特異的プライマーを用いて、第二回目のPCRを行なう。各回のPCR産物を適当なRNAポリメラーゼで転写し、かつ逆転写酵素を行いて配列決定する。 30

【0046】

既知領域に基づく異なる (ディバージェント) プライマーを用いて配列を増幅または伸長するために、逆PCRを使用することもできる (Trigliaら、Nucleic Acids Res. 16, 8186, 1988)。OLIGO 4.06 Primer Analysisソフトウェア (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn)のような市販ソフトウェアを用いて、長さ22-30ヌクレオチド長、50%またはそれ以上のGC含有量を持ち、約68-72の温度で標的配列とアニーリングするプライマーを設計できる。この方法は、幾つかの制限酵素を用いて、遺伝子の既知領域に適当な断片を作り出せる。次いでこの断片を分子内ライゲーションにより環化し、PCR鋳型として使用する。 40

【0047】

使用できるもう一つの方法は、ヒトおよび酵母人工染色体DNA中の既知配列に隣接するDNA断片のPCR増幅を含む、捕捉PCRである (Lagerstromら、PCR Methods Applic. 1, 111-119, 1991)。この方法では、作製した二本鎖配列を、PCRの実施前に当該DNA分子の未知断片中に入れるため、さらに複数の制限酵素消化とライゲーションを行うことができる。

【0048】

未知配列を回収するために使用できるもう一つの方法はParkerら、Nucleic Acids Res. 19, 3055-3060, 1991の方法である。さらに、P 50

CR、ネステッド(nested)プライマー、およびPROMOTER FINDERライブラリー(CLONTECH, Palo Alto, Calif.)を用いてゲノムDNA歩行を行なうことができる(CLONTECH, Palo Alto, Calif.)。このプロセスはライブラリーをスクリーニングする必要性を排除し、イントロン/エクソン接合点の発見に有用である。

【0049】

スクリーニングで完全長cDNAを求める場合、より大きなcDNAを含むようサイズ選択したライブラリーを使用するのが望ましい。遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含んでいるという点で、無作為プライミングしたライブラリーが好ましい。無作為プライミングしたライブラリーの使用は、オリゴd(T)ライブラリーが完全長cDNAを産生しない状況で特に好ましいであろう。ゲノムライブラリーは、配列を5'非転写調節領域へと伸長させるのに有用な場合がある。

10

【0050】

市販品が入手可能な毛細管電気泳動系を用いて、PCRまたは配列決定産物のサイズを分析、またはヌクレオチド配列を確認することができる。例えば、毛細管配列決定は、電気泳動分離用の流動性ポリマー、レーザー励起する4種の異なる蛍光色素(各ヌクレオチドにつき1種ずつ)、および電荷結合素子カメラによる放射された波長の検出を利用することができる。出力/光強度は適当なソフトウェア(例えばGENOTYPERおよびSequence NAVIGATOR、Perkin Elmer)を用いて電気信号に変換でき、試料のロードからコンピューター分析および電子的データ表示に至る全プロセスをコンピューター管理することができる。毛細管電気泳動は、特定の試料中に限られた量で存在するかも知れないDNAの小片を配列決定するのに特に好ましい。

20

【0051】

ポリペプチドの取得

11 - HSD1様ポリペプチドは、例えばヒト細胞からの精製によって、11 - HSD1様ポリペプチドの発現によって、または直接的化学合成によって取得できる。

【0052】

タンパク質精製

11 - HSD1様ポリペプチドを、その酵素を発現する任意の細胞(11 - HSD1様酵素発現構築物でトランスフェクトした宿主細胞を含む)から精製することができる。ジーンバンクアクセッションNo. AW163634、AW162782、AI554725およびAI436330を有するヒト配列の発現部位に拠れば、11 - HSD1様ポリペプチドは胎児脳、成人脳の前頭葉、および未分化乏突起膠腫で発現すると予想される。精製11 - HSD1様ポリペプチドは、当分野で周知の方法を用いて、細胞内で11 - HSD1様ポリペプチドと通常、会合している他の化合物、例えば特定のタンパク質、炭水化物または脂質から分離される。そのような方法には、サイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム分画、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよび調製用ゲル電気泳動が挙げられるが、これらに制限されない。精製11 - HSD1様ポリペプチドの調製は、少なくとも80%純粋; 90%、95%または99%純粋な調製であることが好ましい。調製物の純度は当分野で周知の任意の方法、例えばSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって評価できる。

30

40

【0053】

ポリヌクレオチドの発現

11 - HSD1様ポリペプチドを発現させるため、挿入されたコード配列の転写と発現に必要な要素を含む発現ベクター中にそのポリヌクレオチドを挿入することができる。当業者に周知の方法を利用して、11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている配列および適当な転写および翻訳調節要素を含む発現ベクターを構築できる。これらの方法には、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えがある。このような技術は、例えばSambrookら、(1989)およびAusubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John W

50

iley & Sons, New York., 1989に記載されている。

【0054】

11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている配列を含み、そして発現する様々な発現ベクター/宿主系が利用できる。これらには、微生物、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌；酵母発現ベクターにより形質転換された酵母、ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）により感染を受けた昆虫細胞系、ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）、もしくは細菌発現ベクター（例えばTiまたはpBR322プラスミド）により形質転換された植物細胞系、または動物細胞系が包含されるがこれらに限定される訳ではない。

10

【0055】

調節要素または調節配列は、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写と翻訳を実行するベクターの非翻訳領域 - エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域 - である。かかる要素はその強さと特異性において異なっている。利用するベクター系および宿主に応じて、構成的および誘導的プロモーターを包含する、多数の好適な転写および翻訳要素を使用できる。例えば、細菌系でクローニングを行う場合、BLUE SCRIPTファージミド (Stratagene, La Jolla, Calif.) または pSPORT1 プラスミド (Life Technologies) 等のハイブリッド lacZ プロモーターのような誘導的プロモーターを使用できる。バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターは昆虫細胞に使用できる。植物細胞のゲノムから誘導したプロモーターまたはエンハンサー（例えば熱ショック、RUBISCO、および貯蔵タンパク質遺伝子）、または植物ウイルスから誘導したプロモーターまたはエンハンサー（例えば、ウイルスプロモーターまたはリーダー配列）を該ベクター中にクローニングすることができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子由来の、または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。11 - HSD1様ポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を複数コピー含む細胞系を作製する必要がある場合は、SV40またはEBVに基づくベクターを適当な選択マーカーと共に使用することができる。

20

【0056】

細菌および酵母発現系

細菌系では、11 - HSD1様ポリペプチドに対して意図する用途に応じて幾つかの発現ベクターを選択できる。例えば、抗体の誘導のため、大量の11 - HSD1様ポリペプチドが必要である場合は、容易に精製できる融合タンパク質の高レベル発現を指令するベクターが使用できる。このようなベクターは、BLUE SCRIPT (Stratagene) のような多機能 E. coli クローニングおよび発現ベクターを包含するが、これに限定される訳ではない。BLUE SCRIPT ベクターにおいては、11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている配列を、 - ガラクトシダーゼのアミノ末端 Met とこれに続く7残基の配列と共にフレーム内で該ベクター中にライゲーションすることができ、その結果ハイブリッドタンパク質が産生される。pINベクター (Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 264, 5503 - 5509, 1989) または pGEXベクター (Promega, Madison, Wis.) もまた、グルタチオンS - トランスフェラーゼ (GST) を伴う融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるのに使用できる。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン - アガロースビーズに吸着させ、その後遊離グルタチオンの存在下で溶離することにより、溶菌させた細胞から容易に精製できる。このような系で調製したタンパク質は、ヘパリン、トロンピン、または第Xa因子プロテアーゼ開裂部位を含むよう設計でき、その結果、目的とするクローンポリペプチドをGST部分から随意に解放することができる。

30

40

【0057】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHのような構成的または誘導的プロモーターを含む幾つかの

50

ベクターが使用できる。総説として Ausubelら、(1989) および Grantら、Methods Enzymol. 153, 516-544, 1987 を参照されたい。

【0058】

植物および昆虫発現系

植物発現ベクターを使用する場合、11 - HSD1 様ポリペプチドをコードしている配列の発現は、幾つかのプロモーターのうち任意のものにより駆動できる。例えば、CaMV の 35S および 19S プロモーターのようなウイルスプロモーターを、単独で、または TMV 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて使用できる (Takamatsu, EMBO J. 6, 307-311, 1987)。別法として、RUBISCO の小サブユニットのような植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを使用することもできる (Coruzziら、EMBO J. 3, 1671-1680, 1984; Brogliera, Science 224, 838-843, 1984; Winterら、Results Probl. Cell Differ. 17, 85-105, 1991)。これらの構築物は、直接 DNA 形質転換または病原体媒介トランスフェクションにより植物細胞中に導入できる。このような技術は、幾つかの一般に入手可能な総説に記載されている (例えば、Hobbs または Murray, MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, McGraw Hill, New York, N.Y., pp 191-196, 1992)。

10

【0059】

昆虫系もまた 11 - HSD1 様ポリペプチドの発現に使用できる。例えば、かかる系の 1 つ Autographa californica 核多角体病ウイルス (AcNPV) は、Spodoptera frugiperda 細胞または Trichoplusia の幼虫で外来遺伝子を発現させるベクターとして使用する。11 - HSD1 様ポリペプチドをコードしている配列を、ポリヘドリン遺伝子のような該ウイルスの非必須領域中にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターの調節下に置くことができる。11 - HSD1 様酵素コード配列をうまく挿入すると、ポリヘドリン遺伝子は不活性化し、コートタンパク質を欠く組換えウイルスが生成する。次いでこの組換えウイルスを S. frugiperda 細胞または Trichoplusia の幼虫への感染に使用し、そこで 11 - HSD1 様ポリペプチドを発現させることができる (Engelhardら、Proc. Nat. Acad. Sci. 91, 3224-3227, 1994)。

20

30

【0060】

哺乳動物発現系

ウイルスに基づく多くの発現系を用いて哺乳動物宿主細胞で 11 - HSD1 様ポリペプチドを発現させることができる。例えば、発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、11 - HSD1 様ポリペプチドをコードしている配列は、後期プロモーターおよび 3 部に分かれたリーダー配列を含むアデノウイルス転写/翻訳複合体中にライゲーションできる。該ウイルスゲノムの非必須 E1 または E3 領域における挿入を用いて、感染宿主細胞において 11 - HSD1 様ポリペプチドを発現できる生存ウイルスを取得できる (Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3655-3659, 1984)。所望によりラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサーのような転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞での発現を増大させることができる。

40

【0061】

ヒト人工染色体 (HAC) もまた、プラスミドが内包し発現する DNA 断片よりも大きな DNA 断片の運搬に使用できる。6 M から 10 M の HAC を組み立て、常套的送達法により細胞に到達させる (例えば、リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、または小胞)。

【0062】

さらに、11 - HSD1 様ポリペプチドをコードしている配列のより効率的な翻訳を達成するために、特異的開始シグナルを使用できる。かかるシグナルは ATG 開始コドンお

50

よび連続配列を包含する。11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている配列、その開始コドン、および上流配列を適当な発現ベクター中に挿入した場合、さらなる転写または翻訳調節シグナルは必要ないであろう。しかしながら、コード配列またはその断片のみを挿入した場合は、外因性の翻訳調節シグナル(ATG開始コドンを包含する)を供給すべきである。開始コドンは挿入物全体を確実に翻訳させるために、正しいリーディングフレームになければならない。外因性翻訳要素および開始コドンは天然および合成両者の様々な起源であってよい。発現の効率は、使用する特定の細胞系に対し適切なエンハンサーを存在させることにより増強できる(Scharfら、Results Probl. Cell Differ. 20, 125-162, 1994)。

【0063】

宿主細胞

宿主細胞菌株は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現された11 - HSD1様ポリペプチドを所望の方法で処理できる能力を目的として選択できる。該ポリペプチドのこのような修飾には、アセチル化、カルボキシ化、グリコシル化、燐酸化、脂質化、およびアシル化が包含されるがこれらに限定されない。該ポリペプチドの「プレプロ」型を開裂する翻訳後プロセッシングもまた、正しい挿入、折り畳み、および/または機能を促進するために使用できる。翻訳後活性のための特異的な細胞機構および特徴的メカニズムを持つ異なる宿主細胞(例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293およびWI38)が、American Type Culture Collection(ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209)から入手でき、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするために選択できる。

【0064】

組換えタンパク質の長期高収量産生のために、安定な発現が好ましい。例えば、11 - HSD1様ポリペプチドを安定に発現する細胞系を、ウイルス複製起点および/または内因性発現要素、および同じまたは別のベクター上にある選択マーカー遺伝子を含む発現ベクターを用いて形質転換することができる。該ベクターの導入に続いて、細胞を強化培地で1-2日間生育させた後、培地を選択培地に交換することができる。選択マーカーの目的は選択に対する抵抗性を付与することであり、その存在が、導入された11 - HSD1様酵素配列をうまく発現する細胞の生育と回収を可能にする。安定に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型にとって適当な組織培養技術を用いて増殖させることができる。例えば、ANIMAL CELL CULTURE, R. I. Freshney, ed., 1986を参照されたい。

【0065】

幾つかの選択系を用いて、形質転換された細胞系を回収できる。これらには、それぞれtk^rまたはaprt^r細胞で使用できる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wiglerら、Cell 11, 223-32, 1977)およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら、Cell 22, 817-23, 1980)遺伝子が包含されるが、これらに限定される訳ではない。さらに、代謝拮抗物質、抗生物質、または除草剤耐性を選択の基準に用いることができる。例えば、dhfrはメソトレキサートに対する耐性を付与し(Wiglerら、Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 3567-70, 1980)nptはアミノグリコシド、ネオマイシンおよびG-418に対する耐性を付与し(Colbere-Garapinら、J. Mol. Biol. 150, 1014, 1981)、そしてalsおよびpatはそれぞれクロルスルホンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与する(Murray, 1992, 上記)。さらなる選択遺伝子が記載されている。例えば、trpBは細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用するようにさせ、hisDは細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用するようにさせる(Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 8047-51, 1988)。アントシアニンのような可視マーカー、-グルクロニダーゼとその基質GU

10

20

30

40

50

S、およびルシフェラーゼとその基質ルシフェリンは、形質転換体を同定し、特異的ベクター系に帰すことのできる一過性または安定なタンパク質発現の量を定量するために使用できる (Rhodesら、Methods Mol. Biol. 55, 121-131, 1995)。

【0066】

発現の検出

マーカー遺伝子発現の存在は11 - HSD1様ポリペプチドが存在することも示唆しているが、11 - HSD1様ポリペプチドの存在と発現は確認する必要がある。例えば、11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている配列がマーカー遺伝子配列内部に挿入されている場合、11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている配列を含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の不在によって同定できる。これとは別に、単一のプロモーターの調節下に11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている配列と、マーカー遺伝子が直列(タンデム)に位置する場合がある。誘導または選択にตอบสนองしてこのマーカー遺伝子は発現し、通常、11 - HSD1様ポリペプチドの発現を示す。

【0067】

これとは別に、11 - HSD1様ポリペプチドを含み、11 - HSD1様ポリペプチドを発現する宿主細胞は、当業者に知られる様々な方法によって同定できる。これらの方法には、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションおよびタンパク質生検またはイムノアッセイ技術(核酸またはタンパク質の検出および/または定量のための膜、溶液、またはチップに基づく技術を含む)が含まれるがこれらに限定されない。例えば、11 - HSD1様ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列の存在は、プローブまたは断片または11 - HSD1様ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの断片を使用するDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションまたは増幅によって検出できる。核酸増幅に基づく検定は、11 - HSD1様ポリペプチドを含む形質転換体を検出するための、11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている配列から選択されるオリゴヌクレオチドの使用を含む。

【0068】

11 - HSD1様ポリペプチドに対し特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかを使用して該ポリペプチドの発現を検出および測定するための様々なプロトコルが当分野で知られている。例として、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、および蛍光活性化セルソーティング(FACS)がある。11 - HSD1様ポリペプチド上の2個の非干渉性エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いる、2部位のモノクローナルに基づくイムノアッセイが使用でき、または、競合的結合検定を使用することができる。これらのおよびその他の検定はHamptomら、SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul, Minn., 1990およびMaddoxら、J. Exp. Med. 158, 1211-1216, 1983に記載されている。

【0069】

多岐にわたる標識およびコンジュゲーション技術が当業者に知られており、様々な核酸およびアミノ酸検定に使用できる。11 - HSD1様ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識化ハイブリダイゼーションまたはPCRプローブを調製する手段は、標識したヌクレオチドを使用する、オリゴ標識化、ニック翻訳、末端標識化、またはPCR増幅を含む。これとは別に、11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている配列を、mRNAプローブの産生のためのベクター中にクローニングすることもできる。このようなベクターは当分野で既知であり、市販品が入手でき、標識化ヌクレオチドおよび適当なRNAポリメラーゼ、例えばT7、T3、またはSP6を添加することによりインビトロでのRNAプローブの合成に使用することができる。これらの方法は、市販の様々なキットを用いて実施できる(Amersham Pharmacia Biotech、Promega、およびUS Biochemical)。検出を容易にするために使用できる適当なリポーター分子または標識には、放射性核

10

20

30

40

50

種、酵素、および蛍光、化学ルミネセント、または色素生成物質、ならびに基質、補助因子、インヒビター、磁性粒子などが包含される。

【0070】

ポリペプチドの発現および精製

11 - HSD1様ポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列で形質転換させた宿主細胞は、発現と、細胞培養からのタンパク質の回収に適した条件下で培養できる。形質転換細胞により生産されたポリペプチドは、その配列および/または使用したベクターに応じて分泌されまたは細胞内に貯留され得る。当業者には理解できるであろうが、11 - HSD1様ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核または真核細胞膜を通った可溶性11 - HSD1様ポリペプチドの分泌を指令する、または膜結合11 - HSD1様ポリペプチドの、膜挿入を指令する、シグナル配列を含むよう設計できる。

10

【0071】

上に論じたように、他の組み立て物を用いて、11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている配列を、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードしているヌクレオチド配列と結合させることができる。このような精製促進ドメインは、金属キレート化ペプチド、例えば固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするタンパク質Aドメイン、およびFLAG伸長/親和精製系で利用するドメインが包含されるが、これらに限定されない(ImmuneX Corp., Seattle, Wash.)。精製ドメインと11 - HSD1様ポリペプチドとの間に開裂可能リンカー配列、例えば第Xa因子またはエンテロキナーゼに特異的なリンカー配列を入れること(Invitrogen, San Diego, CA)もまた、精製を促進するために利用できる。このような発現ベクターの1つは、11 - HSD1様ポリペプチドと、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ開裂部位に先立つ6個のヒスチジン残基とを含む融合タンパク質の発現を提供する。このヒスチジン残基はIMAC(Porathら、Prot. Exp. Purif. 3, 263-281, 1992に記載の固定化金属イオン親和クロマトグラフィー)による精製を促進し、一方エンテロキナーゼ開裂部位は融合タンパク質からの11 - HSD1様ポリペプチドの精製手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターはKrollら、DNA Cell Biol. 12, 441-453, 1993に開示されている。

20

30

【0072】

化学合成

11 - HSD1様ポリペプチドをコードしている配列は、その全体または一部を、当分野で周知の化学的方法を用いて合成できる(Caruthersら、Nucl. Acid Res. Symp. Ser. 215-223, 1980; Hornら、Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232, 1980)。これとは別に、11 - HSD1様ポリペプチド自身を、そのアミノ酸配列を合成するための化学的方法、例えば固相技術を用いる直接ペプチド合成を用いて調製できる(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154, 1963; Robergeら、Science 269, 202-204, 1995)。タンパク質合成は手動技術またはオートメーションを用いて実施できる。自動化合成は、例えばApplied Biosystems 431Aペプチド合成機(Perkin Elmer)を用いて達成できる。所望により、11 - HSD1様ポリペプチドの断片を別々に合成し、化学的方法を用いて合して完全長の分子を調製することもできる。

40

【0073】

新たに合成したペプチドは、調製用高速液体クロマトグラフィー(例えばCreighton, PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983)により実質的に精製できる。合成11 - HSD1様ポリペプチドの組成はアミノ酸分析または配列決定により確認できる(例えばエドマン分解法; Creigh

50

ton、上記を参照されたい)。さらに、直接合成中に11 - HSD1様ポリペプチドのアミノ酸配列の任意の部分を改変させ、そして/または化学的方法を用いて他のタンパク質由来の配列と合して、変異体ポリペプチドまたは融合タンパク質を調製することができる。

【0074】

改変ポリペプチドの調製

当業者には理解できるであろうが、天然に存在しないコドンを含む11 - HSD1様ポリペプチドコード化ヌクレオチドを調製することは有利であり得る。例えば、特定の原核または真核宿主が好むコドンを選択して、タンパク質発現の速度を増大させ、または所望の性質、例えば天然に存在する配列から産み出される転写物の半減期より長い半減期を持つRNA転写物を調製することができる。

10

【0075】

本明細書に開示するヌクレオチド配列は、当分野で一般的に知られる方法を用いて、該ポリペプチドまたはmRNA産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現を修飾する改変を包含する(但しこれらに限定される訳ではない)様々な理由で、11 - HSD1様ポリペプチドコード配列を改変させるように設計できる。無作為断片化によるDNAシャフリングと遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのPCR再集合を用いてヌクレオチド配列を設計できる。例えば、位置指定突然変異誘発を用いて、新たな制限部位を挿入し、グリコシル化パターンを変え、コドンの優先性を変え、スプライス変異体を調製し、突然変異を導入する等を実施できる。

20

【0076】

抗体

当分野で知られているいかなる型の抗体も、11 - HSD1様ポリペプチドのエピトープに特異的に結合するよう作製できる。本明細書で使用する「抗体」とは、無傷の免疫グロブリン分子、およびその断片、例えばFab、F(ab')₂、およびFvを包含し、これらは11 - HSD1様ポリペプチドのエピトープに結合できる。典型的には、エピトープを形成するためには少なくとも6、8、10、または12の連続するアミノ酸が必要である。しかしながら、非連続アミノ酸を含むエピトープはより多くの、例えば少なくとも15、25、または50のアミノ酸を必要とするかも知れない。

【0077】

11 - HSD1様ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体は治療に使用でき、そして免疫化学検定、例えばウェスタンブロット、ELISA、ラジオイムノアッセイ、免疫組織化学検定、免疫沈降、またはその他の当分野で既知の免疫化学的検定に使用できる。所望の特異性を有する抗体の同定のため、様々なイムノアッセイが使用できる。競合的結合または免疫放射検定のための多数のプロトコルが当分野でよく知られている。このようなイムノアッセイは典型的には、免疫原と、その免疫原に特異結合する抗体との間の複合体形成の測定を含んでいる。

30

【0078】

典型的には、11 - HSD1様ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、免疫化学検定に使用する時、他のタンパク質が提供する検出シグナルより少なくとも5、10、または20倍高い検出シグナルを提供する。好ましくは、11 - HSD1様ポリペプチドに特異結合する抗体は、免疫化学検定で他のタンパク質を検出せず、11 - HSD1様ポリペプチドを溶液から免疫沈降させることができる。

40

【0079】

11 - HSD1様ポリペプチドは、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、モルモット、サル、またはヒトを免疫してポリクローナル抗体を産生させるのに使用できる。所望により、11 - HSD1様ポリペプチドは、担体タンパク質、例えば牛血清アルブミン、チログロブリン、およびスカシガイヘモシアニンとコンジュゲートさせることができる。宿主の種に応じて、免疫学的反応を増大させるために種々のアジュバントを使用できる。このようなアジュバントは、フロイントアジュバント、鉍物性ゲル(例えば水酸化ア

50

ルミニウム)、および界面活性物質(例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、スカシガイヘモシアニン、およびジニトロフェノール)を包含するがこれらに限定されない。ヒトに使用するアジュバントの中ではBCG(*Bacilli Calmette - Guerin*)および*Corynebacterium parvum*が特に有用である。

【0080】

11 - HSD1様ポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体は、培養中の連続的細胞系により抗体分子の産生を提供する任意の技術を用いて調製できる。これらの技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBV-ハイブリドーマ技術があるがこれらに限定されない(Kohlerら、*Nature* 256, 495 - 497, 1985; Kozborら、*J. Immunol. Methods* 81, 31 - 42, 1985; Coteら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026 - 2030, 1983; Coleら、*Mol. Cell Biol.* 62, 109 - 120, 1984)。

10

【0081】

さらに、マウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子にスプライシングして適当な抗原特異性と生物活性を持つ分子を得る、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術が利用できる(Morrisonら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851 - 6855, 1984; Neubergerら、*Nature* 312, 604 - 608, 1984; Takedaら、*Nature* 314, 452 - 454, 1985)。モノクローナルおよびその他の抗体はまた、これを治療に使用した場合に患者が該抗体に対する免疫反応を起こすのを防ぐため、「ヒト化」することができる。このような抗体は、治療に直接使用できるほど配列が充分ヒトに類似しているかも知れず、または幾つかの重要残基の変更を必要とするかも知れない。齧歯類の抗体とヒト配列の間の配列相違は、個々の残基の位置指定突然変異誘発により、または相補性決定領域全体の格子により、ヒト配列内の残基と相違する残基を置き換えることによって最小化することができる。別法として、ヒト化抗体はGB2188638Bに記載のように組換え法を用いて調製できる。11 - HSD1様ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、U.S. 5565332に開示のように、部分的または完全にヒト化した抗原結合部位を含むことができる。

20

【0082】

これに代わり、当分野で既知の方法を用いて、一本鎖抗体の調製のために記載した技術を適合させ、11 - HSD1様ポリペプチドに特異結合する一本鎖抗体を調製することができる。関連する特異性を持つが別個のイディオタイプ組成を有する抗体を、無作為組み合わせ免疫グロブリンライブラリーから鎖シャフリングによって調製することができる(Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120 - 23, 1991)。

30

【0083】

一本鎖抗体はまた、ハイブリドーマcDNAを鋳型に用いて、PCRのようなDNA増幅法を用いて組み立てることができる(Thirionら、1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507 - 11)。一本鎖抗体は単一または二重特異性であり得、また、二価または四価であり得る。四価二重特異性一本鎖抗体の組み立ては例えばColoma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159 - 63に教示されている。二価二重特異性一本鎖抗体の組み立てはMallender & Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199 - 206に教示されている。

40

【0084】

下記のように、一本鎖抗体をコードしているヌクレオチド配列を手動または自動ヌクレオチド合成を用いて組み立て、標準的組換えDNA法を用いて発現組み立て物中にクローニングし、そして細胞中に導入してコード配列を発現させることができる。別法として、一本鎖抗体を、例えば糸状ファージ技術を用いて直接調製することもできる(Verhaa

50

rら、1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nicholl
ら、1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91)。

【0085】

11 - HSD1様ポリペプチドに特異結合する抗体はまた、リンパ球集団においてイン
ビボ産生を誘導することによって、または、文献に開示されている極めて特異的な結合試
薬のパネルまたは免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングすることによって調製す
ることにもできる(Orlandiら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 86,
3833-3837, 1989; Winterら、*Nature* 349, 293-29
9, 1991)。

【0086】

その他の型の抗体を、本発明方法において組み立て、治療に使用することができる。例え
ば、WO93/03151に開示のように、キメラ抗体を組み立てることができる。免疫
グロブリンから誘導され多価且つ多重特異的である結合タンパク質、例えばWO94/1
3804に記載の「diabodies」もまた調製できる。

【0087】

本発明に係る抗体は当分野で周知の方法により精製できる。例えば、抗体は、11 - H
SD1様ポリペプチドが結合しているカラムを通過させることにより親和精製できる。次
いで、結合した抗体を、高い塩濃度の緩衝液を用いてカラムから溶出することができる。

【0088】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定のDNAまたはRNA配列に対し相補的なヌク
レオチド配列である。いったん細胞中に導入されるとこの相補的なヌクレオチドは、該細胞
が産生した天然配列と結合して複合体を形成し、転写または翻訳のいずれかを遮断する。
好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも11ヌクレオチド長であるが、
少なくとも12、15、20、25、30、35、40、45、もしくは50またはそれ
以上のヌクレオチド長であってもよい。より長い配列もまた使用できる。アンチセンスオ
リゴヌクレオチド分子をDNA構築物に提供し、上記のように細胞中に導入して、その細
胞における11 - HSD1様酵素遺伝子産物のレベルを低下させることができる。

【0089】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ま
たはこの両者の組み合わせであってよい。オリゴヌクレオチドは、1つのヌクレオチドの
5'末端を、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アル
キルホスホノチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロアミデート、燐酸エステル、
カルバメート、アセトアミデート、カルボキシメチルエステル、カルボネート、および燐
酸トリエステルといった非ホスホジエステルヌクレオチド間結合を有する別のヌクレオチ
ドの3'末端と共有結合させることにより、手動で、または自動合成機によって合成でき
る。Brown, *Meth. Mol. Biol.* 20, 1-8, 1994; Sonv
eaux, *Meth. Mol. Biol.* 26, 1-72, 1994; Uhlman
ら、*Chem. Rev.* 90, 543-583, 1990を参照されたい。

【0090】

11 - HSD1様酵素遺伝子の制御、5'、または調節領域と二本鎖を形成するアンチ
センスオリゴヌクレオチドを設計することにより、11 - HSD1様酵素遺伝子発現の
修飾が得られる。転写開始部位、例えば開始部位から-10および+10位の間から誘導
されるオリゴヌクレオチドが好ましい。同様に、「三重らせん」塩基対合法を用いて阻害
を達成できる。三重らせん対合は、二重らせんがポリメラーゼ、転写因子またはシャペロ
ンの結合に対して十分に開くという能力の阻害を引き起こすため、有用である。三本鎖D
NAを用いる治療上の進歩が文献に記載されている(例えばGeeら、Huber & C
arr, *MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES*,
Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 199
4)。転写物がリボソームに結合するのを防ぐことによりmRNAの翻訳を遮断するアン

10

20

30

40

50

チセンスオリゴヌクレオチドもまた設計できる。

【0091】

アンチセンスオリゴヌクレオチドと11 - HSD1様ポリヌクレオチドの相補配列との間に好結果の複合体を形成させるためには、正確な相補性は必要ない。例えば11 - HSD1様ポリヌクレオチドに対し正確に相補的である2、3、4、もしくは5またはそれ以上の長さの連続するヌクレオチドを含み、その各々が、隣接する11 - HSD1様酵素ヌクレオチドとは相補的ではない連続するある長さのヌクレオチドによって隔てられているアンチセンスオリゴヌクレオチドは、11 - HSD1様酵素mRNAに対して十分な標的化特異性を提供できる。好ましくは、相補的な連続ヌクレオチドの長さはそれぞれ少なくとも4、5、6、7もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド長である。非相補的な介在配列は、好ましくは1、2、3、または4ヌクレオチド長である。当業者は、アンチセンス - センスの対の算出融点を容易に使用して、特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドと特定の11 - HSD1様ポリヌクレオチド配列間で寛容されるミスマッチの程度を決定できるであろう。

10

【0092】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、11 - HSD1様ポリヌクレオチドとハイブリダイズする能力に影響を及ぼすことなく修飾できる。これらの修飾は該アンチセンス分子の内部、または一端もしくは両端である。例えば、ヌクレオチド間の燐酸結合は、アミノ基と末端リボースの間にある数々の炭素残基を有するコレステリルまたはジアミン部分を加えることによって修飾できる。修飾された塩基および/または糖、例えばリボースの代わりにアラビノース、または3'ヒドロキシ基または5'燐酸基が置換されている3', 5'-置換オリゴヌクレオチドもまた修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドに使用できる。これらの修飾オリゴヌクレオチドは当分野で周知の方法により調製できる。例えば、Agrawalら、Trends Biotechnol. 10, 152 - 158, 1992; Uhlmannら、Chem. Rev. 90, 543 - 584, 1990; Uhlmannら、Tetrahedron Lett. 215, 3539 - 3542, 1987を参照されたい。

20

【0093】

リボザイム

リボザイムは触媒活性を有するRNA分子である。例えば、Cech, Science 236, 1532 - 1539; 1987; Cech, Ann. Rev. Biochem. 59, 543 - 568; 1990, Cech, Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 605 - 609; 1992, Couture & Stinchcomb, Trends Genet. 12, 510 - 515, 1996を参照されたい。当分野で知られるように、リボザイムは、RNA配列を開裂することにより遺伝子機能を阻害するのに使用できる(例えば、Haseloffら、米国特許5641673)。リボザイムの作用機構は、相補的標的RNAに対するリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後のエンドヌクレオ分解的(endonucleolytic)開裂を含む。例には、特異的ヌクレオチド配列のエンドヌクレオ分解的な開裂を特異的且つ効果的に触媒できる、設計されたハンマーヘッドモチーフリボザイム分子がある。

30

40

【0094】

11 - HSD1様ポリヌクレオチドのコード配列を用いて、11 - HSD1様ポリヌクレオチドから転写されたmRNAに特異結合するリボザイムを作製できる。他のトランスのRNA分子を極めて配列特異的に開裂できるリボザイムを設計し組み立てる方法が開発され、当分野で記載されている(Haseloffら、Nature 334, 585 - 591, 1988)。例えば、リボザイムの開裂活性は、別個の「ハイブリダイゼーション」領域を該リボザイム中に組み入れることによって、特定のRNAを標的とさせることができる。このハイブリダイゼーション領域は標的RNAに対し相補的な配列を含んでおり、したがってその標的と特異的にハイブリダイズする(例えばGerlachら、EP 321201を参照されたい)。

50

【0095】

11 - HSD1様酵素RNA標的内部の特異的リボザイム開裂部位は、この標的分子を、以下の配列：GUA、GUU、およびGUCを包含するリボザイム開裂部位についてスキャンすることにより同定できる。同定できたならば、該開裂部位を含む標的RNAの領域に対応する、15および20の間のリボヌクレオチドを有する短いRNA配列を、標的を非機能的にし得る二次構造の特徴について評価できる。さらに、候補の11 - HSD1様酵素RNA標的の適合性を、リボヌクレアーゼ防護検定を用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対する利用可能性を試験することによって評価できる。より長い相補配列を用いて、標的に対するハイブリダイゼーション配列の親和性を増大させることができる。リボザイムのハイブリダイズおよび開裂する領域は、相補領域を介して標的RNAにハイブリダイズする時、リボザイムの触媒領域が標的を開裂し得るといったように、完全に相関している。

10

【0096】

リボザイムはDNA組み立て物の一部として細胞内に導入できる。マイクロ注入、リボソーム媒介トランスフェクション、電気穿孔、または燐酸カルシウム沈殿といった機械的方法を用いて、11 - HSD1様酵素発現の低下が望まれる細胞中にリボザイム含有DNA組み立て物を導入することができる。これとは別に、細胞がDNA組み立て物を安定的に保持することが望まれる場合は、該組み立て物をプラスミド上で供給し、当分野で知られるように、別個の要素として維持するか、または細胞のゲノム中に組み込むことができる。リボザイムコード化DNA組み立て物は、細胞中のリボザイムの転写を調節するために、プロモーター要素、エンハンサーまたはUAS要素、および転写ターミネーターシグナルといった転写調節要素を含み得る。

20

【0097】

Haseloffら、米国特許5641673に教示のように、リボザイムは、標的遺伝子の発現を誘導する因子に应答してリボザイムの発現が起こるように設計することができる。リボザイムはまた、追加レベルの調節を提供するよう設計でき、その結果、mRNAの破壊はリボザイムと標的遺伝子の両者が細胞に誘導された時にのみ起こる。

【0098】

区別的に発現される遺伝子

遺伝子産物がヒト11 - ヒドロキシステロイド デヒドロゲナーゼ1様酵素と相互作用する遺伝子の同定方法をここに記載する。このような遺伝子は、CNS障害、骨粗鬆症、肝疾患、肥満症、血圧異常または胎児発育異常、および糖尿病を包含する（但しこれらに限定されない）疾患において区別して（区別的に）発現される遺伝子を表し得る。さらに、係る遺伝子は、このような疾患の進行または治療に関連する操作に应答して区別的に調節される遺伝子を表し得る。加えて、このような遺伝子は、組織または生物の発生の異なる段階で増大または低下する、一時的に調節される発現を示すことができる。区別的に発現される遺伝子はまた、その発現を、対照対実験条件の下で調節させることができる。さらに、ヒト11 - ヒドロキシステロイド デヒドロゲナーゼ1様遺伝子または遺伝子産物は、これ自体区別的発現について試験できる。

30

【0099】

発現が正常対疾病状態で相違する程度は、標準的特性決定技術、例えば区別的ディスプレイ技術によって視覚化されるに充分大きいというだけでよい。発現の相違を視覚化することのできる、その他のこのような標準的特性決定技術は、定量的RT（逆転写酵素）、PCR、およびノーザン分析を包含するが、これらに限定されない。

40

【0100】

区別的に発現される遺伝子の同定

区別的に発現される遺伝子を同定するためには、目的とする組織から全RNA、または好ましくはmRNAを単離する。例えば、RNA試料は、実験対象の組織から、そして対照となる対象の対応組織から取得する。mRNAの単離に対して不利に選択しない任意のRNA単離技術を、係るRNA試料の精製に利用できる。例えば、Ausubel et al

50

l., ed., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1987-1993を参照されたい。当業者に周知の技術、例えばChomczynski、米国特許4843155の一段階RNA単離プロセスを用いて多数の組織試料を容易に処理することができる。

【0101】

区別的に発現される遺伝子が産生したRNAを表す、集められたRNA試料内部の転写物は、当業者に周知の方法により同定する。これらには、例えば、ディファレンシャルスクリーニング(Tedder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 208-12, 1988)、差引きハイブリダイゼーション(Hedrick et al., Nature 308, 149-53; Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 2825, 1984)、および好ましくはディファレンシャルディスプレイ(Liang & Pardee, Science 257, 967-71, 1992; 米国特許5262311)が包含される。

10

【0102】

区別的発現の情報はこれ自体、ヒト11 - ヒドロキシステロイド デヒドロゲナーゼ1様酵素の関与する疾病の治療のための関連法を示唆している。例えば、治療は、区別的に発現される遺伝子および/またはヒト11 - ヒドロキシステロイド デヒドロゲナーゼ1様酵素をコードしている遺伝子の発現の調節を包含し得る。区別的発現の情報は、区別的に発現される遺伝子もしくは遺伝子産物またはヒト11 - ヒドロキシステロイド デヒドロゲナーゼ1様遺伝子もしくは遺伝子産物の活性または発現が、アップレギュレーションであるかダウンレギュレーションであるかを示すことができる。

20

【0103】

スクリーニング方法

本発明は、11 - HSD1様ポリペプチドまたは11 - HSD1様ポリヌクレオチドに結合する、またはその活性を調節する、被験化合物をスクリーニングするための検定を提供する。好ましくは、被験化合物は11 - HSD1様ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する。より好ましくは、被験化合物は、11 - HSD1活性を、被験化合物の不在時に比較して少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下または増大させる。

30

【0104】

被験化合物

被験化合物は当分野で既知の薬理的物質であってよく、または薬理活性を持っていることが前もって分かっている化合物であってよい。この化合物は天然に存在する、または実験室で設計されたものであってよい。これらは、微生物、動物、または植物から単離されたものであってよく、そして組換え的に調製され、または当分野で既知の化学的方法により合成されたものであってよい。所望により被験化合物は、生物学的ライブラリー、空間的アドレス特定可能な並行固相または液相ライブラリー、デコンボリューションを要する合成ライブラリー法、「一ビーズ化合物」ライブラリー法、および親和クロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を包含する(但しこれらに限定される訳ではない)当分野で既知の数多くの組み合わせライブラリー法のいずれかを用いて取得できる。生物学的ライブラリーアプローチはポリペプチドライブラリーに限定されているが、他の4種のアプローチはポリペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の小分子ライブラリーに適用できる。Lam, Anticancer Drug Des. 12, 145, 1997を参照されたい。

40

【0105】

分子ライブラリーの合成法は当分野でよく知られている(例えば、DeWittら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erbら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994)。

50

4 ; Zuckermannら、J . Med . Chem . 37 , 2678 , 1994 ;
Chouら、Science 261 , 1303 , 1993 ; Carellら、Angew
. Chem . Int . Ed . Engl . 33 , 2059 , 1994 ; Carellら、
Angew . Chem . Int . Ed . Engl . 33 , 2061 ; Gallopら、
J . Med . Chem . 37 , 1233 , 1994を参照されたい)。化合物のライブ
ラリーは溶液で(例えば、Houghten , Biotechniques 13 , 41
2 - 421 , 1992)、またはビーズ(Lam , Nature 354 , 82 - 84 ,
1991)、チップ(Fodor , Nature 364 , 555 - 556 , 1993)
、細菌または孢子(Ladner、米国特許5223409)プラスミド(Cullら、
Proc . Natl . Acad . Sci . U . S . A . 89 , 1865 - 1869 , 1
992)、またはファージ(Scott & Smith , Science 249 , 38
6 - 390 , 1990 ; Devlin , Science 249 , 404 - 406 , 1
990) ; Cwirllaら、Proc . Natl . Acad . Sci . 97 , 6378 -
6382 , 1990 ; Felici , J . Mol . Biol . 222 , 301 - 31
0 , 1991 ; およびLadner、米国特許5223409)上に提供できる。

10

20

30

40

50

【0106】

ハイスループットスクリーニング

被験化合物は、高(ハイ)スループットスクリーニングを用いて、11 - HSD1様ポ
リペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する能力、または11 - HSD1様酵素活性
もしくは11 - HSD1様酵素遺伝子発現に影響を及ぼす能力についてスクリーニング
できる。ハイスループットスクリーニングを使用して、多くの個別的化合物を並行して試
験でき、その結果多数の被験化合物を迅速にスクリーニングできる。最も広範に確立され
ている技術は96ウェル微量定量プレートを利用するものである。この微量定量プレート
のウェルは、典型的には50から500 μ lの範囲の検定容量を必要とする。このプレート
に加えて、96ウェルフォーマットに適合させた多くの機器、材料、ピペット、ロボッ
ト、プレート洗浄機、およびプレート読み取り機が市販されている。

【0107】

別法として、「自由フォーマット検定」、または試料間に物理的障壁を持たない検定が使用
できる。例えば、組み合わせペプチドライブラリーののための、単純な均質検定で色素細
胞(メラノサイト)を用いる検定が、Jayawickremeら、Proc . Natl
. Acad . Sci . U . S . A . 19 , 1614 - 18 (1994)に記載されてい
る。ペトリ皿中のアガロースの下にこの細胞を入れ、次いで組み合わせ化合物を伴ってい
るビーズをアガロースの表面に載せる。組み合わせ化合物はこのビーズから化合物を部分
的に放出する。化合物がゲルマトリックス中へと局所的に拡散するにつれて活性化化合物が
細胞の色の変化を惹起するため、活性化化合物を暗色色素領域として視覚化することができ
る。

【0108】

自由フォーマット検定のもう一つの例は、生体分子スクリーニング学会第1回年次総会(
Philadelphia , Pa . , 1995年11月7 - 10日)で報告されたChel
sky、「組み合わせライブラリーのスクリーニングのための戦略：新規な、そして伝
統的なアプローチ」により記載されている。Chel skyは、カルボニックアンヒドラー
ゼのための単純な均質酵素検定をアガロースゲルの内部に入れ、その結果ゲル中の酵素
がゲル全体に色の変化を惹起するようにさせた。その後、光リンカーを介して組み合わせ
化合物を持つビーズをゲル内部に入れ、すると該化合物はUV光により部分的に放出され
た。酵素を阻害する化合物は、色の変化がより少ない局所阻害領域として観察された。

【0109】

さらに別の例がSalmonら、Molecular Diversity 2 , 57 - 6
3 (1996)に記載されている。この例では、組み合わせライブラリーを、寒天中で生
育する癌細胞への細胞毒性効果を有する化合物についてスクリーニングした。

【0110】

もう一つのハイスルーブットスクリーニング法が Beutelら、米国特許 5976813 に記載されている。この方法では、被験試料を多孔性マトリックスに入れる。次に 1 またはそれ以上の検定成分を、マトリックス、例えばゲル、プラスチックシート、フィルター、またはその他の形の容易に操作できる固体担体の内部、上、または底に入れる。試料がこの多孔性マトリックスに導入されるとこれらは充分ゆっくりと拡散し、その結果、被験試料が混ざらずに検定が遂行できる。

【0111】

結合検定

結合検定について、被験化合物は、本酵素の ATP / GTP 結合部位である 11 - HSD1 様ポリペプチドの活性部位に結合してこれを占有する結果、正常な生物活性を妨げるような、小分子であることが好ましい。このような小分子の例は、小ペプチドまたはペプチド様分子を包含するが、これらに限定される訳ではない。

10

【0112】

結合検定では、被験化合物または 11 - HSD1 様ポリペプチドのいずれかが検出可能な標識、例えば蛍光、放射性同位元素、化学ルミネセント、または酵素標識（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼ）を含むことができる。そこで、11 - HSD1 様ポリペプチドに結合している被験化合物の検出は、例えば放射能の放出を直接計数することにより、またはシンチレーション計数により、または検出可能産物への適当な基質の変換を測定することにより、達成できる。

20

【0113】

別法として、11 - HSD1 様ポリペプチドへの被験化合物の結合を、反応体のいずれをも標識せずに測定することができる。例えば、マイクロフィジオメーターを用いて、被験化合物と 11 - HSD1 様ポリペプチドとの結合を検出できる。マイクロフィジオメーター（例えばサイトセンサー^{T M}）とは、細胞がその環境を酸性化する速度を光アドレスラブル電位差センサー（LAPS）を用いて測定する分析機器である。この酸性化速度の変化は、被験化合物と 11 - HSD1 様ポリペプチドの相互作用の指標として使用できる（McConnellら、Science 257, 1906 - 1912, 1992）。

【0114】

被験化合物が 11 - HSD1 様ポリペプチドに結合する能力の測定はまた、実時間 Bimolecular Interaction Analysis (BIA) のような技術を用いて達成できる（Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63, 2338 - 2345, 1991、および Szaboら、Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699 - 705, 1995）。BIA は、いかなる反応体をも標識せずに、生体特異的相互作用を実時間で研究するための技術である（例えば BIAcore（登録商標））。光学的現象表面プラズモン共鳴（SPR）の変化を、生体分子間の実時間反応の指標に使用できる。

30

【0115】

本発明のさらに別の態様では、11 - HSD1 様ポリペプチドを二ハイブリッド検定または三ハイブリッド検定（例えば、米国特許 5283317；Zervosら、Cell 72, 223 - 232, 1993；Maduraら、J. Biol. Chem. 268, 12046 - 12054, 1993；Bartelら、Biotechniques 14, 920 - 924, 1993；Iwabuchiら、Oncogene 8, 1693 - 1696, 1993；および Brent WO94/10300）における「おとりタンパク質」として使用し、11 - HSD1 様ポリペプチドに結合またはこれと相互作用してその活性を調節する他のタンパク質を同定することができる。

40

【0116】

二ハイブリッド系は殆どの転写因子のモジュラー的性格に基づくものであり、それは、分離可能な DNA 結合および活性化ドメインから成っている。簡潔に述べると、この検定は二種の異なる DNA 組み立て物を利用する。例えば、一方の組み立て物においては、11

50

- H S D 1 様ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、既知の転写因子の D N A 結合ドメインをコードしているポリヌクレオチドに融合できる（例えば G A L - 4）。別の組み立て物においては、未同定タンパク質（「餌」または「試料」）をコードしている D N A 配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードしているポリヌクレオチドに融合できる。もし「おとり」および「餌」タンパク質がインピボで相互作用してタンパク質依存複合体を形成できたならば、該転写因子の D N A 結合および活性化ドメインは極めて近位に招来される。この近位性が、転写因子に応答する転写調節部位と機能的に結合しているリポーター遺伝子（例えば L a c Z）の転写を可能にする。リポーター遺伝子の発現が検出でき、機能的転写因子を含む細胞コロニーを単離し、11 - H S D 1 様ポリペプチドと相互作用するタンパク質をコードしている D N A 配列取得に使用することができる。

10

【0117】

反応体の一方または両方の非結合型からの結合型の分離を促進するため、そして検定の自動化の便宜を図るため、11 - H S D 1 様ポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを固定化することが望ましいかも知れない。したがって、11 - H S D 1 様ポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを固体支持体に結合させることができる。好適な固体支持体は、ガラスまたはプラスチックスライド、組織培養プレート、微量定量ウェル、管、シリコンチップ、またはビーズ（ラテックス、ポリスチレン、またはガラスビーズを包含するがこれらに限定されない）のような粒子を包含するがこれらに限定されない。共有および非共有結合、受動吸収、または

20

【0118】

一つの態様において、11 - H S D 1 様ポリペプチドは、11 - H S D 1 様ポリペプチドを固体支持体に結合させるドメインを含む融合タンパク質である。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質をグルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical, St. Louis, Mo.）上またはグルタチオン誘導体微量定量プレート上に吸着させ、次いでこれを被験化合物または被験化合物および非吸着11 - H S D 1 様ポリペプチドに合し；次にこの混合物を複合体形成が行われる条件下でインキュベートする（例えば、塩およびpHに関して生理的条件）。インキュベーションの後、ビーズまたは微量定量プレートのウェルを洗浄して未結合成分を除去する。反応体の結合は上記のように直接的または間接的に測定できる。別法として、複合体を固体支持体から解離させた後に結合を測定することもできる。

30

【0119】

本発明に係るスクリーニング検定には、タンパク質またはポリヌクレオチドを固体支持体上に固定化するためのその他の技術を使用することもできる。例えば、11 - H S D 1 様ポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを、ピオチンとストレプトアビジンのコンジュゲーションを利用して固定化できる。当分野で周知の技術（例えばピオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.）を用いて、ピオチニル化した11 - H S D 1 様ポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物をピオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）から調製し、ストレプトアビジン被覆した96ウェルプレート（Pierce Chemical）のウェルに固定化できる。別法として、11 - H S D 1 様ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または被験化合物に特異的に結合するが、所望の結合部位、例えば11

40

50

- HSD1様ポリペプチドの活性部位に干渉しない抗体をプレートのウェルに誘導体化することができる。未結合の標的またはタンパク質が抗体コンジュゲーションによりウェル中に捕捉できる。

【0120】

GST-固定化複合体について上に記載した方法に加え、このような複合体を検出する方法には、11-HSD1様ポリペプチドまたは被験化合物に特異結合する抗体を用いる、複合体の免疫検出、11-HSD1様ポリペプチドの活性検出へと引き継がれる酵素結合検定、および非還元条件下でのSDSゲル電気泳動がある。

【0121】

11-HSD1様ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する被験化合物を求めるスクリーニングは、無傷の細胞で実施することもできる。11-HSD1様ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む任意の細胞が、細胞に基づく検定系で使用できる。11-HSD1様ポリペプチドは細胞中に天然に存在し、または上記のような技術を用いて導入できる。11-HSD1様ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合は、上記のように測定する。

【0122】

酵素検定

ヒト11-HSD1様ポリペプチドの11-HSD1活性を増大または低下させる能力について、被験化合物を試験できる。11-HSD1活性は、例えばDiazら、J. Neurosci. 18: 2570-2580 (1988); Rajanら、J. Neurosci. 16: 65-70 (1996); およびLloyd-MacGilpら、Hypertension, 34: 1123-1128 (1999)に記載のように測定できる。

【0123】

酵素検定は、精製11-HSD1様ポリペプチド、細胞膜調製物または無傷の細胞と、被験化合物とを接触させた後に実施できる。11-HSD1様ポリペプチドのトランスケトラゼ活性を少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90または100%低下させる被験化合物を、11-HSD1様酵素活性を低下させる可能性のある治療物質として同定する。ヒト11-HSD1様ポリペプチドのトランスケトラゼ活性を少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90または100%増大させる被験化合物を、ヒト11-HSD1様酵素活性を増大させる可能性のある治療物質として同定する。

【0124】

遺伝子発現

別の態様では、11-HSD1様酵素遺伝子の発現を増大または減少させる被験化合物を同定する。11-HSD1様ポリヌクレオチドを被験化合物と接触させ、RNAまたは11-HSD1様ポリヌクレオチドのポリペプチド産物の発現を測定する。被験化合物存在下での適当なmRNAまたはポリペプチドの発現レベルを、該被験化合物不在下でのmRNAまたはポリペプチドの発現レベルと比較する。すると被験化合物が、この比較に基づく発現のモジュレーターとして同定できる。例えば、mRNAまたはポリペプチドの発現が、被験化合物の不在時よりも存在時により大きい場合は、この被験化合物を、該mRNAまたはポリペプチド発現の刺激物質または増強物質と同定する。そうではなく、mRNAまたはポリペプチドの発現が、被験化合物の不在時よりも存在時により小さい場合は、この被験化合物を、該mRNAまたはポリペプチド発現のインヒビターと同定する。

【0125】

細胞における11-HSD1様酵素mRNAまたはポリペプチド発現のレベルは、mRNAまたはポリペプチドを検出するための当分野で周知の方法により決定できる。定性または定量的方法のいずれかが使用できる。11-HSD1様ポリヌクレオチドのポリペプチド産物の存在は、例えばラジオイムノアッセイのような免疫化学的方法、ウエスタン

プロットイング、および免疫組織化学を包含する、当分野で周知の様々な技術を用いて決定できる。別法として、ポリペプチド合成は、11 - HSD1様ポリペプチド内への標識アミノ酸の取り込みを検出することにより、インビボで、細胞培養で、またはインビトロ翻訳系で決定できる。

【0126】

このようなスクリーニングは、無細胞検定系または無傷の細胞のいずれかで実施できる。11 - HSD1様ポリヌクレオチドを発現するいかなる細胞も細胞に基づく検定系で使用できる。11 - HSD1様ポリヌクレオチドは細胞内に天然に存在するか、または上記のような技術を用いて導入することができる。一次培養または確立された細胞系、例えばCHOまたはヒト胚性腎293細胞のいずれかを使用できる。

10

【0127】

医薬組成物

本発明はさらに、治療効果を達成するために患者に投与できる医薬組成物を提供する。本発明に係る医薬組成物は、例えば11 - HSD1様ポリペプチド、11 - HSD1様ポリヌクレオチド、リボザイムまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド、11 - HSD1様ポリペプチドに特異的に結合する抗体、または類似体、アゴニスト、アンタゴニスト、または11 - HSD1様ポリペプチド活性のインヒビターを含み得る。この組成物は単独で、または少なくとも1種類の他の物質、例えば安定化化合物と組み合わせて投与でき、これは、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、および水を包含する（但しこれらに限定されない）任意の無菌で生物学的適合性のある製薬的担体中で投与できる。この組成物は単独で、または他の物質、薬物またはホルモンと組み合わせて患者に投与できる。

20

【0128】

活性成分に加えてこれらの医薬組成物は、賦形剤および補助物質を含む適当な製薬的に許容し得る担体を含み得、これらは、製薬的に使用できる調製物への活性化化合物の処理を促進する。本発明に係る医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、局所、舌下、または直腸手段を包含する（但しこれらに限定されない）多くの経路により投与できる。経口投与用医薬組成物は、当分野で既知の製薬的に許容し得る担体を用いて経口投与に適した用量に調合できる。このような担体により、該医薬組成物を、患者が内服するための錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル剤、液体、ゲル、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などに調合できる。

30

【0129】

経口使用のための医薬製剤は、活性化化合物を、固体賦形剤と合し、得られた混合物を所望により粉碎し、そしてこの顆粒混合物を、所望ならば適当な補助物質を加えた後に処理して錠剤または糖衣剤核を得る。好適な賦形剤は炭水化物またはタンパク質増量剤、例えば乳糖、シュクロース、マンニトール、またはソルビトールを包含する糖；トウモロコシ、小麦、米、馬鈴薯、またはその他の植物由来の澱粉；セルロース、例えばメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウム；アラビアゴムおよびトラガカントゴムを包含するゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質である。所望により崩壊剤または可溶化剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムを添加できる。

40

【0130】

糖衣剤核は、濃縮糖溶液のような適当な被覆剤と共に使用でき、これはさらに、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、carboxypolゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含むことができる。製品の同定のためまたは活性化化合物の量、即ち用量をあらわすために染料または色素を錠剤または糖衣被覆剤に添加できる。

【0131】

経口的に使用できる医薬調合物は、ゼラチン製の押しはめ込むカプセル剤、ならびに、ゼラチンおよび被覆剤、例えばグリセロールまたはソルビトールでできた軟封入カプセル

50

剤を包含する。押しではめ込むカプセル剤は、活性成分を、乳糖または澱粉のような増量剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、および所望により安定剤と混合して含有できる。軟カプセル剤では、活性化合物を、安定剤を加えたまたは加えない適当な液体、例えば脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁できる。

【0132】

非経口投与に好適な医薬製剤は、水溶液、好ましくは生理学的適合性の緩衝液、例えばハanks溶液、リングル溶液、または生理学的に緩衝化した食塩水中で調合できる。水性注射用懸濁剤は、該懸濁液の粘度を増加させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランを含有できる。さらに、活性化合物の懸濁剤は適当な油性注射用懸濁剤として調製できる。好適な親油性溶媒または媒質は、胡麻油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルまたはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームを包含する。非脂質ポリカチオンアミノポリマーもまた送達に使用できる。所望により懸濁剤は、化合物の溶解性を増し高濃縮溶液の調製を可能にするような適当な安定剤または物質を含むことができる。局所または鼻腔投与のためには、透過すべき特定の障壁に対し適当な浸透剤を製剤に使用する。このような浸透剤は当分野で一般に知られている。

10

【0133】

本発明に係る医薬組成物は当分野で既知の方法で、例えば常套的混合、溶解、顆粒化、糖衣剤製造、すりつぶし、乳化、カプセル化、捕捉、または凍結乾燥プロセスによって製造できる。この医薬組成物は塩として提供でき、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、クエン酸、リンゴ酸、琥珀酸などを包含する（但しこれらに限定されない）多くの酸を用いて調製できる。塩は、水性または他のプロトン性溶媒において、対応する遊離塩基型よりもより可溶性の傾向がある。別の場合には、好ましい調製物は、pH範囲4.5から5.5において以下のもの：1 - 50 mMヒスチジン、0.1% - 2%シクロロース、および2 - 7%マンニトール、の全てまたは任意のものを含むことができる凍結乾燥粉末であってよく、これを使用前に緩衝液と合する。

20

【0134】

調合と投与のための技術のさらなる詳細は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa)の最新版に見出すことができる。医薬組成物を製造した後、これらを適当な容器に入れ、適応状態の治療のためにラベルを貼る。このようなラベル表示は、投与の量、頻度、および投与方法を包含する。

30

【0135】

治療上の適応および方法

ヒト11 - HSD1様酵素活性を調節し、CNS障害、骨粗鬆症、肝疾患および肥満症、並びに血圧異常、胎児発育異常および糖尿病などの疾患を処置することができる。

【0136】

CNS障害

処置できるCNS障害には、脳損傷、脳血管疾患及びこれらの予後、パーキンソン病、皮質基底核変性症、運動ニューロン疾患、痴呆（ALS、多発性硬化症、外傷性脳損傷、脳卒中、脳卒中後、外傷後脳損傷および小血管性脳血管疾患を含む）が挙げられる。また、痴呆症、例えばアルツハイマー病、血管性痴呆、レビ小体痴呆、前頭側頭骨痴呆、及び第17染色体に関連したパーキンソニズム、前頭側頭骨痴呆症（ピック病、進行性核麻痺（progressive nuclear palsy）、皮質基底核変性症、ハンチントン病、視床退縮（thalamic degeneration）、クロイツフェルト-ヤコブ病、HIV性痴呆症、痴呆症を伴う統合失調症、及びコルサコフ精神病を含む）を処置できる。同様に、認知関連障害、例えば穏和な認知障害、加齢関連性記憶障害、加齢関係性認知減退、血管性認知障害、注意欠陥障害、注意欠陥多動性障害、及び学習障害を患った子供の記憶障害を、ヒトマトリプターゼ（matriptase）様タンパク質

40

50

の活性を調節することによって処置できる。

【0137】

骨粗鬆症

骨粗鬆症は、低骨量や骨組織の微細構造劣化によって特徴付けられ、骨脆弱性を高め、骨折の危険性を増大させる結果となる疾患である。これは、最も一般的なヒト代謝性骨障害である。確立された骨粗鬆症には、骨折が存在する。

【0138】

骨代謝回転は、骨内部の2種の主な効果細胞：骨再吸収に関係する破骨細胞と、骨基質を合成し且つミネラル化する骨芽細胞、との作用によって生じる。破骨細胞と骨芽細胞との作用は、非常に協調的である。破骨細胞前駆型は、代謝回転部位に補充される；それらは分化して融合し、後に骨を再吸収する成熟破骨細胞を形成する。骨表面に付着した場合、破骨細胞は特殊化した破骨細胞周辺膜と骨基質との間の強固に規定された連結部にて、酸性の微小環境を作り出し、骨基質の局所的可溶化を引き起こす。これにより、続く脱ミネラル化骨コラーゲンのタンパク質分解を容易にする。基質分解により、基質関連成長因子およびサイトカインが放出されると考えられており、それにより、時間的および空間的に調節された様式で骨芽細胞が補充される。骨芽細胞は、新たな骨基質タンパク質を合成し、かつ分泌し、引き続いてこの新たな基質をミネラル化する。このことは、正常な骨格においては、正味の骨量変化にはならない生理学的プロセスである。骨粗鬆症などの病理学的状態においては、再吸収と形成との間の均衡が変化する結果、骨喪失が生じる。W O 9 9 / 4 5 9 2 3 を参照のこと。

10

20

【0139】

破骨細胞自身が、現在利用できる全ての骨粗鬆症物質（フッ化物を除く場合がある）の直接的または間接的な標的である。抗再吸収治療は、処置個体の更なる骨喪失を予防する。骨髄に存在し、さらに脂肪細胞、軟骨細胞、繊維芽細胞および筋細胞となる多能性幹細胞から、骨芽細胞は誘導される。骨芽細胞活性の選択的増進は、骨粗鬆症治療の非常に望ましい目的である、というのはさらなる骨喪失を予防するよりも、骨量を増大させることになるからである。効果的な同化治療は、現在利用可能な処置よりも骨折の危険性をかなり減少させると期待されている。

【0140】

新たに発見したポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニストは、破骨細胞分化、骨基質に対する破骨細胞吸着、または骨基質を分解する破骨細胞機能を直接変化させることによって、抗再吸収として作用し得る。アゴニストまたはアンタゴニストは、破骨細胞の分化または機能の効果分子（例えばサイトカイン、ペプチドまたはステロイドホルモン、プロテアーゼなど）の合成および/または修飾を妨げることによって、破骨細胞機能を間接的に変化させ得るであろう。

30

【0141】

新たに発見されたポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニストは、骨芽細胞分化および/またはその骨基質形成機能を直接増進することにより、同化として作用することができる。さらに、このアゴニストまたはアンタゴニストは、増殖因子、ペプチドまたはステロイドホルモンの合成を増進すること、または阻害分子の合成を低下させることによって、骨芽細胞機能を間接的に変化させ得る。

40

【0142】

このアゴニストおよびアンタゴニストは、新たに発見されたポリペプチドの作用を模倣し、増強し又は阻害するのに用いることができ、それらは骨粗鬆症、パジェット病、骨移植および特に歯移植の分解を処置するのに有用であり得る。

【0143】

肝疾患

全ての慢性肝疾患は、肝臓における繊維症の発症を引き起こす。繊維症は、プログラムされた均一性創傷治療応答である。最も重大な慢性肝疾患は、ウイルス性肝炎BおよびCと、アルコール誘導型肝疾患である。10～30%の間の罹患患者に、後期合併症として肝

50

硬変が発症する。肝硬変の5生率は50%である。肝硬変による死亡は、平均年齢わずか60歳で起こる。アメリカでは9番目に多い死因である。

【0144】

外来タンパク質によって引き起こされる有毒なダメージまたは損傷が、細胞外基質、例えばコラーゲン、フィブロネクチンおよびラミニンなどの析出を引き起こす。その共通のメカニズムは、筋線維芽細胞を産生する基質中へのビタミンA貯蔵性肝星細胞(Ito細胞)の活性化及び形質転換である。これらは増殖し、ディッセ(Disse)の細胞外空間を細胞外基質で埋める。このプロセスはパラ活性化工程と自己分泌活性化工程とから成り、損傷プロセスが長期に渡って持続すると、自己不死化(auto-perpetuated)する。これにより遅延型の進行性シャントが生じ、門脈血および動脈血の肝臓パーフュージョン(灌流)が減少する。この結果、肝機能が喪失する。類洞(sinusoïdal)内皮における窓形成(fenestration)の喪失によって増大化拡散障壁が増強される。これにより機能の喪失が実証される。食道性出血の頻繁合併症を伴う門脈高血圧症。肝疾患死の原因には、肝性昏睡(30%)、食道性出血(30%)および原発性肝癌腫(30%)が含まれる。

10

【0145】

このタンパク質の調節が有効であり得る指標は、肝臓の慢性変性疾患(例えばウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、自己免疫肝炎、原発性胆汁性肝硬変、嚢胞性線維症、血色素症、ウィルソン病、非アルコール性脂肪肝、その他)によって引き起こされる肝臓線維症および肝硬変である。可能な他の指標は、全身硬化症、肺線維症、膵臓線維症、心筋線維症及び前立腺線維症の処置である。

20

【0146】

肥満症

肥満症および過体重は、除脂肪体重と比較した体脂肪の過剰として規定される。カロリー摂取の増加またはエネルギー支出の減少、あるいはその両方が、脂肪として貯えられる余剰エネルギーを導く不均衡を生じさせ得る。肥満症は、重大な医療上の罹患率および死亡率の増加と関連している。肥満症の病因は十分に理解されておらず、遺伝的要因、環境要因またはその2つの組み合わせのために、正方向のエネルギーバランスが引き起こされ得る。対照的に、食欲不振症および悪液質は、エネルギー支出に対するエネルギー取り込みの不均衡によって特徴付けられ、負方向のエネルギーバランスを引き起こし、体重が減少する。エネルギー支出を増大させるか、および/またはエネルギー取り込み、吸収若しくは貯蔵を減少させる物質は、肥満症、過体重、および関連する同時罹患率を処置するのに有用であろう。エネルギー取り込みを増大させる、および/またはエネルギー支出を減少させる、あるいは痩せた組織(lean tissue)の量を増大させる物質は、悪液質、食欲不振症および萎縮病を処置するのに有用であろう。

30

【0147】

この遺伝子、翻訳されたタンパク質、及びこの遺伝子若しくはその遺伝子の一部又はその産物を調整する物質は、肥満症、過体重、食欲不振症、悪液質、萎縮病、食欲抑制、食欲増進、満腹感の増大若しくは減少、体重の調整、および/または過食症などの他の摂食障害を処置するのに有用である。また、この遺伝子、翻訳されたタンパク質、およびこの遺伝子またはその遺伝子産物若しくはその産物を調整する物質は、肥満症/高血圧症、糖尿病II型、環動脈疾患、高脂血症、脳卒中、胆嚢疾患、痛風、変形関節炎、睡眠時無呼吸および呼吸問題を含む過体重関連同時罹患率、幾つかのタイプの癌(子宮体癌、乳癌、前立腺癌および大腸癌を含む)、塞栓疾患、多嚢胞性卵巣症候群、減弱化受胎能、妊娠の合併症、月経不順、多毛症、ストレス尿失禁、及びうつ病、を処置するのに有用である。

40

【0148】

糖尿病

糖尿病は、血糖の異常上昇、脂質の変質、心血管系、目、腎臓および神経系における異常(合併症)によって特徴付けられる一般的な代謝障害である。糖尿病は、2つの別々の疾患:インスリンを産生し、かつ分泌する細胞の喪失が原因の糖尿病I型(若年発症)と、

50

インスリン分泌の欠乏およびインスリン作用の欠乏によって引き起こされる糖尿病 I I 型（成人発症）とに分けられる。

【0149】

糖尿病 I 型は、膵島におけるインスリン分泌細胞（細胞）を攻撃する自己免疫反応によって引き起こされる。この反応の発症を予防するか、またはベータ細胞の破壊が完了する前にこの反応を停止させる物質が、この疾患の可能性のある治療である。細胞の増殖および再生を誘導する別の物質もまた、可能性のある治療である。

【0150】

糖尿病 I I 型は、2つの糖尿病性状態の中で最も一般的である（人口の6%）。インスリン分泌不足が、有力な糖尿病状態の病因であり、適切に検出し、かつ応答してインスリンを放出させ血糖レベルを上昇させる細胞の不能性の結果である。細胞によるグルコースに対する応答を増大させる治療が、これらの疾患の有力な新しい治療を提供するであろう。

【0151】

糖尿病 I I 型被験者におけるインスリン作用の欠損症は、治療処置の別の標的である。筋肉、肝臓および脂肪におけるインスリン受容体の活性を増大させる物質は、血糖の減少および血漿脂質の正常化を生じさせるであろう。受容体活性は、受容体を直接刺激するか、または受容体由来の細胞内シグナルを増大させる物質によって増大させることができる。他の治療は、細胞端（cellular end）プロセス、即ちグルコース輸送または種々の酵素系を直接活性化し、非インスリン様効果を生じさせ、そしてさらに有益な結果を産生することができる。過体重被験者は糖尿病 I I 型の罹患率が高く、体重を減少させる任意の物質が可能性のある治療である。

【0152】

糖尿病 I 型および I I 型の両方は、インスリン活性を模倣し、かつ血糖レベルを減少させることによって糖尿病性合併症を処置する物質を用いて処置できる。同様に、新しい血管成長を低下させる物質を、両方の疾患に発症する目の合併症を処置するのに用いることができる。

【0153】

さらに、本発明は上記のスクリーニング検定によって同定される新規物質の使用に関する。従って、本明細書に記載のように同定される被験化合物を適当な動物モデルにおいて使用することも、本発明の範囲内である。例えば、本明細書に記載のように同定される物質（例えば、調整物質、アンチセンス核酸分子、特定の抗体、リボザイムまたは 11 - HSD 1 様ポリペプチド結合分子）を用いた処置の有効性、毒性または副作用を決定するために、該物質を動物モデルに用いることができる。別法としては、本明細書に記載のように同定される物質の作用メカニズムを決定するために、該物質を動物モデルに用いることができる。さらに、本発明は、本明細書に記載のような治療のための、上記スクリーニング検定によって同定される新規物質に関する。

【0154】

11 - HSD 1 様酵素活性に影響を及ぼす試薬を、インビトロまたはインビボにてヒト細胞に投与し、11 - HSD 1 様酵素活性を低下させることができる。試薬は、ヒト 11 - HSD 1 様酵素遺伝子の発現産物と結合することが好ましい。その発現産物がタンパク質である場合、その試薬は抗体であることが好ましい。エックスピボにおけるヒト細胞の処置について、抗体を、体から取り出しておいた幹細胞の調製物に加えることができる。その後、当分野で知られるように、その細胞を同じまたは別の人体に、クローン増殖させるか、又はさせずに移しかえることができる。

【0155】

1つの態様について、リポソームを用いて試薬を送達する。リポソームは、投与した動物中にて、少なくとも約30分間、より好ましくは少なくとも約1時間、さらにより好ましくは少なくとも約24時間安定であることが好ましい。リポソームは、試薬、特にポリヌクレオチドを、動物（例えばヒト）の特定の部位に標的化することができる脂質組成物を

含む。リポソームの脂質組成物は、動物の特有の器官、例えば肺、肝臓、脾臓、心臓、脳、リンパ節及び皮膚を標的化できることが好ましい。

【0156】

本発明に有用なリポソームは、標的化した細胞の原形質膜と融合でき、その内容物を細胞に送達できる脂質組成物を含む。好ましくは、リポソームのトランスフェクション効率は約 10^6 細胞に送達されるリポソーム 16nmol 当たりDNA約 $0.5\mu\text{g}$ であり、より好ましくは約 10^6 細胞に送達されるリポソーム 16nmol 当たりDNA約 $1.0\mu\text{g}$ であり、さらにより好ましくは約 10^6 細胞に送達されるリポソーム 16nmol 当たりDNA約 $2.0\mu\text{g}$ である。好ましくは、リポソームは直径が、約 $100\sim 500\text{nm}$ であり、より好ましくは約 $150\sim 450\text{nm}$ であり、さらにより好ましくは約 $200\sim 400\text{nm}$ である。 10

【0157】

本発明に用いるに適したリポソームは、例えば当業者に知られる遺伝子送達法に標準的に用いられるリポソームを含む。より好ましいリポソームは、ポリカチオン脂質組成物を有するリポソームおよび/またはポリエチレングリコールと連結されたコレステロールバックボーン(骨格鎖)を有するリポソームを含む。あるいは、リポソームは特定の細胞タイプを標的化できる化合物、例えばリポソームの外側表面に曝される細胞特異的リガンドを包含する。

【0158】

リポソームを、試薬、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムと複合化させることは、当分野で標準的な方法(例えば、米国特許 $5,705,151$ を参照のこと)を用いて達成することができる。好ましくは、ポリヌクレオチド約 $0.1\mu\text{g}\sim$ 約 $10\mu\text{g}$ をリポソーム約 8nmol と複合化する、より好ましくはポリヌクレオチド約 $0.5\mu\text{g}\sim$ 約 $5\mu\text{g}$ をリポソーム約 8nmol と複合化する、さらにより好ましくはポリヌクレオチド約 $10\mu\text{g}$ をリポソーム約 8nmol と複合化する。 20

【0159】

別の態様においては、抗体を、受容体媒介性標的化送達を用いて、インビボにて特定の組織に送達することができる。受容体媒介性DNA送達技術は、例えばFindelsら、Trends in Biotechnol. 11, 202-05 (1993); Chiouら、GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J. A. Wolffら、) (1994); Wu & Wu, J. Biol. Chem. 263, 621-24 (1988); Wuら、J. Biol. Chem. 269, 542-46 (1994); Zenkeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 3655-59 (1990); Wuら、J. Biol. Chem. 266, 338-42 (1991)にて教示されている。 30

【0160】

治療的有効量の決定

治療的有効量の決定は、充分当業者の能力の範囲内にある。治療的有効量とは、治療的有効量の不在下で起こる 11-HSD1 様酵素活性に比較して 11-HSD1 様酵素活性を増大させまたは低下させる活性成分の量を指す。 40

【0161】

いかなる化合物に関しても、治療的有効量は最初に細胞培養検定で、または動物モデル、通常マウス、ウサギ、イヌ、またはブタで見積もることができる。動物モデルは適当な濃度範囲および投与経路の決定にも使用できる。次にこのような情報を用いて人間での有用な用量と投与経路を決定できる。

【0162】

治療的有効性および毒性、例えば ED_{50} (集団の50%で治療的に有効な用量)および LD_{50} (集団の50%で致死的な用量)は、細胞培養または実験動物における標準的薬学的方法により決定できる。治療効果に対する毒性効果の用量比が治療指数であり、比L 50

D_{50} / ED_{50} で表すことができる。

【0163】

大きな治療指数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養検定および動物研究から得られるデータを、人間への使用のための用量範囲を処方する際に使用する。かかる組成物に含まれる用量は、好ましくは殆どまたは全く毒性を持たない ED_{50} を包含する循環濃度の範囲内である。この用量は、使用する用量型、患者の感受性、および投与経路に応じてこの範囲内で変わる。

【0164】

正確な用量は、治療を必要とする対象に関連する因子に照らして医師が決定する。用量および投与は、十分なレベルの活性成分を提供するよう、または所望の効果を維持するよう、調節する。考慮できる因子は、疾病状態の重篤度、対象の全身健康状態、年齢、体重、および対象の性別、食餌、投与の時間および頻度、薬物の組み合わせ、反応の感受性、および療法に対する寛容/応答を包含する。長時間作用性医薬組成物は、その製剤の半減期およびクリアランス率に応じて3から4日毎、毎週、または2週間に1回投与することができる。

10

【0165】

標準的な用量は投与経路に応じて0.1から100000マイクログラムまで変えることができ、約1gまでの総用量とすることができる。特定の用量および送達方法についての指針は文献に提供されており、一般に当分野の医師が入手できる。当業者は、ヌクレオチド用にはタンパク質またはそれらのインヒビター用のものとは異なる製剤を使用するであらう。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は特定の細胞、状態、場所などに特異的である。

20

【0166】

この試薬が一本鎖抗体である場合、この抗体をコードしているポリヌクレオチドを組み立て、トランスフェリン-ポリカチオン-媒介DNA転移、裸のまたはカプセル内核酸を用いるトランスフェクション、リポソームの媒介する細胞融合、DNA被覆ラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、電気穿孔、「遺伝子銃」、およびDEAE-または燐酸カルシウム-媒介トランスフェクションを包含する(但しこれらに限定される訳ではない)充分確立した技術を用いて、*ex vivo*またはインビボで細胞内に導入できる。

30

【0167】

抗体の有効なインビボ用量は、約5 μ gから約50 μ g/kg、約50 μ gから約5mg/kg、約100 μ gから約500 μ g/kg(患者の体重)、および約200から約250 μ g/kg(患者の体重)の範囲である。一本鎖抗体をコードしているポリヌクレオチドの投与のためには、有効なインビボ用量は、約100ngから約200ng、500ngから約50mg、約1 μ gから約2mg、約5 μ gから約500 μ g、および約20 μ gから約100 μ gのDNAの範囲である。

【0168】

発現産物がmRNAである場合、試薬は好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムである。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを発現するポリヌクレオチドは、上記のように多岐にわたる方法によって細胞中に導入できる。

40

【0169】

好ましくは、試薬は、11-HSD1様酵素遺伝子の発現または11-HSD1様ポリペプチドの活性を、該試薬の不在時と比較して少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下させる。11-HSD1様酵素遺伝子の発現レベルまたは11-HSD1様ポリペプチドの活性を低下させるよう選択した機構の有効性は、当分野で周知の方法、例えば11-HSD1様酵素特異的mRNAへのヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーション、定量的RT-PCR、11-HSD1様ポリペプチドの免疫学的検出、または11-HSD1様酵素活性の測定を用いて評価できる。

50

【0170】

上記のいずれの態様においても、本発明に係る任意の医薬組成物は他の適当な治療薬と組み合わせて投与できる。併用療法に使用するための適当な物質の選択は、常套的製薬原理に従い、当業者により実施することができる。治療薬の組み合わせは、相乗的に働いて、上記の様々な疾患の治療または予防を奏効させる。このアプローチを用いて、より低い各物質の用量で治療効果を達成することができ、したがって有害な副作用の可能性を低減することができる。

【0171】

上記の治療方法のいずれも、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、および最も好ましくはヒトといった哺乳動物を包含する、このような治療を必要とする任意の対象に適用することができる。

10

【0172】

診断方法

ヒト11 - HSD1様酵素はさらに、この酵素をコードしている核酸配列における突然変異の存在に関連する疾病および異常、または疾病および異常に対する感受性を検出する診断検定に使用できる。例えば、疾患に罹患している個体と正常な個体とにおける11 - HSD1様酵素をコードするcDNAまたはゲノム配列の間の差異を決定できる。もし、罹患している個体の幾つかまたは全てに突然変異が観察され、正常な個体で観察されないならば、その突然変異がその疾患の原因物質である可能性がある。

【0173】

レファレンス遺伝子および突然変異を有する遺伝子の間の配列相違は、直接DNA配列決定法によって明らかにできる。加えて、クローニングしたDNAセグメントを、特定のDNAセグメントを検出するためのプローブとして使用できる。この方法の感受性はPCRと組み合わせる時極めて増強される。例えば、二本鎖PCR産物または修飾PCRにより調製された一本鎖テンプレート分子と共に、配列決定プライマーを使用することができる。配列決定は、放射標識したヌクレオチドを用いる常套的方法によって、または蛍光標識を使用する自動配列決定法によって実施する。

20

【0174】

DNA配列相違に基づく遺伝子試験は、変性させる物質を含むまたは含まないゲル中のDNA断片の電気泳動移動度の変化を検出することにより実施できる。小配列の欠失および挿入は、例えば高分解能ゲル電気泳動によって視覚化できる。異なる配列のDNA断片は変性させるホルムアミド勾配ゲル上で識別でき、ここでは、異なるDNA断片の移動度が、それらの特異的融解温度または部分的融解温度に従って、ゲル中の異なる位置で遅延する(例えば、Myersら、Science 230, 1242, 1985を参照されたい)。特定の位置での配列改変もまたヌクレアーゼ保護検定、例えばRNアーゼおよびS1保護または化学的開裂法によって明らかにすることができる(例えば、Cottonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4397-4401, 1985)。即ち特異的DNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNアーゼ保護、化学的開裂、直接DNA配列決定といった方法によって、または制限酵素とゲノムDNAのサザンプロットングを使用することによって実施できる。ゲル電気泳動およびDNA配列決定のような直接法に加えて、突然変異は*in situ*分析により検出することもできる。

30

40

【0175】

11 - HSD1様酵素レベルの変化もまた種々の組織で検出できる。血液または組織生検のように、宿主から誘導した身体試料中のタンパク質ポリペプチドのレベルを検出するために用いる検定は、当業者に周知であり、ラジオイムノアッセイ、競合的結合検定、ウェスタンプロット分析、およびELISA検定を包含する。

【0176】

本明細書に引用する全ての特許および特許出願は、引用により特に本明細書の一部とする。上記の内容は本発明を一般的に記載するものである。より完全な理解は以下の具体的実

50

施例を参照することによって得られ、それらの実施例は例示のみの目的で提供するものであり、本発明の範囲を限定する意図は無い。

【0177】

実施例 1

11 - HSD1 様酵素活性の検出

配列番号1のポリヌクレオチドを発現ベクター pCEV4 中に挿入し、得られた発現ベクター pCEV4-11 - HSD1 様酵素ポリペプチドを、ヒト胚性腎臓 293 細胞中にトランスフェクトする。この細胞から抽出物を得て、11 - HSD1 活性を、濃度範囲 (0 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$) の冷コルチコステロンと NADP または NAD のいずれかの補因子 (0.2 mmol/L) の存在下にて、12 mmol/L H - コルチコステロン (1, 2, 6, 7 H - コルチコステロン、特異的活性 86 Ci/mmol; Amer sham Life Sciences Ltd.) から放射能 11 - デヒドロコルチコステロンへの変換を測定することによって決定する。ステロイドを酢酸エチル中に抽出し、高性能液体クロマトグラフィーにより分離する。最高速度 (V_{max}) と K_m 値とを、種々の冷コルチコステロン濃度を用いて、H - コルチコステロンから 11 - デヒドロコルチコステロンへの変換%を用いて評価する。配列番号2が11 - HSD1 様酵素活性を有することが示される。

10

【0178】

実施例 2

組換えヒト 11 - HSD1 様酵素

ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) 発現ベクター pPICZB (Invitrogen, San Diego, CA) を用いて、大量の組換えヒト 11 - HSD1 ポリペプチドを酵母中に生産させる。11 - HSD1 様酵素コード化 DNA 配列には配列番号1が含まれる。ベクター pPICZB 中に挿入する前に、DNA 配列を、5' 端に開始コドン、及び 3' 端にエンテロキナーゼ開列部位、His6 レポータータグや終止コドンを含ませるといった周知の方法によって修飾する。さらに、両末端に、制限エンドヌクレアーゼの認識配列を加え、対応する制限酵素を用いて pPICZB のマルチクローニングサイトを消化した後、修飾した DNA 配列を pPICZB 中にライゲートする。この発現ベクターを、ピキア パストリスにて酵母プロモーターによって誘導される誘導性発現用に設計する。得られた pPICZ/md - His6 ベクターを用いて、酵母を形質転換する。

20

30

【0179】

この酵母を、5リッター攪拌フラスコ中で通常の条件下にて培養し、組換え産物化したタンパク質を、8Mウレアの存在下にて親和性クロマトグラフィー (Ni-NTA-樹脂) により培養物から単離する。結合したポリペプチドを、pH 3.5 の緩衝液を用いて溶出し、中性化する。His6 レポータータグからのポリペプチドの分離は、製造元の指示に従い、エンテロキナーゼ (Invitrogen, San Diego, CA) を用いる部位特異的タンパク質分解によって達成される。精製ヒト 11 - HSD1 様ポリペプチドを得る。

【0180】

実施例 3

腎細胞における 11 - HSD1 活性の決定; 11 - HSD1 活性を変化させる化合物の同定

11 - HSD1 活性を上記 Lloyd - MacGillp のように実質的に測定する。腎臓を冷却 Krebs - Ringer 溶液 (0.1 mol/L NaCl、2.5 mmol/L KCl、2.5 mmol/L CaCl_2 、1.2 mmol/L KH_2PO_4 、1.2 mmol/L MgSO_4 及び 25 mmol/L NaHCO_3) 中にて区分化し、皮膚組織を髄質内部組織から切り出す。それぞれの領域を別々に処理する。4 倍量リンガー (Ringer) 溶液にホモジネートした後、そのホモジネートを 20 分間、16,000 $\times g$ で遠心分離し、その上清を 4、10、600 $\times g$ で 1 時間、遠心分離し、ミク

40

50

ロソーマルフラクションを調製する。

【0181】

反応物の一部を小分子ライブラリー由来の被験化合物と接触させる。コントロール試料を被験化合物の非存在化にてインキュベートする。37 で10分間、インキュベートした後、酢酸エチル2mlを添加し、その反応を停止させる。

【0182】

ミクロソームにおけるデヒドロゲナーゼ活性を、濃度範囲(0~10 μ mol/L)の冷コルチコステロンとNADPまたはNADのいずれかの補因子(0.2mmol/L)の存在下にて12mmol/LH-コルチコステロン(1, 2, 6, 7 H-コルチコステロン、特異的活性86Ci/mmol; Amersham Life Sciences Ltd.)から放射能11-デヒドロコルチコステロンへの変換について測定することによって決定する。ステロイドを酢酸エチル中に抽出し、高性能液体クロマトグラフィーによって分離する。最高速度(V_{max})と K_m 値とを、種々のコルチコステロン濃度を用いて、H-コルチコステロンから11-デヒドロコルチコステロンへの変換%を用いて評価する。 V_{max} または K_m 値を20%まで増大または低下させる被験化合物を、11-HSD1様酵素を調節する可能性のある治療物質として同定する。

【0183】

実施例4

11-HSD1様酵素遺伝子発現を低下させる被験化合物の同定

被験化合物を、11-HSD1様酵素発現構築物でトランスフェクトしたヒト細胞培養に投与し、37 で10~45分間、インキュベートする。トランスフェクトしていない同じタイプの細胞培養を、被験化合物を加えず、同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。

【0184】

RNAを、Chirgwinら、Biochem. 18, 5294-99, 1979に記載のように2つの培養物から単離する。ノーザンブロットを全RNA20~30 μ gを用いて調製し、エクスプレスハイブ(Expresshyb)(CLONTECH)にて、³²P-標識化11-HSD1様酵素特異的プローブを用いてハイブリダイズさせる。このプローブは配列番号1の相補物より選ばれる少なくとも11個の連続ヌクレオチドを包含する。被験化合物の非存在下にて得られるシグナルと比較して、11-HSD1様酵素特異的シグナルを低下させる被験化合物を、11-HSD1様酵素遺伝子発現のインヒビターとして同定する。

【0185】

実施例5

11-HSD1遺伝子産物と特異的に結合する試薬を用いる中枢神経系障害の処置

配列番号1の相補物より選択される少なくとも11個の連続ヌクレオチドを含むアンチセンス11-HSD1オリゴヌクレオチドの合成は、ホスホラミダイト手順を用いて、ファルマシア ジーン アsembler シリーズ シンセサイザー(Pharmacia Gene Assembler series synthesizer)にて実施する。上記、Uhlmannらを参照のこと。アsemblerおよび脱保護に続き、ヌクレオチドを、2度エタノール沈殿させ、乾燥させ、そしてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に所望の濃度に懸濁する。これらのオリゴヌクレオチドの純度を、キャピラリーゲル電気泳動と、イオン交換HPLCにより試験する。オリゴヌクレオチド調製のエンドトキシンレベルを、Limulus Amebocyte Assay, Bang, Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.) 105, 361-362 (1953)を用いて決定する。

【0186】

濃度0.1~100 μ Mのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む水性組成物を、CMS疾患に苦しむ患者に注射により投与する。それにより、疾患の重症度を低下させる。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【図1】 11 - HSD1様酵素ポリペプチドをコードしているDNA配列（配列番号1）。

【図2】 図1に記載のDNA配列から推定されるアミノ酸配列（配列番号2）。

【図3】 スイスプロット アクセションナンバー P16232 と同一であるタンパク質のアミノ酸配列（配列番号3）。

【図4】 11 - HSD1様酵素ポリペプチドをコードしているDNA配列（配列番号4）。

【図5】 11 - HSD1様酵素ポリペプチドをコードしているDNA配列（配列番号5）。

【図6】 11 - HSD1様酵素ポリペプチドをコードしているDNA配列（配列番号6）。

【図7】 スイスプロット アクセションナンバー P16232（配列番号3）と同一であるタンパク質と、11 - HSD1様酵素ポリペプチド（配列番号2）のBLASTXアライメント。

【図7】

BLASTX - 質問 (クエリー) = AW163684; ヒット = スイス | P16232 | DHI1_RAT

このヒットは : 3e-11 (期待値) におけるスコアリングである

アライメント長 (オーバーラップ) : 86

一致度 : 43 %

スコアリングマトリックス : BLOSUM62 (一致パターンを決定するのに用いる)

クエリーリーディングフレーム : +3

データベースサーチ : nrdb

```
Q: 252 PASLQGARVLLTGANAGVGEELAYHYARLQSHLVLTARTEALLQKVVGNCKLAAPRSSH
      P...LQG...V...TGA...G.G.E:AYH...:G:H:VLTA...E. LQKVV...C :L:A...:
H: 25  PEMLQGGKIVITGASKGIGREMYHLSKXGQANVVLTARSEEGLQKVVSRCLELGAASAHY
      RGGPGLX*CARERGFALDQ-LGGLD 506
      .G. . . . .ER . . . . . LGGLD
      IAGTMEDMAFAERFVVEAGKLLGGLD 110
```

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/02797 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/00
 - (21) International Application Number: PCT/JP01/07632
 - (22) International Filing Date: 4 July 2001 (04.07.2001)
 - (25) Filing Language: English
 - (26) Publication Language: English
 - (30) Priority Data:
 - 00/216,350 5 July 2000 (05.07.2000) US
 - 00/231,295 8 September 2000 (08.09.2000) US
 - (71) Applicant (for all designated States except US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); 51368 Leverkusen (DE)
 - (72) Inventor: and
 - (75) Inventor/Applicant (for US only): RAMAKRISHNAN, Shyam (IN/US); 76 Euston Road, Apt. #10, Brighton, MA 02135 (US)
 - (74) Common Representative: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, 51368 Leverkusen (DE)
 - (81) Designated States (traditional): AP, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KH, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
 - (84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
 — without international search report and to be republished upon receipt of that report
 — with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/02797 A2

(54) Title: REGULATION OF HUMAN 11 BETA HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE 1 LIKE ENZYME

(57) Abstract: Reagents which regulate human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1-like enzyme and reagents which bind to human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1-like enzyme gene products can play a role in preventing, ameliorating, or correcting dysfunctions or diseases including, but not limited to CNS disorders, osteoporosis, liver disease, obesity, blood pressure or fetal development abnormalities, and diabetes.

**REGULATION OF HUMAN 11 BETA-HYDROXYSTEROID
DEHYDROGENASE 1-LIKE ENZYME**

5 **TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION**

The invention relates to the regulation of human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1-like enzyme.

10 **BACKGROUND OF THE INVENTION**

Glucocorticoid levels in tissues are modulated by the enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Two isoforms of the enzyme have been isolated. The type I enzyme (11 β -HSD1) is a bifunctional enzyme which acts predominantly as an oxidoreductase to form the active glucocorticoids cortisol (in man) or corticosterone (in rodents) from their inactive 11-keto metabolites, cortisone and 11-dehydrocorticosterone, respectively. Agurwal *et al.*, *J. Biol. Chem* 264, 18939-46, 1989. The type II isoform (11 β -HSD2) acts unidirectionally to produce inactive 11-keto metabolites. It utilizes NAD to metabolize glucocorticoids to 11-keto compounds with low affinity for glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. Albiston *et al.*, *Molec. Cell Endocr* 105, R11-17, 1994; Funder *et al.*, *Science* 242, 583-85, 1988; Edwards *et al.*, *Lancet* 2, 986-89, 1988.

Gene deletion experiments in mice indicate that this enzyme is important for the maintenance of normal serum glucocorticoid levels and is involved in the activation of key hepatic gluconeogenic enzymes. Other important sites of action include omental fat, ovary, kidney, brain, and vasculature. Koozowsky *et al.*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69, 391-401, 1999. 11 β -HSD1 activity is found in all major blood vessels and the heart and is higher in resistance vessels, suggesting a role of 11 β -HSD1 in modulating blood pressure. Walker *et al.*, *Endocrinol.* 129, 3305-12, 1991. 11 β -HSD1 and 11 β -HSD2 mRNA coexist in rat aortic endothelial cells, with the 11 β -HSD1 isoform

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 2 -

predominating. Brem *et al.*, *Hypertension* 31, 459-62, 1998. Selective inhibition of 11 β -HSD1 activity attenuates the contractile effect of phenylephrine and angiotensin II on aortic rings. Brem *et al.*, *Hypertension* 30, 449-54, 1997.

5 The highest concentrations of 11 β -HSD1 enzyme are in the liver. Immunohistochemical studies in human liver show that 11 β -HSD1 is concentrated around the central vein. Ricketts *et al.*, *J. Endocrinol.* 156, 159-68, 1998. Hepatic 11 β -HSD1 participates in detoxification mechanisms. Opperman *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 227, 202-08, 1995. The levels of the two 11 β -HSD1 isoforms differ and change during fetal
10 brain development. High amounts of 11 β -HSD1 are found in rat kidneys and in human placenta, but lower levels are seen in women taking oral contraceptives. See review by Kozowsky, *Mol. Cell. Endocrin.* 101, 121-27, 1999.

In the rat liver, 11 β -HSD1 mRNA is present at low levels in the neonate, increasing to
15 a plateau at 8 weeks of age (Krozowski *et al.*, 1990). Males have about 20-fold more 11 β -HSD1 mRNA than females, and the levels in females are suppressed by estradiol and growth hormone. Low *et al.*, *J. Endocrinol.* 143, 541-48, 1994; Albiston *et al.*, *Mol. Cell. Endocrinol.* 109, 183-88, 1995.

20 Factors that affect 11 β -HSD1 expression are known. In the hepatoma cell line 2S FAZA, 11 β -HSD1 activity and mRNA expression are increased by dexamethasone and decreased by forskolin and insulin-like growth factor 1. Voice *et al.*, *Biochem J.* 317, 621-25, 1996. Studies in rat and human hepatocytes have shown that thyroid hormone and progesterone exert species-specific effects on 11 β -HSD1 activity but
25 have no effect on message levels. Ricketts *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 1325-35, 1998. Exposure of rats to dexamethasone in late pregnancy results in significant increases in glucocorticoid receptor and phosphoenolpyruvate carboxykinase, without changes in 11 β -HSD1 in the adult offspring. Nyironda *et al.*, *J. Clin. Invest.* 101, 2174-81, 1998.

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 3 -

It is obvious that 11 β -HSD1 expression and its regulation are delicately balanced, as well as tissue- and developmental-stage specific. A need exists for further identification of similar enzymes which can be regulated to provide therapeutic effects, for example, via developmental stage- or tissue-specific agonists/antagonists.

5

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of the invention to provide reagents and methods of regulating a human 11 β -HSD1-like enzyme. This and other objects of the invention are provided by one or more of the embodiments described below.

10

One embodiment of the invention is a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

15 amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

20 Yet another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

25 amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 4 -

Binding between the test compound and the 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide is detected. A test compound which binds to the 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation. The agent can work by decreasing the activity of the 11 β -HSD1-like enzyme.

5

Another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a polynucleotide encoding a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

10

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1; and

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1.

15

Binding of the test compound to the polynucleotide is detected. A test compound which binds to the polynucleotide is identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation. The agent can work by decreasing the amount of the 11 β -HSD1-like enzyme through interacting with the 11 β -HSD1-like enzyme mRNA.

20

Another embodiment of the invention is a method of screening for agents which regulate extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

25

amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 5 -

A 11β -HSD1-like enzyme activity of the polypeptide is detected. A test compound which increases 11β -HSD1-like enzyme activity of the polypeptide relative to 11β -HSD1-like enzyme activity in the absence of the test compound is thereby identified as a potential agent for increasing extracellular matrix degradation. A test compound

5 which decreases 11β -HSD1-like enzyme activity of the polypeptide relative to 11β -HSD1-like enzyme activity in the absence of the test compound is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation.

Even another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a 11β -

10 HSD1-like enzyme product of a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1; and

15 the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1.

Binding of the test compound to the 11β -HSD1-like enzyme product is detected. A test compound which binds to the 11β -HSD1-like enzyme product is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation.

20

Still another embodiment of the invention is a method of reducing extracellular matrix degradation. A cell is contacted with a reagent which specifically binds to a polynucleotide encoding a 11β -HSD1-like enzyme polypeptide or the product encoded by the

25 polynucleotide, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1; and

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 6 -

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1.

11 β -HSD1-like enzyme activity in the cell is thereby decreased.

5 The invention thus provides a human 11 β -HSD1-like enzyme which can be used to identify test compounds which may act, for example, as agonists or antagonists at the enzyme's active site. Human 11 β -HSD1-like enzyme and fragments thereof also are useful in raising specific antibodies which can block the enzyme and effectively reduce its activity.

10

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 shows the DNA-sequence encoding a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide (SEQ ID NO:1).

15 Fig. 2 shows the amino acid sequence deduced from the DNA-sequence of Fig.1 (SEQ ID NO:2).

Fig. 3 shows the amino acid sequence of the protein identified with SwissProt Accession No. P16232 (SEQ ID NO:3).

20 Fig. 4 shows the DNA-sequence encoding a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide (SEQ ID NO:4).

Fig. 5 shows the DNA-sequence encoding a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide (SEQ ID NO:5).

Fig. 6 shows the DNA-sequence encoding a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide (SEQ ID NO:6).

25 Fig. 7 shows the BLASTX alignment of 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide (SEQ ID NO:2) with the protein identified with SwissProt Accession No. P16232 (SEQ ID NO:3).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 7 -

The invention relates to an isolated polynucleotide encoding a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide and being selected from the group consisting of:

- 5 a) a polynucleotide encoding a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
amino acid sequences which are at least about 50% identical to
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.
- b) a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1;
- 10 c) a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide specified in (a) and (b);
- d) a polynucleotide the sequence of which deviates from the polynucleotide sequences specified in (a) to (c) due to the degeneration of the genetic code; and
- 15 e) a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of a polynucleotide sequence specified in (a) to (d).

Furthermore, it has been discovered by the present applicant that a novel 11 β -HSD1-like enzyme, particularly a human 11 β -HSD1-like enzyme, is a discovery of the present invention. Human 11 β -HSD1-like enzyme comprises the amino acid sequence
20 shown in SEQ ID NO:2 (GenBank Accession No. AW163684). Human 11 β -HSD1-like enzyme was identified by searching human sequences with a rat corticosteroid 11 β dehydrogenase (SEQ ID NO:3, SwissProt Accession No. P16232). Human 11 β -HSD1-like enzyme is 43% identical over 86 amino acids to the rat protein identified
25 with SwissProt Accession No. P16232 (FIG. 7). The human 11 β -HSD1-like enzyme of the invention is therefore expected to be useful for the same purposes as previously identified hydroxysteroid dehydrogenases, such as the careful balancing of steroid levels in various tissues and during fetal development. Further, steroid regulation is expected to have a significant role in osteoporosis. Thus, human 11 β -HSD1-like
30 enzyme can be used in therapeutic methods to treat disorders such as CNS, osteoporosis, blood pressure, fetal development disorders, and diabetes. Human 11 β -HSD1-like

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 8 -

enzyme also can be used to screen for human 11 β -HSD1-like enzyme agonists and antagonists and in diagnostic methods.

Polypeptides

5

11 β -HSD1-like polypeptides according to the invention comprise at least 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, or 220 contiguous amino acids selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or a biologically active variant thereof, as defined below. An 11 β -HSD1-like polypeptide of the invention therefore can be a portion of an 11 β -HSD1-like enzyme protein, a full-length 11 β -HSD1-like enzyme protein, or a fusion protein comprising all or a portion of an 11 β -HSD1-like enzyme protein.

10

Biologically Active Variants

15

11 β -HSD1-like polypeptide variants which are biologically active, *i.e.*, retain the ability to interconvert cortisol and cortisone, also are 11 β -HSD1-like polypeptides. Preferably, naturally or non-naturally occurring 11 β -HSD1-like polypeptide variants have amino acid sequences which are at least about 44, 50, 55, 60, 65, or 70, preferably about 75, 80, 85, 90, 96, 96, or 98% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or a fragment thereof. Percent identity between a putative 11 β -HSD1-like polypeptide variant and an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is determined using the Blast2 alignment program (Blast2, Expect 10, standard genetic codes).

20

25

Variations in percent identity can be due, for example, to amino acid substitutions, insertions, or deletions. Amino acid substitutions are defined as one for one amino acid replacements. They are conservative in nature when the substituted amino acid has similar structural and/or chemical properties. Examples of conservative replace-

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 9 -

ments are substitution of a leucine with an isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, or a threonine with a serine.

Amino acid insertions or deletions are changes to or within an amino acid sequence.

- 5 They typically fall in the range of about 1 to 5 amino acids. Guidance in determining which amino acid residues can be substituted, inserted, or deleted without abolishing biological or immunological activity of an 11 β -HSD1-like polypeptide can be found using computer programs well known in the art, such as DNASTAR software. Whether an amino acid change results in a biologically active 11 β -HSD1-like polypeptide can readily be determined by assaying for conversion of cortisone to cortisol, as described for example, in the specific Examples, below.
- 10

Fusion Proteins

- 15 Fusion proteins are useful for generating antibodies against 11 β -HSD1-like polypeptide amino acid sequences and for use in various assay systems. For example, fusion proteins can be used to identify proteins which interact with portions of an 11 β -HSD1-like polypeptide. Protein affinity chromatography or library-based assays for protein-protein interactions, such as the yeast two-hybrid or phage display systems, can be used for this purpose. Such methods are well known in the art and also can be used as drug screens.
- 20

- An 11 β -HSD1-like polypeptide fusion protein comprises two polypeptide segments fused together by means of a peptide bond. The first polypeptide segment comprises at least 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, or 250 contiguous amino acids of SEQ ID NO:2 or of a biologically active variant, such as those described above. The first polypeptide segment also can comprise full-length 11 β -HSD1-like enzyme protein.
- 25

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 10 -

The second polypeptide segment can be a full-length protein or a protein fragment. Proteins commonly used in fusion protein construction include β -galactosidase, β -glucuronidase, green fluorescent protein (GFP), autofluorescent proteins, including blue fluorescent protein (BFP), glutathione-S-transferase (GST), luciferase, horseradish peroxidase (HRP), and chloramphenicol acetyltransferase (CAT). Additionally, epitope tags are used in fusion protein constructions, including histidine (His) tags, FLAG tags, influenza hemagglutinin (HA) tags, Myc tags, VSV-G tags, and thioredoxin (Trx) tags. Other fusion constructions can include maltose binding protein (MBP), S-tag, Lex A DNA binding domain (DBD) fusions, GAL4 DNA binding domain fusions, and herpes simplex virus (HSV) BP16 protein fusions. A fusion protein also can be engineered to contain a cleavage site located between the 11 β -HSD1-like polypeptide-encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that the 11 β -HSD1-like polypeptide can be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

15 A fusion protein can be synthesized chemically, as is known in the art. Preferably, a fusion protein is produced by covalently linking two polypeptide segments or by standard procedures in the art of molecular biology. Recombinant DNA methods can be used to prepare fusion proteins, for example, by making a DNA construct which comprises coding sequences selected from SEQ ID NOS: 1, 4, 5, or 6 in proper reading frame with nucleotides encoding the second polypeptide segment and expressing the DNA construct in a host cell, as is known in the art. Many kits for constructing fusion proteins are available from companies such as Promega Corporation (Madison, WI), Stratagene (La Jolla, CA), CLONTECH (Mountain View, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA), and Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS).

Identification of Species Homologs

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 11 -

Species homologs of human 11 β -HSD1-like polypeptide can be obtained using 11 β -HSD1-like polypeptide polynucleotides (described below) to make suitable probes or primers for screening cDNA expression libraries from other species, such as mice, monkeys, or yeast, identifying cDNAs which encode homologs of 11 β -HSD1-like polypeptide, and expressing the cDNAs as is known in the art.

Polynucleotides

Coding sequence for human 11 β -HSD1-like enzyme Accession No. are found in human clones identified by GenBank Accession Nos. AW163684 (SEQ ID NO:1), AW162782 (SEQ ID NO:4), AI554725 (SEQ ID NO: 5), and AI436330 (SEQ ID NO: 6).

An 11 β -HSD1-like polynucleotide can be single- or double-stranded and comprises a coding sequence or the complement of a coding sequence for an 11 β -HSD1-like polypeptide. Degenerate nucleotide sequences encoding human 11 β -HSD1-like polypeptides, as well as homologous nucleotide sequences which are at least about 50, 55, 60, 65, 70, preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 also are 11 β -HSD1-like polynucleotides. Percent sequence identity between the sequences of two polynucleotides is determined using computer programs such as ALIGN which employ the FASTA algorithm, using an affine gap search with a gap open penalty of -12 and a gap extension penalty of -2. Complementary DNA (cDNA) molecules, species homologs, and variants of 11 β -HSD1-like polynucleotides which encode biologically active 11 β -HSD1-like polypeptides also are 11 β -HSD1-like polynucleotides.

Identification of Polynucleotide Variants and Homologs

Variants and homologs of the 11 β -HSD1-like polynucleotides described above also are 11 β -HSD1-like polynucleotides. Typically, homologous 11 β -HSD1-like polynu-

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 12 -

cleotide sequences can be identified by hybridization of candidate polynucleotides to known 11 β -HSD1-like polynucleotides under stringent conditions, as is known in the art. For example, using the following wash conditions--2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, pH 7.0), 0.1% SDS, room temperature twice, 30 minutes each; then 2X SSC, 0.1% SDS, 50°C once, 30 minutes; then 2X SSC, room temperature twice, 10 minutes each--homologous sequences can be identified which contain at most about 25-30% basepair mismatches. More preferably, homologous nucleic acid strands contain 15-25% basepair mismatches, even more preferably 5-15% basepair mismatches.

Species homologs of the 11 β -HSD1-like polynucleotides disclosed herein also can be identified by making suitable probes or primers and screening cDNA expression libraries from other species, such as mice, monkeys, or yeast. Human variants of 11 β -HSD1-like polynucleotides can be identified, for example, by screening human cDNA expression libraries. It is well known that the T_m of a double-stranded DNA decreases by 1-1.5°C with every 1% decrease in homology (Bonner *et al.*, *J. Mol. Biol.* 81, 123 (1973)). Variants of human 11 β -HSD1-like polynucleotides or 11 β -HSD1-like polynucleotides of other species can therefore be identified by hybridizing a putative homologous 11 β -HSD1-like polynucleotide with a polynucleotide having a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 4, 5, or 6 or the complement thereof to form a test hybrid. The melting temperature of the test hybrid is compared with the melting temperature of a hybrid comprising polynucleotides having perfectly complementary nucleotide sequences, and the number or percent of basepair mismatches within the test hybrid is calculated.

Nucleotide sequences which hybridize to 11 β -HSD1-like polynucleotides or their complements following stringent hybridization and/or wash conditions also are 11 β -HSD1-like polynucleotides. Stringent wash conditions are well known and understood in the art and are disclosed, for example, in Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed., 1989, at pages 9.50-9.51.

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 13 -

Typically, for stringent hybridization conditions a combination of temperature and salt concentration should be chosen that is approximately 12-20°C below the calculated T_m of the hybrid under study. The T_m of a hybrid between a 11 β -HSD1-like polynucleotide having a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, 4, 5, or 6 or the complement thereof and a polynucleotide sequence which is at least about 50, preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to one of those nucleotide sequences can be calculated, for example, using the equation of Bolton and McCarthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 1390 (1962):

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G + C) - 0.63(\%\text{formamide}) - 600/l,$$

where l = the length of the hybrid in basepairs.

Stringent wash conditions include, for example, 4X SSC at 65°C, or 50% formamide, 4X SSC at 42°C, or 0.5X SSC, 0.1% SDS at 65°C. Highly stringent wash conditions include, for example, 0.2X SSC at 65°C.

15

Preparation of Polynucleotides

An 11 β -HSD1-like polynucleotide can be isolated free of other cellular components such as membrane components, proteins, and lipids. Polynucleotides can be made by a cell and isolated using standard nucleic acid purification techniques, or synthesized using an amplification technique, such as the polymerase chain reaction (PCR), or by using an automatic synthesizer. Methods for isolating polynucleotides are routine and are known in the art. Any such technique for obtaining a polynucleotide can be used to obtain isolated 11 β -HSD1-like polynucleotides. For example, restriction enzymes and probes can be used to isolate polynucleotide fragments which comprises 11 β -HSD1-like enzyme nucleotide sequences. Isolated polynucleotides are in preparations which are free or at least 70, 80, or 90% free of other molecules.

11 β -HSD1-like enzyme cDNA molecules can be made with standard molecular biology techniques, using 11 β -HSD1-like enzyme mRNA as a template. 11 β -HSD1-like

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 14 -

enzyme cDNA molecules can thereafter be replicated using molecular biology techniques known in the art and disclosed in manuals such as Sambrook *et al.* (1989). An amplification technique, such as PCR, can be used to obtain additional copies of polynucleotides of the invention, using either human genomic DNA or cDNA as a template.

Alternatively, synthetic chemistry techniques can be used to synthesize 11 β -HSD1-like polynucleotides. The degeneracy of the genetic code allows alternate nucleotide sequences to be synthesized which will encode an 11 β -HSD1-like polypeptide having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or a biologically active variant thereof.

Extending Polynucleotides

The partial sequences disclosed herein can be used to identify the corresponding full length gene from which they were derived. The partial sequences can be nick-translated or end-labeled with ³²P using polynucleotide kinase using labeling methods known to those with skill in the art (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis *et al.*, eds., Elsevier Press, N.Y., 1986). A lambda library prepared from human tissue can be directly screened with the labeled sequences of interest or the library can be converted *en masse* to pBluescript (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif. 92037) to facilitate bacterial colony screening (see Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989, pg. 1.20).

Both methods are well known in the art. Briefly, filters with bacterial colonies containing the library in pBluescript or bacterial lawns containing lambda plaques are denatured, and the DNA is fixed to the filters. The filters are hybridized with the labeled probe using hybridization conditions described by Davis *et al.*, 1986. The partial sequences, cloned into lambda or pBluescript, can be used as positive controls

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 15 -

to assess background binding and to adjust the hybridization and washing stringencies necessary for accurate clone identification. The resulting autoradiograms are compared to duplicate plates of colonies or plaques; each exposed spot corresponds to a positive colony or plaque. The colonies or plaques are selected, expanded and the DNA is isolated from the colonies for further analysis and sequencing.

Positive cDNA clones are analyzed to determine the amount of additional sequence they contain using PCR with one primer from the partial sequence and the other primer from the vector. Clones with a larger vector-insert PCR product than the original partial sequence are analyzed by restriction digestion and DNA sequencing to determine whether they contain an insert of the same size or similar as the mRNA size determined from Northern blot analysis.

Once one or more overlapping cDNA clones are identified, the complete sequence of the clones can be determined. The cDNA sequence is determined from sequence analysis of multiple, overlapping clones (usually three to five overlapping sequences at each nucleotide position), resulting in a highly accurate final sequence.

Various PCR-based methods can be used to extend the nucleic acid sequences disclosed herein to detect upstream sequences such as promoters and regulatory elements. For example, restriction-site PCR uses universal primers to retrieve unknown sequence adjacent to a known locus (Sarkar, *PCR Methods Applic.* 2, 318-322, 1993). Genomic DNA is first amplified in the presence of a primer to a linker sequence and a primer specific to the known region. The amplified sequences are then subjected to a second round of PCR with the same linker primer and another specific primer internal to the first one. Products of each round of PCR are transcribed with an appropriate RNA polymerase and sequenced using reverse transcriptase.

Inverse PCR also can be used to amplify or extend sequences using divergent primers based on a known region (Triglia *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16, 8186, 1988). Primers

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 16 -

can be designed using commercially available software, such as OLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), to be 22-30 nucleotides in length, to have a GC content of 50% or more, and to anneal to the target sequence at temperatures about 68-72°C. The method uses several restriction enzymes to generate a suitable fragment in the known region of a gene. The fragment is then circularized by intramolecular ligation and used as a PCR template.

Another method which can be used is capture PCR, which involves PCR amplification of DNA fragments adjacent to a known sequence in human and yeast artificial chromosome DNA (Lagerstrom *et al.*, *PCR Methods Applic. I*, 111-119, 1991). In this method, multiple restriction enzyme digestions and ligations also can be used to place an engineered double-stranded sequence into an unknown fragment of the DNA molecule before performing PCR.

Another method which can be used to retrieve unknown sequences is that of Parker *et al.*, *Nucleic Acids Res. 19*, 3055-3060, 1991). Additionally, PCR, nested primers, and PROMOTERFINDER libraries (CLONTECH, Palo Alto, Calif.) can be used to walk genomic DNA (CLONTECH, Palo Alto, Calif.). This process avoids the need to screen libraries and is useful in finding intron/exon junctions.

When screening for full-length cDNAs, it is preferable to use libraries that have been size-selected to include larger cDNAs. Randomly-primed libraries are preferable, in that they will contain more sequences which contain the 5' regions of genes. Use of a randomly primed library may be especially preferable for situations in which an oligo d(T) library does not yield a full-length cDNA. Genomic libraries can be useful for extension of sequence into 5' non-transcribed regulatory regions.

Commercially available capillary electrophoresis systems can be used to analyze the size or confirm the nucleotide sequence of PCR or sequencing products. For example, capillary sequencing can employ flowable polymers for electrophoretic separation,

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 17 -

four different fluorescent dyes (one for each nucleotide) which are laser activated, and detection of the emitted wavelengths by a charge coupled device camera. Output/light intensity can be converted to electrical signal using appropriate software (e.g., GENOTYPER and Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), and the entire process
5 from loading of samples to computer analysis and electronic data display can be computer controlled. Capillary electrophoresis is especially preferable for the sequencing of small pieces of DNA which might be present in limited amounts in a particular sample.

10 Obtaining Polypeptides

11 β -HSD1-like polypeptides can be obtained, for example, by purification from human cells, by expression of 11 β -HSD1-like polynucleotides, or by direct chemical
15 synthesis.

Protein Purification

11 β -HSD1-like polypeptides can be purified from any cell which expresses the enzyme, including host cells which have been transfected with 11 β -HSD1-like enzyme
20 expression constructs. Based on the site of expression of the human sequences with GenBank Accession Nos. AW163634, AW162782, A1554725, and A1436330, it is expected that the 11 β -HSD1-like polypeptides are expressed in the fetal brain, the frontal lobe of the adult brain, and in anaplastic oligodendroglioma. A purified 11 β -
25 HSD1-like polypeptide is separated from other compounds which normally associate with the 11 β -HSD1-like polypeptide in the cell, such as certain proteins, carbohydrates, or lipids, using methods well-known in the art. Such methods include, but are not limited to, size exclusion chromatography, ammonium sulfate fractionation, ion
30 exchange chromatography, affinity chromatography, and preparative gel electrophoresis. A preparation of purified 11 β -HSD1-like polypeptides is at least 80% pure; preferably, the preparations are 90%, 95%, or 99% pure. Purity of the preparations can be

assessed by any means known in the art, such as SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Expression of Polynucleotides

5

To express an 11 β -HSD1-like polynucleotide, the polynucleotide can be inserted into an expression vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing sequences encoding 11 β -HSD1-like polypeptides and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. Such techniques are described, for example, in Sambrook *et al.* (1989) and in Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

15

A variety of expression vector/host systems can be utilized to contain and express sequences encoding an 11 β -HSD1-like polypeptide. These include, but are not limited to, microorganisms, such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors, insect cell systems infected with virus expression vectors (e.g., baculovirus), plant cell systems transformed with virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (e.g., Ti or pBR322 plasmids), or animal cell systems.

25

The control elements or regulatory sequences are those non-translated regions of the vector -- enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions -- which interact with host cellular proteins to carry out transcription and translation. Such elements can vary in their strength and specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, can be used. For example, when cloning in bacterial

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 19 -

systems, inducible promoters such as the hybrid lacZ promoter of the BLUESCRIPT phagemid (Stratagene, LaJolla, Calif.) or pSPORT1 plasmid (Life Technologies) and the like can be used. The baculovirus polyhedrin promoter can be used in insect cells. Promoters or enhancers derived from the genomes of plant cells (e.g., heat shock, RUBISCO, and storage protein genes) or from plant viruses (e.g., viral promoters or leader sequences) can be cloned into the vector. In mammalian cell systems, promoters from mammalian genes or from mammalian viruses are preferable. If it is necessary to generate a cell line that contains multiple copies of a nucleotide sequence encoding a 11 β -HSD1-like polypeptide, vectors based on SV40 or EBV can be used with an appropriate selectable marker.

Bacterial and Yeast Expression Systems

In bacterial systems, a number of expression vectors can be selected depending upon the use intended for the 11 β -HSD1-like polypeptide. For example, when a large quantity of an 11 β -HSD1-like polypeptide is needed for the induction of antibodies, vectors which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified can be used. Such vectors include, but are not limited to, multifunctional *E. coli* cloning and expression vectors such as BLUESCRIPT (Stratagene). In a BLUESCRIPT vector, a sequence encoding the 11 β -HSD1-like polypeptide can be ligated into the vector in frame with sequences for the amino-terminal Met and the subsequent 7 residues of β -galactosidase so that a hybrid protein is produced. pIN vectors (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509, 1989) or pGEX vectors (Promega, Madison, Wis.) also can be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. Proteins made in such systems can be designed to include heparin, thrombin, or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety at will.

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 20 -

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH can be used. For reviews, see Ausubel *et al.* (1989) and Grant *et al.*, *Methods Enzymol.* 153, 516-544, 5 1987.

Plant and Insect Expression Systems

If plant expression vectors are used, the expression of sequences encoding 11 β -HSD1-like polypeptides can be driven by any of a number of promoters. For example, viral promoters such as the 35S and 19S promoters of CaMV can be used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6, 307-311, 1987). Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters can be used (Coruzzi *et al.*, *EMBO J.* 3, 15 1671-1680, 1984; Broglie *et al.*, *Science* 224, 838-843, 1984; Winter *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 17, 85-105, 1991). These constructs can be introduced into plant cells by direct DNA transformation or by pathogen-mediated transfection. Such techniques are described in a number of generally available reviews (e.g., Hobbs or Murray, in MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, McGraw Hill, 20 New York, N.Y., pp. 191-196, 1992).

An insect system also can be used to express an 11 β -HSD1-like polypeptide. For example, in one such system *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes in *Spodoptera frugiperda* cells or in *Trichoplusia* larvae. Sequences encoding 11 β -HSD1-like polypeptides can be cloned into a non-essential region of the virus, such as the polyhedrin gene, and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of 11 β -HSD1-like enzyme coding sequences will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus lacking coat protein. The recombinant viruses can then be used to

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 21 -

infect *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which 11 β -HSD1-like polypeptides can be expressed (Engelhard *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224-3227, 1994).

Mammalian Expression Systems

5

A number of viral-based expression systems can be used to express 11 β -HSD1-like polypeptides in mammalian host cells. For example, if an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding 11 β -HSD1-like polypeptides can be ligated into an adenovirus transcription/translation complex comprising the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome can be used to obtain a viable virus which is capable of expressing an 11 β -HSD1-like polypeptide in infected host cells (Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655-3659, 1984). If desired, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, can be used to increase expression in mammalian host cells.

15

Human artificial chromosomes (HACs) also can be used to deliver larger fragments of DNA than can be contained and expressed in a plasmid. HACs of 6M to 10M are constructed and delivered to cells via conventional delivery methods (*e.g.*, liposomes, polycationic amino polymers, or vesicles).

20

Specific initiation signals also can be used to achieve more efficient translation of sequences encoding 11 β -HSD1-like polypeptides. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding an 11 β -HSD1-like polypeptide, its initiation codon, and upstream sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding sequence, or a fragment thereof, is inserted, exogenous translational control signals (including the ATG initiation codon) should be provided. The initiation codon should be in the correct reading frame to ensure translation of the entire insert. Exogenous translational elements and initiation codons can be of various origins, both natural and synthetic. The effi-

30

ciency of expression can be enhanced by the inclusion of enhancers which are appropriate for the particular cell system which is used (see Scharf *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 20, 125-162, 1994).

5 Host Cells

A host cell strain can be chosen for its ability to modulate the expression of the inserted sequences or to process the expressed 11 β -HSD1-like polypeptide in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" form of the polypeptide also can be used to facilitate correct insertion, folding and/or function. Different host cells which have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for post-translational activities (*e.g.*, CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and WI38), are available from the American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) and can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

Stable expression is preferred for long-term, high-yield production of recombinant proteins. For example, cell lines which stably express 11 β -HSD1-like polypeptides can be transformed using expression vectors which can contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. Following the introduction of the vector, cells can be allowed to grow for 1-2 days in an enriched medium before they are switched to a selective medium. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced 11 β -HSD1-like enzyme sequences. Resistant clones of stably transformed cells can be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type. See, for example, ANIMAL CELL CULTURE, R.I. Freshney, ed., 1986.

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 23 -

Any number of selection systems can be used to recover transformed cell lines. These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler *et al.*, *Cell* 11, 223-32, 1977) and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy *et al.*, *Cell* 22, 817-23, 1980) genes which can be employed in *tk* or *aprr* cells, respectively.

5 Also, antimetabolite, antibiotic, or herbicide resistance can be used as the basis for selection. For example, *dhfr* confers resistance to methotrexate (Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567-70, 1980), *npt* confers resistance to the aminoglycosides, neomycin and G-418 (Colbere-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150, 1-14, 1981), and *als* and *pat* confer resistance to chlorsulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively (Murray, 1992, *supra*). Additional selectable genes have been described.

10 For example, *trpB* allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or *hisD*, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8047-51, 1988). Visible markers such as anthocyanins, β -glucuronidase and its substrate GUS, and luciferase and its substrate luciferin, can be used to

15 identify transformants and to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system (Rhodes *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 55, 121-131, 1995).

Detecting Expression

20 Although the presence of marker gene expression suggests that the 11 β -HSD1-like polynucleotide is also present, its presence and expression may need to be confirmed. For example, if a sequence encoding an 11 β -HSD1-like polypeptide is inserted within a marker gene sequence, transformed cells containing sequences which encode an 11 β -

25 HSD1-like polypeptide can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding an 11 β -HSD1-like polypeptide under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the 11 β -HSD1-like polynucleotide.

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 24 -

Alternatively, host cells which contain an 11 β -HSD1-like polynucleotide and which express an 11 β -HSD1-like polypeptide can be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane, solution, or chip-based technologies for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein. For example, the presence of a polynucleotide sequence encoding an 11 β -HSD1-like polypeptide can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridization or amplification using probes or fragments or fragments of polynucleotides encoding an 11 β -HSD1-like polypeptide. Nucleic acid amplification-based assays involve the use of oligonucleotides selected from sequences encoding an 11 β -HSD1-like polypeptide to detect transformants which contain an 11 β -HSD1-like polynucleotide.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of an 11 β -HSD1-like polypeptide, using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the polypeptide, are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay using monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on an 11 β -HSD1-like polypeptide can be used, or a competitive binding assay can be employed. These and other assays are described in Hampton *et al.*, SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul, Minn., 1990) and Maddox *et al.*, *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216, 1983).

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding 11 β -HSD1-like polypeptides include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, sequences encoding an 11 β -HSD1-like polypeptide can be cloned into a vector for the

production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and can be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of labeled nucleotides and an appropriate RNA polymerase such as T7, T3, or SP6. These procedures can be conducted using a variety of commercially available kits (Amersham Pharmacia Biotech, Promega, and US Biochemical). Suitable reporter molecules or labels which can be used for ease of detection include radionuclides, enzymes, and fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

10 Expression and Purification of Polypeptides

Host cells transformed with nucleotide sequences encoding an 11 β -HSD1-like polypeptide can be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The polypeptide produced by a transformed cell can be secreted or contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides which encode 11 β -HSD1-like polypeptides can be designed to contain signal sequences which direct secretion of soluble 11 β -HSD1-like polypeptides through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane or which direct the membrane insertion of membrane-bound 11 β -HSD1-like polypeptide.

As discussed above, other constructions can be used to join a sequence encoding an 11 β -HSD1-like polypeptide to a nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals, protein A domains that allow purification on immobilized immunoglobulin, and the domain utilized in the FLAG extension/affinity purification system (Immunex Corp., Seattle, Wash.). Inclusion of cleavable linker sequences such as those specific for Factor Xa or enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA) between the purification domain and the

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 26 -

11 β -HSD1-like polypeptide also can be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein containing an 11 β -HSD1-like polypeptide and 6 histidine residues preceding a thioredoxin or an enterokinase cleavage site. The histidine residues facilitate purification by IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography, as described in Porath *et al.*, *Prot. Exp. Purif.* 3, 263-281, 1992), while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying the 11 β -HSD1-like polypeptide from the fusion protein. Vectors which contain fusion proteins are disclosed in Kroll *et al.*, *DNA Cell Biol.* 12, 441-453, 1993.

10 Chemical Synthesis

Sequences encoding an 11 β -HSD1-like polypeptide can be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, 1980; Horn *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232, 1980). Alternatively, an 11 β -HSD1-like polypeptide itself can be produced using chemical methods to synthesize its amino acid sequence, such as by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, 1963; Roberge *et al.*, *Science* 269, 202-204, 1995). Protein synthesis can be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis can be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Optionally, fragments of 11 β -HSD1-like polypeptides can be separately synthesized and combined using chemical methods to produce a full-length molecule.

The newly synthesized peptide can be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography (*e.g.*, Creighton, *PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). The composition of a synthetic 11 β -HSD1-like polypeptide can be confirmed by amino acid analysis or sequencing (*e.g.*, the Edman degradation procedure; see Creighton, *supra*). Additionally, any portion of the amino acid sequence of the 11 β -HSD1-like polypeptide can be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 27 -

with sequences from other proteins to produce a variant polypeptide or a fusion protein.

Production of Altered Polypeptides

5

As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous to produce 11 β -HSD1-like polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of protein expression or to produce an RNA transcript having desirable properties, such as a half-life which is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

10

The nucleotide sequences disclosed herein can be engineered using methods generally known in the art to alter 11 β -HSD1-like polypeptide-encoding sequences for a variety of reasons, including but not limited to, alterations which modify the cloning, processing, and/or expression of the polypeptide or mRNA product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides can be used to engineer the nucleotide sequences. For example, site-directed mutagenesis can be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, introduce mutations, and so forth.

15

20

Antibodies

25

Any type of antibody known in the art can be generated to bind specifically to an epitope of an 11 β -HSD1-like polypeptide. "Antibody" as used herein includes intact immunoglobulin molecules, as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, and Fv, which are capable of binding an epitope of an 11 β -HSD1-like polypeptide. Typically, at least 6, 8, 10, or 12 contiguous amino acids are required to form an epitope. How-

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 28 -

ever, epitopes which involve non-contiguous amino acids may require more, e.g., at least 15, 25, or 50 amino acids.

5 An antibody which specifically binds to an epitope of an 11 β -HSD1-like polypeptide can be used therapeutically, as well as in immunochemical assays, such as Western blots, ELISAs, radioimmunoassays, immunohistochemical assays, immunoprecipitations, or other immunochemical assays known in the art. Various immunoassays can be used to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays are well known in the art. Such
10 immunoassays typically involve the measurement of complex formation between an immunogen and an antibody which specifically binds to the immunogen.

Typically, an antibody which specifically binds to an 11 β -HSD1-like polypeptide provides a detection signal at least 5-, 10-, or 20-fold higher than a detection signal
15 provided with other proteins when used in an immunochemical assay. Preferably, antibodies which specifically bind to 11 β -HSD1-like polypeptides do not detect other proteins in immunochemical assays and can immunoprecipitate a 11 β -HSD1-like polypeptide from solution.

20 11 β -HSD1-like polypeptides can be used to immunize a mammal, such as a mouse, rat, rabbit, guinea pig, monkey, or human, to produce polyclonal antibodies. If desired, an 11 β -HSD1-like polypeptide can be conjugated to a carrier protein, such as bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin. Depending on the host species, various adjuvants can be used to increase the immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's adjuvant, mineral
25 gels (e.g., aluminum hydroxide), and surface active substances (e.g. lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol). Among adjuvants used in humans, BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are especially useful.

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 29 -

Monoclonal antibodies which specifically bind to an 11 β -HSD1-like polypeptide can be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These techniques include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (Kohler *et al.*, *Nature* 256, 495-497, 1985; Kozbor *et al.*, *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Cole *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984).

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity, can be used (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neuberger *et al.*, *Nature* 312, 604-608, 1984; Takeda *et al.*, *Nature* 314, 452-454, 1985). Monoclonal and other antibodies also can be "humanized" to prevent a patient from mounting an immune response against the antibody when it is used therapeutically. Such antibodies may be sufficiently similar in sequence to human antibodies to be used directly in therapy or may require alteration of a few key residues. Sequence differences between rodent antibodies and human sequences can be minimized by replacing residues which differ from those in the human sequences by site directed mutagenesis of individual residues or by grating of entire complementarity determining regions. Alternatively, humanized antibodies can be produced using recombinant methods, as described in GB2188638B. Antibodies which specifically bind to a 11 β -HSD1-like polypeptide can contain antigen binding sites which are either partially or fully humanized, as disclosed in U.S. 5,565,332.

Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies can be adapted using methods known in the art to produce single chain antibodies which specifically bind to 11 β -HSD1-like polypeptides. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, can be generated by chain shuffling from ran-

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 30 -

dom combinatorial immunoglobulin libraries (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991).

5 Single-chain antibodies also can be constructed using a DNA amplification method, such as PCR, using hybridoma cDNA as a template (Thirion *et al.*, 1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11). Single-chain antibodies can be mono- or bispecific, and can be bivalent or tetravalent. Construction of tetravalent, bispecific single-chain antibodies is taught, for example, in Coloma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63. Construction of bivalent, bispecific single-chain antibodies is taught in Mallender & 10 Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206.

A nucleotide sequence encoding a single-chain antibody can be constructed using manual or automated nucleotide synthesis, cloned into an expression construct using standard recombinant DNA methods, and introduced into a cell to express the coding 15 sequence, as described below. Alternatively, single-chain antibodies can be produced directly using, for example, filamentous phage technology (Verhaar *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nicholls *et al.*, 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91).

20 Antibodies which specifically bind to 11B-HSD1-like polypeptides also can be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature (Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3833-3837, 1989; Winter *et al.*, *Nature* 349, 293-299, 1991).

25 Other types of antibodies can be constructed and used therapeutically in methods of the invention. For example, chimeric antibodies can be constructed as disclosed in WO 93/03151. Binding proteins which are derived from immunoglobulins and which are multivalent and multispecific, such as the "diabodies" described in WO 94/13804, also can be prepared.

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 31 -

Antibodies according to the invention can be purified by methods well known in the art. For example, antibodies can be affinity purified by passage over a column to which an 11 β -HSD1-like polypeptide is bound. The bound antibodies can then be eluted from the column using a buffer with a high salt concentration.

5

Antisense Oligonucleotides

Antisense oligonucleotides are nucleotide sequences which are complementary to a specific DNA or RNA sequence. Once introduced into a cell, the complementary nucleotides combine with natural sequences produced by the cell to form complexes and block either transcription or translation. Preferably, an antisense oligonucleotide is at least 11 nucleotides in length, but can be at least 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, or 50 or more nucleotides long. Longer sequences also can be used. Antisense oligonucleotide molecules can be provided in a DNA construct and introduced into a cell as described above to decrease the level of 11 β -HSD1-like enzyme gene products in the cell.

Antisense oligonucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, or a combination of both. Oligonucleotides can be synthesized manually or by an automated synthesizer, by covalently linking the 5' end of one nucleotide with the 3' end of another nucleotide with non-phosphodiester internucleotide linkages such as alkylphosphonates, phosphorothioates, phosphorodithioates, alkylphosphonothioates, alkylphosphonates, phosphoramidates, phosphate esters, carbamates, acetamidate, carbonylmethyl esters, carbonates, and phosphate triesters. See Brown, *Meth. Mol. Biol.* 20, 1-8, 1994; Sonveaux, *Meth. Mol. Biol.* 26, 1-72, 1994; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-583, 1990.

Modifications of 11 β -HSD1-like enzyme gene expression can be obtained by designing antisense oligonucleotides which will form duplexes to the control, 5', or regulatory regions of the 11 β -HSD1-like enzyme gene. Oligonucleotides derived from the

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 32 -

transcription initiation site, *e.g.*, between positions -10 and +10 from the start site, are preferred. Similarly, inhibition can be achieved using "triple helix" base-pairing methodology. Triple helix pairing is useful because it causes inhibition of the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or chaperons. Therapeutic advances using triplex DNA have been described in the literature (*e.g.*, Gee *et al.*, in Huber & Carr, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994). An antisense oligonucleotide also can be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes.

10

Precise complementarity is not required for successful complex formation between an antisense oligonucleotide and the complementary sequence of an 11 β -HSD1-like polynucleotide. Antisense oligonucleotides which comprise, for example, 2, 3, 4, or 5 or more stretches of contiguous nucleotides which are precisely complementary to an 11 β -HSD1-like polynucleotide, each separated by a stretch of contiguous nucleotides which are not complementary to adjacent 11 β -HSD1-like enzyme nucleotides, can provide sufficient targeting specificity for 11 β -HSD1-like enzyme mRNA. Preferably, each stretch of complementary contiguous nucleotides is at least 4, 5, 6, 7, or 8 or more nucleotides in length. Non-complementary intervening sequences are preferably 1, 2, 3, or 4 nucleotides in length. One skilled in the art can easily use the calculated melting point of an antisense-sense pair to determine the degree of mismatching which will be tolerated between a particular antisense oligonucleotide and a particular 11 β -HSD1-like polynucleotide sequence.

15

Antisense oligonucleotides can be modified without affecting their ability to hybridize to an 11 β -HSD1-like polynucleotide. These modifications can be internal or at one or both ends of the antisense molecule. For example, internucleoside phosphate linkages can be modified by adding cholesteryl or diamine moieties with varying numbers of carbon residues between the amino groups and terminal ribose. Modified bases and/or sugars, such as arabinose instead of ribose, or a 3', 5'-substituted oligonucleotide in

20

25

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 33 -

which the 3' hydroxyl group or the 5' phosphate group are substituted, also can be employed in a modified antisense oligonucleotide. These modified oligonucleotides can be prepared by methods well known in the art. See, e.g., Agrawal *et al.*, *Trends Biotechnol.* 10, 152-158, 1992; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-584, 1990; Uhlmann *et al.*, *Tetrahedron. Lett.* 215, 3539-3542, 1987.

Ribozymes

Ribozymes are RNA molecules with catalytic activity. See, e.g., Cech, *Science* 236, 1532-1539; 1987; Cech, *Ann. Rev. Biochem.* 59, 543-568; 1990; Cech, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 605-609; 1992; Couture & Stinchcomb, *Trends Genet.* 12, 510-515, 1996. Ribozymes can be used to inhibit gene function by cleaving an RNA sequence, as is known in the art (e.g., Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673). The mechanism of ribozyme action involves sequence-specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Examples include engineered hammerhead motif ribozyme molecules that can specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of specific nucleotide sequences.

The coding sequence of an 11 β -HSD1-like polynucleotide can be used to generate ribozymes which will specifically bind to mRNA transcribed from the 11 β -HSD1-like polynucleotide. Methods of designing and constructing ribozymes which can cleave other RNA molecules in trans in a highly sequence specific manner have been developed and described in the art (see Haseloff *et al.* *Nature* 334, 585-591, 1988). For example, the cleavage activity of ribozymes can be targeted to specific RNAs by engineering a discrete "hybridization" region into the ribozyme. The hybridization region contains a sequence complementary to the target RNA and thus specifically hybridizes with the target (see, for example, Gerlach *et al.*, EP 321,201).

Specific ribozyme cleavage sites within an 11 β -HSD1-like enzyme RNA target can be identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 34 -

the following sequences: GUA, GUU, and GUC. Once identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target RNA containing the cleavage site can be evaluated for secondary structural features which may render the target inoperable. Suitability of candidate 11B-HSD1-like enzyme RNA targets also can be evaluated by testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays. Longer complementary sequences can be used to increase the affinity of the hybridization sequence for the target. The hybridizing and cleavage regions of the ribozyme can be integrally related such that upon hybridizing to the target RNA through the complementary regions, the catalytic region of the ribozyme can cleave the target.

Ribozymes can be introduced into cells as part of a DNA construct. Mechanical methods, such as microinjection, liposome-mediated transfection, electroporation, or calcium phosphate precipitation, can be used to introduce a ribozyme-containing DNA construct into cells in which it is desired to decrease 11B-HSD1-like enzyme expression. Alternatively, if it is desired that the cells stably retain the DNA construct, the construct can be supplied on a plasmid and maintained as a separate element or integrated into the genome of the cells, as is known in the art. A ribozyme-encoding DNA construct can include transcriptional regulatory elements, such as a promoter element, an enhancer or UAS element, and a transcriptional terminator signal, for controlling transcription of ribozymes in the cells.

As taught in Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673, ribozymes can be engineered so that ribozyme expression will occur in response to factors which induce expression of a target gene. Ribozymes also can be engineered to provide an additional level of regulation, so that destruction of mRNA occurs only when both a ribozyme and a target gene are induced in the cells.

Differentially Expressed Genes

Described herein are methods for the identification of genes whose products interact with human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1-like enzyme. Such genes may represent genes which are differentially expressed in disorders including, but not limited to, CNS disorders, osteoporosis, liver disease, obesity, blood pressure or fetal development abnormalities, and diabetes. Further, such genes may represent genes which are differentially regulated in response to manipulations relevant to the progression or treatment of such diseases. Additionally, such genes may have a temporally modulated expression, increased or decreased at different stages of tissue or organism development. A differentially expressed gene may also have its expression modulated under control versus experimental conditions. In addition, the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1-like gene or gene product may itself be tested for differential expression.

The degree to which expression differs in a normal versus a diseased state need only be large enough to be visualized via standard characterization techniques such as differential display techniques. Other such standard characterization techniques by which expression differences may be visualized include but are not limited to, quantitative RT (reverse transcriptase), PCR, and Northern analysis.

Identification of Differentially Expressed Genes

To identify differentially expressed genes total RNA or, preferably, mRNA is isolated from tissues of interest. For example, RNA samples are obtained from tissues of experimental subjects and from corresponding tissues of control subjects. Any RNA isolation technique which does not select against the isolation of mRNA may be utilized for the purification of such RNA samples. See, for example, Ausubel *et al.*, ed., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1987-1993. Large numbers of tissue samples may readily be processed using tech-

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 36 -

niques well known to those of skill in the art, such as, for example, the single-step RNA isolation process of Chomczynski, U.S. Patent 4,843,155.

5 Transcripts within the collected RNA samples which represent RNA produced by differentially expressed genes are identified by methods well known to those of skill in the art. They include, for example, differential screening (Tedder *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 208-12, 1988), subtractive hybridization (Hedrick *et al.*, *Nature* 308, 149-53; Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2825, 1984), and, preferably, differential display (Liang & Pardee, *Science* 257, 967-71, 1992; U.S. Patent 10 5,262,311).

The differential expression information may itself suggest relevant methods for the treatment of disorders involving the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1-like enzyme. For example, treatment may include a modulation of expression of the 15 differentially expressed genes and/or the gene encoding the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1-like enzyme. The differential expression information may indicate whether the expression or activity of the differentially expressed gene or gene product or the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1-like gene or gene product are up-regulated or down-regulated.

20

Screening Methods

The invention provides assays for screening test compounds which bind to or modulate the activity of an 11 β -HSD1-like polypeptide or an 11 β -HSD1-like polynucleotide. A test compound preferably binds to an 11 β -HSD1-like polypeptide or polynucleotide. More preferably, a test compound decreases or increases 11 β -HSD1 activity by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% 25 relative to the absence of the test compound.

Test Compounds

Test compounds can be pharmacologic agents already known in the art or can be compounds previously unknown to have any pharmacological activity. The compounds can be naturally occurring or designed in the laboratory. They can be isolated from microorganisms, animals, or plants, and can be produced recombinantly, or synthesized by chemical methods known in the art. If desired, test compounds can be obtained using any of the numerous combinatorial library methods known in the art, including but not limited to, biological libraries, spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries, synthetic library methods requiring deconvolution, the "one-bead one-compound" library method, and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to polypeptide libraries, while the other four approaches are applicable to polypeptide, non-peptide oligomer, or small molecule libraries of compounds. See Lam, *Anti-cancer Drug Des.* 12, 145, 1997.

Methods for the synthesis of molecular libraries are well known in the art (see, for example, DeWitt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho *et al.*, *Science* 261, 1303, 1993; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994). Libraries of compounds can be presented in solution (see, e.g., Houghten, *BioTechniques* 13, 412-421, 1992), or on beads (Lam, *Nature* 354, 82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature* 364, 555-556, 1993), bacteria or spores (Ladner, U.S. Patent 5,223,409), plasmids (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1865-1869, 1992), or phage (Scott & Smith, *Science* 249, 386-390, 1990; Devlin, *Science* 249, 404-406, 1990); Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6378-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* 222, 301-310, 1991; and Ladner, U.S. Patent 5,223,409).

High Throughput Screening

Test compounds can be screened for the ability to bind to 11 β -HSD1-like polypeptides or polynucleotides or to affect 11 β -HSD1-like enzyme activity or 11 β -HSD1-like enzyme gene expression using high throughput screening. Using high throughput screening, many discrete compounds can be tested in parallel so that large numbers of test compounds can be quickly screened. The most widely established techniques utilize 96-well microtiter plates. The wells of the microtiter plates typically require assay volumes that range from 50 to 500 μ l. In addition to the plates, many instruments, materials, pipettors, robotics, plate washers, and plate readers are commercially available to fit the 96-well format.

Alternatively, "free format assays," or assays that have no physical barrier between samples, can be used. For example, an assay using pigment cells (melanocytes) in a simple homogeneous assay for combinatorial peptide libraries is described by Jayawickreme *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19, 1614-18 (1994). The cells are placed under agarose in petri dishes, then beads that carry combinatorial compounds are placed on the surface of the agarose. The combinatorial compounds are partially released the compounds from the beads. Active compounds can be visualized as dark pigment areas because, as the compounds diffuse locally into the gel matrix, the active compounds cause the cells to change colors.

Another example of a free format assay is described by Chelsky. "Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches," reported at the First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 7-10, 1995). Chelsky placed a simple homogenous enzyme assay for carbonic anhydrase inside an agarose gel such that the enzyme in the gel would cause a color change throughout the gel. Thereafter, beads carrying combinatorial compounds via a photolinker were placed inside the gel and the compounds were partially

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 39 -

released by UV-light. Compounds that inhibited the enzyme were observed as local zones of inhibition having less color change.

5 Yet another example is described by Salmon *et al.*, *Molecular Diversity* 2, 57-63 (1996). In this example, combinatorial libraries were screened for compounds that had cytotoxic effects on cancer cells growing in agar.

10 Another high throughput screening method is described in Beutel *et al.*, U.S. Patent 5,976,813. In this method, test samples are placed in a porous matrix. One or more assay components are then placed within, on top of, or at the bottom of a matrix such as a gel, a plastic sheet, a filter, or other form of easily manipulated solid support. When samples are introduced to the porous matrix they diffuse sufficiently slowly, such that the assays can be performed without the test samples running together.

15 Binding Assays

For binding assays, the test compound is preferably a small molecule which binds to and occupies, for example, the ATP/GTP binding site of the enzyme of the active site of the 11 β -HSD1-like polypeptide, such that normal biological activity is prevented.
20 Examples of such small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like molecules.

In binding assays, either the test compound or the 11 β -HSD1-like polypeptide can comprise a detectable label, such as a fluorescent, radioisotopic, chemiluminescent, or enzymatic label, such as horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase.
25 Detection of a test compound which is bound to the 11 β -HSD1-like polypeptide can then be accomplished, for example, by direct counting of radioemission, by scintillation counting, or by determining conversion of an appropriate substrate to a detectable product.

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 40 -

Alternatively, binding of a test compound to an 11 β -HSD1-like polypeptide can be determined without labeling either of the interactants. For example, a microphysiometer can be used to detect binding of a test compound with a 11 β -HSD1-like polypeptide. A microphysiometer (e.g., Cytosensor™) is an analytical instrument that
5 measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a test compound and an 11 β -HSD1-like polypeptide (McConnell *et al.*, *Science* 257, 1906-1912, 1992).

10 Determining the ability of a test compound to bind to an 11 β -HSD1-like polypeptide also can be accomplished using a technology such as real-time Bimolecular Interaction Analysis (BIA) (Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63, 2338-2345, 1991, and Szabo *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699-705, 1995). BIA is a technology for studying biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants
15 (e.g., BIAcore™). Changes in the optical phenomenon surface plasmon resonance (SPR) can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

In yet another aspect of the invention, an 11 β -HSD1-like polypeptide can be used as a
20 "bait protein" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, e.g., U.S. Patent 5,283,317; Zervos *et al.*, *Cell* 72, 223-232, 1993; Madura *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268, 12046-12054, 1993; Bartel *et al.*, *BioTechniques* 14, 920-924, 1993; Iwabuchi *et al.*, *Oncogene* 8, 1693-1696, 1993; and Brent W094/10300), to identify other proteins which bind to or interact with the 11 β -HSD1-like polypeptide and modulate its activity.
25

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. For example, in one construct, polynucleotide
30 encoding an 11 β -HSD1-like polypeptide can be fused to a polynucleotide encoding

the DNA binding domain of a known transcription factor (e.g., GAL-4). In the other construct a DNA sequence that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") can be fused to a polynucleotide that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact *in vivo* to form an protein-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (e.g., LacZ), which is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected, and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the DNA sequence encoding the protein which interacts with the 11 β -HSD1-like polypeptide.

It may be desirable to immobilize either the 11 β -HSD1-like polypeptide (or polynucleotide) or the test compound to facilitate separation of bound from unbound forms of one or both of the interactants, as well as to accommodate automation of the assay. Thus, either the 11 β -HSD1-like polypeptide (or polynucleotide) or the test compound can be bound to a solid support. Suitable solid supports include, but are not limited to, glass or plastic slides, tissue culture plates, microtiter wells, tubes, silicon chips, or particles such as beads (including, but not limited to, latex, polystyrene, or glass beads). Any method known in the art can be used to attach the 11 β -HSD1-like polypeptide (or polynucleotide) or test compound to a solid support, including use of covalent and non-covalent linkages, passive absorption, or pairs of binding moieties attached respectively to the polypeptide (or polynucleotide) or test compound and the solid support. Test compounds are preferably bound to the solid support in an array, so that the location of individual test compounds can be tracked. Binding of a test compound to a 11 β -HSD1-like polypeptide (or polynucleotide) can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtiter plates, test tubes, and microcentrifuge tubes.

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 42 -

In one embodiment, the 11 β -HSD1-like polypeptide is a fusion protein comprising a domain that allows the 11 β -HSD1-like polypeptide to be bound to a solid support. For example, glutathione-S-transferase fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) or glutathione derivatized microtiter plates, which are then combined with the test compound or the test compound and the non-adsorbed 11 β -HSD1-like polypeptide; the mixture is then incubated under conditions conducive to complex formation (*e.g.*, at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components. Binding of the interactants can be determined either directly or indirectly, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the solid support before binding is determined.

Other techniques for immobilizing proteins or polynucleotides on a solid support also can be used in the screening assays of the invention. For example, either an 11 β -HSD1-like polypeptide (or polynucleotide) or a test compound can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated 11 β -HSD1-like polypeptides (or polynucleotides) or test compounds can be prepared from biotin-NHS(N-hydroxysuccinimide) using techniques well known in the art (*e.g.*, biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies which specifically bind to an 11 β -HSD1-like polypeptide, polynucleotide, or a test compound, but which do not interfere with a desired binding site, such as the ATP/GTP binding site or the active site of the 11 β -HSD1-like polypeptide, can be derivatized to the wells of the plate. Unbound target or protein can be trapped in the wells by antibody conjugation.

Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies which specifically bind to the 11 β -HSD1-like polypeptide or test compound. en-

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 43 -

zyme-linked assays which rely on detecting an activity of the 11 β -HSD1-like polypeptide, and SDS gel electrophoresis under non-reducing conditions.

5 Screening for test compounds which bind to a 11 β -HSD1-like polypeptide or polynucleotide also can be carried out in an intact cell. Any cell which comprises a 11 β -HSD1-like polypeptide or polynucleotide can be used in a cell-based assay system. A 11 β -HSD1-like polynucleotide can be naturally occurring in the cell or can be introduced using techniques such as those described above. Binding of the test compound to a 11 β -HSD1-like polypeptide or polynucleotide is determined as described above.

10

Enzyme Assays

15 Test compounds can be tested for the ability to increase or decrease the 11 β -HSD1 activity of a human 11 β -HSD1-like polypeptide. 11 β -HSD1 activity can be measured, for example, as described in Diaz *et al.*, *J. Neurosci.* 18:2570-2580 (1998); Rajan *et al.*, *J. Neurosci.* 16:65-70 (1996); and Lloyd-MacGilp *et al.*, *Hypertension*, 34:1123-1128 (1999).

20 Enzyme assays can be carried out after contacting either a purified 11 β -HSD1-like polypeptide, a cell membrane preparation, or an intact cell with a test compound. A test compound which decreases a transketolase activity of an 11 β -HSD1-like polypeptide by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% is identified as a potential therapeutic agent for decreasing 11 β -HSD1-like enzyme activity. A test compound which increases a transketolase activity of a 25 human 11 β -HSD1-like polypeptide by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% is identified as a potential therapeutic agent for increasing human 11 β -HSD1-like enzyme activity.

Gene Expression

30

- In another embodiment, test compounds which increase or decrease 11 β -HSD1-like enzyme gene expression are identified. An 11 β -HSD1-like polynucleotide is contacted with a test compound, and the expression of an RNA or polypeptide product of the 11 β -HSD1-like polynucleotide is determined. The level of expression of appropriate mRNA or polypeptide in the presence of the test compound is compared to the level of expression of mRNA or polypeptide in the absence of the test compound. The test compound can then be identified as a modulator of expression based on this comparison. For example, when expression of mRNA or polypeptide is greater in the presence of the test compound than in its absence, the test compound is identified as a stimulator or enhancer of the mRNA or polypeptide expression. Alternatively, when expression of the mRNA or polypeptide is less in the presence of the test compound than in its absence, the test compound is identified as an inhibitor of the mRNA or polypeptide expression.
- 15 The level of 11 β -HSD1-like enzyme mRNA or polypeptide expression in the cells can be determined by methods well known in the art for detecting mRNA or polypeptide. Either qualitative or quantitative methods can be used. The presence of polypeptide products of an 11 β -HSD1-like polynucleotide can be determined, for example, using a variety of techniques known in the art, including immunochemical methods such as radioimmunoassay, Western blotting, and immunohistochemistry. Alternatively, polypeptide synthesis can be determined *in vivo*, in a cell culture, or in an *in vitro* translation system by detecting incorporation of labeled amino acids into an 11 β -HSD1-like polypeptide.
- 25 Such screening can be carried out either in a cell-free assay system or in an intact cell. Any cell which expresses an 11 β -HSD1-like polynucleotide can be used in a cell-based assay system. The 11 β -HSD1-like polynucleotide can be naturally occurring in the cell or can be introduced using techniques such as those described above. Either a primary culture or an established cell line, such as CHO or human embryonic kidney 293 cells, can be used.
- 30

Pharmaceutical Compositions

5 The invention also provides pharmaceutical compositions which can be administered to a patient to achieve a therapeutic effect. Pharmaceutical compositions of the invention can comprise, for example, an 11 β -HSD1-like polypeptide, 11 β -HSD1-like polynucleotide, ribozymes or antisense oligonucleotides, antibodies which specifically bind to an 11 β -HSD1-like polypeptide, or mimetics, agonists, antagonists, or inhibitors of an 11 β -HSD1-like polypeptide activity. The compositions can be administered
10 alone or in combination with at least one other agent, such as stabilizing compound, which can be administered in any sterile, biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited to, saline, buffered saline, dextrose, and water. The compositions can be administered to a patient alone, or in combination with other agents, drugs or hormones.

15 In addition to the active ingredients, these pharmaceutical compositions can contain suitable pharmaceutically-acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Pharmaceutical compositions of the invention can be administered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal, intraventricular, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, parenteral, topical, sublingual, or rectal means. Pharmaceutical compositions for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art in dosages suitable for oral
20 administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for ingestion by the patient.

25 Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained through combination of active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and
30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 46 -

processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are carbohydrate or protein fillers, such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; starch from corn, wheat, rice, potato, or other plants; cellulose, such as methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, or sodium carboxymethylcellulose; gums including arabic and tragacanth; and proteins such as gelatin and collagen. If desired, disintegrating or solubilizing agents can be added, such as the cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, alginic acid, or a salt thereof, such as sodium alginate.

10 Dragee cores can be used in conjunction with suitable coatings, such as concentrated sugar solutions, which also can contain gum arabic, talc, polyvinylpyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dycestuffs or pigments can be added to the tablets or dragee coatings for product identification or to characterize the quantity
15 of active compound, *i.e.*, dosage.

Pharmaceutical preparations which can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a coating, such as glycerol or sorbitol. Push-fit capsules can contain active ingredients mixed with a
20 filler or binders, such as lactose or starches, lubricants, such as talc or magnesium stearate, and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds can be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

25 Pharmaceutical formulations suitable for parenteral administration can be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks' solution, Ringer's solution, or physiologically buffered saline. Aqueous injection suspensions can contain substances which increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Additionally, suspen-
30 sions of the active compounds can be prepared as appropriate oily injection suspen-

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 47 -

sions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Non-lipid polycationic amino polymers also can be used for delivery. Optionally, the suspension also can contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions. For topical or nasal administration, penetrants appropriate to the particular barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

The pharmaceutical compositions of the present invention can be manufactured in a manner that is known in the art, *e.g.*, by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes. The pharmaceutical composition can be provided as a salt and can be formed with many acids, including but not limited to, hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more soluble in aqueous or other protic solvents than are the corresponding free base forms. In other cases, the preferred preparation can be a lyophilized powder which can contain any or all of the following: 1-50 mM histidine, 0.1%-2% sucrose, and 2-7% mannitol, at a pH range of 4.5 to 5.5, that is combined with buffer prior to use.

Further details on techniques for formulation and administration can be found in the latest edition of REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa.). After pharmaceutical compositions have been prepared, they can be placed in an appropriate container and labeled for treatment of an indicated condition. Such labeling would include amount, frequency, and method of administration.

25

Therapeutic Indications and Methods

The activity of human 11 β -HSD1-like enzyme can be regulated to treat diseases such as CNS diseases, osteoporosis, liver disease, and obesity, as well as blood pressure abnormalities, abnormalities of fetal development, and diabetes.

30

CNS Disorders

5 CNS disorders which can be treated include brain injuries, cerebrovascular diseases
and their consequences, Parkinson's disease, corticobasal degeneration, motor neuron
disease, dementia, including ALS, multiple sclerosis, traumatic brain injury, stroke,
post-stroke, post-traumatic brain injury, and small-vessel cerebrovascular disease.
Dementias, such as Alzheimer's disease, vascular dementia, dementia with Lewy
bodies, frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17, fronto-
10 temporal dementias, including Pick's disease, progressive nuclear palsy, corticobasal
degeneration, Huntington's disease, thalamic degeneration, Creutzfeld-Jakob demen-
tia, HIV dementia, schizophrenia with dementia, and Korsakoff's psychosis also can
be treated. Similarly, it is possible to treat cognitive-related disorders, such as mild
cognitive impairment, age-associated memory impairment, age-related cognitive
15 decline, vascular cognitive impairment, attention deficit disorders, attention deficit
hyperactivity disorders, and memory disturbances in children with learning disabili-
ties, by regulating the activity of human matriptase-like protein.

Osteoporosis. Osteoporosis is a disease characterized by low bone mass and micro-
20 architectural deterioration of bone tissue, leading to enhanced bone fragility and a
consequent increase in fracture risk. It is the most common human metabolic bone
disorder. Established osteoporosis includes the presence of fractures.

Bone turnover occurs by the action of two major effector cell types within bone: the
25 osteoclast, which is responsible for bone resorption, and the osteoblast, which synthe-
sized and mineralizes bone matrix. The actions of osteoclasts and osteoblasts are
highly coordinated. Osteoclast precursors are recruited to the site of turnover; they
differentiate and fuse to form mature osteoclasts which then resorb bone. Attached to
the bone surface, osteoclasts produce an acidic microenvironment in a tightly defined
30 junction between the specialized osteoclast border membrane and the bone matrix,

thus allowing the localized solubilization of bone matrix. This in turn facilitates the proteolysis of demineralized bone collagen. Matrix degradation is thought to release matrix-associated growth factor and cytokines, which recruit osteoblasts in a temporally and spatially controlled fashion. Osteoblasts synthesize and secrete new bone matrix proteins, and subsequently mineralize this new matrix. In the normal skeleton this is a physiological process which does not result in a net change in bone mass. In pathological states, such as osteoporosis, the balance between resorption and formation is altered such that bone loss occurs. See WO 99/45923.

10 The osteoclast itself is the direct or indirect target of all currently available osteoporosis agents with the possible exception of fluoride. Antiresorptive therapy prevents further bone loss in treated individuals. Osteoblasts are derived from multipotent stem cells which reside in bone marrow and also gives rise to adipocytes, chondrocytes, fibroblasts, and muscle cells. Selective enhancement of osteoblast activity is a highly desirable goal for osteoporosis therapy, because it would result in an increase in bone mass rather than a prevention of further bone loss. An effective anabolic therapy would be expected to lead to a significantly greater reduction in fracture risk than currently available treatments.

20 The agonists or antagonists to the newly discovered polypeptides may act as antiresorptives by directly altering the osteoclast differentiation, osteoclast adhesion to the bone matrix, or osteoclast function of degrading the bone matrix. The agonists or antagonists could indirectly alter the osteoclast function by interfering in the synthesis and/or modification of effector molecules of osteoclast differentiation or function such as cytokines, peptide or steroid hormones, proteases, etc.

The agonists or antagonists to the newly discovered polypeptides may act as anabolics by directly enhancing the osteoblast differentiation and /or its bone matrix forming function. The agonists or antagonists could also indirectly alter the osteoblast function

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 50 -

by enhancing the synthesis of growth factors, peptide or steroid hormones, or decreasing the synthesis of inhibitory molecules.

5 The agonists and antagonists may be used to mimic, augment, or inhibit the action of the newly discovered polypeptides, which may be useful to treat osteoporosis, Paget's disease, degradation of bone implants, and, particularly, dental implants.

Liver disease. All chronic liver diseases cause the development of fibrosis in the liver. Fibrosis is a programmed uniform wound healing response. The most important
10 chronic liver diseases are viral hepatitis B and C and alcohol-induced liver disease. Between 10 and 30% of patients affected develop cirrhosis as a late complication. Liver cirrhosis has a 5-year survival rate of 50%. Deaths from liver cirrhosis occurs at an average age of only 60 years. It is the ninth largest cause of death in the USA.

15 Toxic damage or injury caused by foreign proteins causes the deposition of extracellular matrix such as collagen, fibronectin and laminin. The common mechanism is the activation and transformation of vitamin-A storing hepatic stellate cells (Ito cells) into matrix producing myofibroblasts. These proliferate and fill the extracellular Space of Disse with extracellular matrix. This process contains para- and autoorine activation
20 steps, which cause it to become auto-perpetuated if the process of injury is sustained for a long period of time. It causes a slowly progressing shunt, which reduces the perfusion of the liver with portal and arterial blood. This results in a loss of liver function. Build-up of an increased diffusion barrier by a loss of fenestration in the sinusoidal endothelium. This corroborates the loss in function. Portal hypertension
25 with the frequent complication of esophagal bleeding. Causes of liver disease death include hepatic coma (30%), esophagal bleeding (30%), and primary hepatic carcinoma (30%).

30 Indications for which regulation of this protein may be useful are liver fibrosis and cirrhosis caused by chronic degenerative diseases of the liver such as viral hepatitis,

alcohol hepatitis, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, cystic fibrosis, hemochromatosis, Wilson's disease, non-alcoholic steato-hepatitis, and others. Possible other indications are the treatment of systemic sclerosis, pulmonary fibrosis, pancreatic fibrosis, myocardial fibrosis, and prostatic fibrosis.

5

Obesity. Obesity and overweight are defined as an excess of body fat relative to lean body mass. An increase in caloric intake or a decrease in energy expenditure or both can bring about this imbalance leading to surplus energy being stored as fat. Obesity is associated with important medical morbidities and an increase in mortality. The causes of obesity are poorly understood and may be due to genetic factors, environmental factors or a combination of the two to cause a positive energy balance. In contrast, anorexia and cachexia are characterized by an imbalance in energy intake versus energy expenditure leading to a negative energy balance and weight loss. Agents that either increase energy expenditure and/or decrease energy intake, absorption or storage would be useful for treating obesity, overweight, and associated comorbidities. Agents that either increase energy intake and/or decrease energy expenditure or increase the amount of lean tissue would be useful for treating cachexia, anorexia and wasting disorders.

10

15

20

This gene, translated proteins and agents which modulate this gene or portions of the gene or its products are useful for treating obesity, overweight, anorexia, cachexia, wasting disorders, appetite suppression, appetite enhancement, increases or decreases in satiety, modulation of body weight, and/or other eating disorders such as bulimia.

25

Also this gene, translated proteins and agents which modulate this gene or portions of the gene or its products are useful for treating obesity/overweight-associated comorbidities including hypertension, type 2 diabetes, coronary artery disease, hyperlipidemia, stroke, gallbladder disease, gout, osteoarthritis, sleep apnea and respiratory problems, some types of cancer including endometrial, breast, prostate, and colon cancer, thrombotic disease, polycystic ovarian syndrome, reduced fertility, complica-

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 52 -

tions of pregnancy, menstrual irregularities, hirsutism, stress incontinence, and depression.

Diabetes

5

Diabetes mellitus is a common metabolic disorder characterized by an abnormal elevation in blood glucose, alterations in lipids and abnormalities (complications) in the cardiovascular system, eye, kidney and nervous system. Diabetes is divided into two separate diseases: type 1 diabetes (juvenile onset), which results from a loss of cells
10 which make and secrete insulin, and type 2 diabetes (adult onset), which is caused by a defect in insulin secretion and a defect in insulin action.

Type 1 diabetes is initiated by an autoimmune reaction that attacks the insulin secreting cells (beta cells) in the pancreatic islets. Agents that prevent this reaction from occurring or that stop the reaction before destruction of the beta cells has been accomplished are potential therapies for this disease. Other agents that induce beta cell
15 proliferation and regeneration also are potential therapies.

Type II diabetes is the most common of the two diabetic conditions (6% of the population). The defect in insulin secretion is an important cause of the diabetic condition and results from an inability of the beta cell to properly detect and respond to rises in
20 blood glucose levels with insulin release. Therapies that increase the response by the beta cell to glucose would offer an important new treatment for this disease.

The defect in insulin action in Type II diabetic subjects is another target for therapeutic intervention. Agents that increase the activity of the insulin receptor in muscle, liver, and fat will cause a decrease in blood glucose and normalization of plasma lipids. The receptor activity can be increased by agents that directly stimulate the
25 receptor or that increase the intracellular signals from the receptor. Other therapies can directly activate the cellular end process, i.e. glucose transport or various enzyme
30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 53 -

systems, to generate an insulin-like effect and therefore to produce a beneficial outcome. Because overweight subjects have a greater susceptibility to Type II diabetes, any agent that reduces body weight is a possible therapy.

5 Both Type I and Type II diabetes can be treated with agents that mimic insulin action or that treat diabetic complications by reducing blood glucose levels. Likewise, agents that reduce new blood vessel growth can be used to treat the eye complications that develop in both diseases.

10 This invention further pertains to the use of novel agents identified by the screening assays described above. Accordingly, it is within the scope of this invention to use a test compound identified as described herein in an appropriate animal model. For example, an agent identified as described herein (e.g., a modulating agent, an antisense nucleic acid molecule, a specific antibody, ribozyme, or an 11 β -HSD1-like polypeptide binding molecule) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such an agent. Alternatively, an agent identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of action of such an agent. Furthermore, this invention pertains to uses of novel agents identified by the above-described screening assays for treatments as described
20 herein.

A reagent which affects 11 β -HSD1-like enzyme activity can be administered to a human cell, either *in vitro* or *in vivo*, to reduce 11 β -HSD1-like enzyme activity. The reagent preferably binds to an expression product of a human 11 β -HSD1-like enzyme
25 gene. If the expression product is a protein, the reagent is preferably an antibody. For treatment of human cells *ex vivo*, an antibody can be added to a preparation of stem cells which have been removed from the body. The cells can then be replaced in the same or another human body, with or without clonal propagation, as is known in the art.

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 54 -

In one embodiment, the reagent is delivered using a liposome. Preferably, the liposome is stable in the animal into which it has been administered for at least about 30 minutes, more preferably for at least about 1 hour, and even more preferably for at least about 24 hours. A liposome comprises a lipid composition that is capable of targeting a reagent, particularly a polynucleotide, to a particular site in an animal, such as a human. Preferably, the lipid composition of the liposome is capable of targeting to a specific organ of an animal, such as the lung, liver, spleen, heart brain, lymph nodes, and skin.

10 A liposome useful in the present invention comprises a lipid composition that is capable of fusing with the plasma membrane of the targeted cell to deliver its contents to the cell. Preferably, the transfection efficiency of a liposome is about 0.5 μg of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about 10^6 cells, more preferably about 1.0 μg of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about 10^6 cells, and even more preferably about 2.0 μg of DNA per 16 nmol of liposome delivered to about 10^6 cells. Preferably, a liposome is between about 100 and 500 nm, more preferably between about 150 and 450 nm, and even more preferably between about 200 and 400 nm in diameter.

20 Suitable liposomes for use in the present invention include those liposomes standardly used in, for example, gene delivery methods known to those of skill in the art. More preferred liposomes include liposomes having a polycationic lipid composition and/or liposomes having a cholesterol backbone conjugated to polyethylene glycol. Optionally, a liposome comprises a compound capable of targeting the liposome to a particular cell type, such as a cell-specific ligand exposed on the outer surface of the liposome.

30 Complexing a liposome with a reagent such as an antisense oligonucleotide or ribozyme can be achieved using methods which are standard in the art (see, for example, U.S. Patent 5,705,151). Preferably, from about 0.1 μg to about 10 μg of polynucleo-

tide is combined with about 8 nmol of liposomes, more preferably from about 0.5 µg to about 5 µg of polynucleotides are combined with about 8 nmol liposomes, and even more preferably about 1.0 µg of polynucleotides is combined with about 8 nmol liposomes.

5

In another embodiment, antibodies can be delivered to specific tissues *in vivo* using receptor-mediated targeted delivery. Receptor-mediated DNA delivery techniques are taught in, for example, Findeis *et al.* *Trends in Biotechnol.* 11, 202-05 (1993); Chiou *et al.*, GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu & Wu, *J. Biol. Chem.* 263, 621-24 (1988); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269, 542-46 (1994); Zenke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3655-59 (1990); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266, 338-42 (1991).

10

Determination of a Therapeutically Effective Dose

15

The determination of a therapeutically effective dose is well within the capability of those skilled in the art. A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient which increases or decreases 11β-HSD1-like enzyme activity relative to the 11β-HSD1-like enzyme activity which occurs in the absence of the therapeutically effective dose.

20

For any compound, the therapeutically effective dose can be estimated initially either in cell culture assays or in animal models, usually mice, rabbits, dogs, or pigs. The animal model also can be used to determine the appropriate concentration range and route of administration. Such information can then be used to determine useful doses and routes for administration in humans.

25

Therapeutic efficacy and toxicity, e.g., ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population), can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals.

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 56 -

The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio, LD_{50}/ED_{50} .

Pharmaceutical compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred.

5 The data obtained from cell culture assays and animal studies is used in formulating a range of dosage for human use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that include the ED_{50} with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, sensitivity of the patient, and the route of administration.

10

The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of factors related to the subject that requires treatment. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active ingredient or to maintain the desired effect. Factors which can be taken into account include the severity of the disease state, general health of the subject, age, weight, and gender of the subject, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. Long-acting pharmaceutical compositions can be administered every 3 to 15 4 days, every week, or once every two weeks depending on the half-life and clearance rate of the particular formulation.

20

Normal dosage amounts can vary from 0.1 to 100,000 micrograms, up to a total dose of about 1 g, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature and generally available to practitioners in the art. Those skilled in the art will employ different formulations 25 for nucleotides than for proteins or their inhibitors. Similarly, delivery of polynucleotides or polypeptides will be specific to particular cells, conditions, locations, etc.

25

If the reagent is a single-chain antibody, polynucleotides encoding the antibody can be 30 constructed and introduced into a cell either *ex vivo* or *in vivo* using well-established

30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 57 -

techniques including, but not limited to, transferrin-polycation-mediated DNA transfer, transfection with naked or encapsulated nucleic acids, liposome-mediated cellular fusion, intracellular transportation of DNA-coated latex beads, protoplast fusion, viral infection, electroporation, "gene gun," and DEAE- or calcium phosphate-mediated transfection.

Effective *in vivo* dosages of an antibody are in the range of about 5 μg to about 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, about 50 μg to about 5 mg/kg , about 100 μg to about 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of patient body weight, and about 200 to about 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of patient body weight. For administration of polynucleotides encoding single-chain antibodies, effective *in vivo* dosages are in the range of about 100 ng to about 200 ng, 500 ng to about 50 mg, about 1 μg to about 2 mg, about 5 μg to about 500 μg , and about 20 μg to about 100 μg of DNA.

If the expression product is mRNA, the reagent is preferably an antisense oligonucleotide or a ribozyme. Polynucleotides which express antisense oligonucleotides or ribozymes can be introduced into cells by a variety of methods, as described above.

Preferably, a reagent reduces expression of an 11 β -HSD1-like enzyme gene or the activity of an 11 β -HSD1-like polypeptide by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% relative to the absence of the reagent. The effectiveness of the mechanism chosen to decrease the level of expression of a 11 β -HSD1-like enzyme gene or the activity of an 11 β -HSD1-like polypeptide can be assessed using methods well known in the art, such as hybridization of nucleotide probes to 11 β -HSD1-like enzyme-specific mRNA, quantitative RT-PCR, immunologic detection of an 11 β -HSD1-like polypeptide, or measurement of 11 β -HSD1-like enzyme activity.

In any of the embodiments described above, any of the pharmaceutical compositions of the invention can be administered in combination with other appropriate therapeutic agents. Selection of the appropriate agents for use in combination therapy can be

made by one of ordinary skill in the art, according to conventional pharmaceutical principles. The combination of therapeutic agents can act synergistically to effect the treatment or prevention of the various disorders described above. Using this approach, one may be able to achieve therapeutic efficacy with lower dosages of each agent, thus
5 reducing the potential for adverse side effects.

Any of the therapeutic methods described above can be applied to any subject in need of such therapy, including, for example, mammals such as dogs, cats, cows, horses, rabbits, monkeys, and most preferably, humans.
10

Diagnostic Methods

Human 11 β -HSD1-like enzyme also can be used in diagnostic assays for detecting diseases and abnormalities or susceptibility to diseases and abnormalities related to the presence of mutations in the nucleic acid sequences which encode the enzyme. For
15 example, differences can be determined between the cDNA or genomic sequence encoding 11 β -HSD1-like enzyme in individuals afflicted with a disease and in normal individuals. If a mutation is observed in some or all of the afflicted individuals but not in normal individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the dis-
20 ease.

Sequence differences between a reference gene and a gene having mutations can be revealed by the direct DNA sequencing method. In addition, cloned DNA segments can be employed as probes to detect specific DNA segments. The sensitivity of this
25 method is greatly enhanced when combined with PCR. For example, a sequencing primer can be used with a double-stranded PCR product or a single-stranded template molecule generated by a modified PCR. The sequence determination is performed by conventional procedures using radiolabeled nucleotides or by automatic sequencing
30 procedures using fluorescent tags.

Genetic testing based on DNA sequence differences can be carried out by detection of alteration in electrophoretic mobility of DNA fragments in gels with or without denaturing agents. Small sequence deletions and insertions can be visualized, for example, by high resolution gel electrophoresis. DNA fragments of different sequences can be distinguished on denaturing formamide gradient gels in which the mobilities of different DNA fragments are retarded in the gel at different positions according to their specific melting or partial melting temperatures (see, e.g., Myers *et al.*, *Science* 230, 1242, 1985). Sequence changes at specific locations can also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S1 protection or the chemical cleavage method (e.g., Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4397-4401, 1985). Thus, the detection of a specific DNA sequence can be performed by methods such as hybridization, RNase protection, chemical cleavage, direct DNA sequencing or the use of restriction enzymes and Southern blotting of genomic DNA. In addition to direct methods such as gel-electrophoresis and DNA sequencing, mutations can also be detected by *in situ* analysis.

Altered levels of an 11 β -HSD1-like enzyme also can be detected in various tissues. Assays used to detect levels of the receptor polypeptides in a body sample, such as blood or a tissue biopsy, derived from a host are well known to those of skill in the art and include radioimmunoassays, competitive binding assays, Western blot analysis, and ELISA assays.

All patents and patent applications cited in this disclosure are expressly incorporated herein by reference. The above disclosure generally describes the present invention. A more complete understanding can be obtained by reference to the following specific examples which are provided for purposes of illustration only and are not intended to limit the scope of the invention.

EXAMPLE 1*Detection of 11 β -HSD1-like enzyme activity*

The polynucleotide of SEQ ID NO: 1 is inserted into the expression vector pCEV4 and the expression vector pCEV4-11 β -HSD1-like enzyme polypeptide obtained is transfected into human embryonic kidney 293 cells. From these cells extracts are obtained and 11 β -HSD1 activity is determined by measuring the conversion of 12 nmol/L H-corticosterone (1,2,6,7 H-corticosterone, specific activity 86 Ci/mmol; Amersham Life Sciences Ltd.) to radioactive 11-dehydrocorticosterone in the presence of a range of concentrations of cold corticosterone (0 to 10 μ mol/L) and either NADP or NAD as cofactor (0.2 mmol/L). Steroids are extracted into ethyl acetate and are separated by high-performance liquid chromatography. Maximal velocity (V_{max}) and K_m values are estimated using the percent conversion of H-corticosterone to 11-dehydrocorticosterone with the various concentrations of cold corticosterone. It is shown that SEQ ID NO: 2 has a 11 β -HSD1-like enzyme activity.

EXAMPLE 2*Expression of recombinant human 11 β -HSD1-like enzyme*

The *Pichia pastoris* expression vector pPICZB (Invitrogen, San Diego, CA) is used to produce large quantities of recombinant human 11 β -HSD1 polypeptides in yeast. The 11 β -HSD1-like enzyme-encoding DNA sequence comprises SEQ ID NO:1. Before insertion into vector pPICZB, the DNA sequence is modified by well known methods in such a way that it contains at its 5'-end an initiation codon and at its 3'-end an enterokinase cleavage site, a His6 reporter tag and a termination codon. Moreover, at both termini recognition sequences for restriction endonucleases are added and after digestion of the multiple cloning site of pPICZ B with the corresponding restriction enzymes the modified DNA sequence is ligated into pPICZB. This expression vector is designed for inducible expression in *Pichia pastoris*, driven by a yeast promoter. The resulting pPICZ/mid-His6 vector is used to transform the yeast

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 61 -

The yeast is cultivated under usual conditions in 5 liter shake flasks and the recombinantly produced protein isolated from the culture by affinity chromatography (Ni-NTA-Resin) in the presence of 8 M urea. The bound polypeptide is eluted with buffer, pH 3.5, and neutralized. Separation of the polypeptide from the His6 reporter tag is accomplished by site-specific proteolysis using enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA) according to manufacturer's instructions. Purified human 11 β -HSD1-like polypeptide is obtained.

10 **EXAMPLE 3**

Determination of 11 β -HSD1 activity in a kidney cell; Identification of compounds that alter 11 β -HSD1 activity.

11 β -HSD1 activity is measured essentially as in Lloyd-MacGilp, *supra*. Kidneys are sectioned (50 μ m) in ice-cold Krebs-Ringer solution (0.1 mol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L CaCl₂, 1.2 mmol/L KH₂PO₄, 1.2 mmol/L MgSO₄, and 25 mmol/L NaHCO₃), and cortical tissues are dissected from inner medullary tissue. Each region is processed separately. After homogenization in 4 volumes of Ringer's solution, the homogenates are centrifuged at 16,000 x g for 20 minutes, followed by centrifugation of the supernatant at for one hour at 10,600 x g and 4 °C to prepare microsomal fractions.

Aliquots of the reaction are contacted with test compounds from a small molecule library. Control samples are incubated in the absence of test compounds. After incubation for ten minutes at 37 °C, 2 ml ethyl acetate is added to terminate the reactions.

Dehydrogenase activity in microsomes is determined by measuring the conversion of 12 mmol/L H-corticosterone (1,2,6,7 H-corticosterone, specific activity 86 Ci/mmol; Amersham Life Sciences Ltd.) to radioactive 11-dehydrocorticosterone in the presence of a range of concentrations of cold corticosterone (0 to 10 μ mol/L) and either NADP

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 62 -

or NAD as cofactor (0.2 mmol/l). Steroids are extracted into ethyl acetate and are separated by high-performance liquid chromatography. Maximal velocity (V_{max}) and K_m values are estimated using the percent conversion of H-corticosterone to 11-dehydrocorticosterone with the various concentrations of cold corticosterone. A test compound which increases or decreases V_{max} or K_m values by 20% is identified as a potential therapeutic agent for regulating 11 β -HSD1-like enzyme.

EXAMPLE 4

Identification of a test compound which decreases 11 β -HSD1-like enzyme gene expression

A test compound is administered to a culture of human cells transfected with an 11 β -HSD1-like enzyme expression construct and incubated at 37°C for 10 to 45 minutes. A culture of the same type of cells which have not been transfected is incubated for the same time without the test compound to provide a negative control.

RNA is isolated from the two cultures as described in Chirgwin *et al.*, *Biochem. 18*, 5294-99, 1979). Northern blots are prepared using 20 to 30 μ g total RNA and hybridized with a ³²P-labeled 11 β -HSD1-like enzyme-specific probe at 65°C in Express-hyb (CLONTECH). The probe comprises at least 11 contiguous nucleotides selected from the complement of SEQ ID NO:1. A test compound which decreases the 11 β -HSD1-like enzyme-specific signal relative to the signal obtained in the absence of the test compound is identified as an inhibitor of 11 β -HSD1-like enzyme gene expression.

EXAMPLE 5

Treatment of a central nervous system disorder with a reagent which specifically binds to an 11 β -HSD1 gene product

Synthesis of antisense 11 β -HSD1 oligonucleotides comprising at least 11 contiguous nucleotides selected from the complement of SEQ ID NO:1 is performed on a Phar-

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 63 -

5 macia Gene Assembler series synthesizer using the phosphoramidite procedure. Uhlmann *et al.*, *supra*. Following assembly and deprotection, oligonucleotides are ethanol-precipitated twice, dried, and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at the desired concentration. Purity of these oligonucleotides is tested by capillary gel electrophoresis and ion exchange HPLC. Endotoxin levels in the oligonucleotide preparation are determined using the *Limulus* Amebocyte Assay. Bang, *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)* 105, 361-362 (1953).

10 An aqueous composition containing the antisense oligonucleotides at a concentration of 0.1-100 μM is administered by injection to a patient suffering from a CNS disorder. The severity of the disorder is thereby decreased.

CLAIMS

1. An isolated polynucleotide encoding a 11β -HSD1-like enzyme polypeptide and being selected from the group consisting of:
 - 5 a) a polynucleotide encoding a 11β -HSD1-like enzyme polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.
 - 10 b) a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1;
 - c) a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide specified in (a) and (b);
 - d) a polynucleotide the sequence of which deviates from the polynucleotide sequences specified in (a) to (c) due to the degeneration of the genetic code; and
 - 15 e) a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of a polynucleotide sequence specified in (a) to (d).
2. An expression vector containing any polynucleotide of claim 1.
- 20 3. A host cell containing the expression vector of claim 2.
4. A substantially purified 11β -HSD1-like enzyme polypeptide encoded by a polynucleotide of claim 1.
- 25 5. A method for producing a 11β -HSD1-like enzyme polypeptide, wherein the method comprises the following steps:
 - a) culturing the host cell of claim 3 under conditions suitable for the expression of the 11β -HSD1-like enzyme polypeptide; and

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 65 -

- b) recovering the 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide from the host cell culture.
6. A method for detection of a polynucleotide encoding a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide in a biological sample comprising the following steps:
- 5 a) hybridizing any polynucleotide of claim 1 to a nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and
- b) detecting said hybridization complex.
- 10 7. The method of claim 6, wherein before hybridization, the nucleic acid material of the biological sample is amplified.
8. A method for the detection of a polynucleotide of claim 1 or a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide of claim 4 comprising the steps of:
- 15 contacting a biological sample with a reagent which specifically interacts with the polynucleotide or the 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide.
9. A diagnostic kit for conducting the method of any one of claims 6 to 8.
- 20 10. A method of screening for agents which decrease the activity of a 11 β -HSD1-like enzyme, comprising the steps of:
- contacting a test compound with any 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1;
- 25 detecting binding of the test compound to the 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide, wherein a test compound which binds to the polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of a 11 β -HSD1-like enzyme.
11. A method of screening for agents which regulate the activity of a 11 β -HSD1-like enzyme, comprising the steps of:
- 30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 66 -

- contacting a test compound with a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1; and
detecting a 11 β -HSD1-like enzyme activity of the polypeptide, wherein a test compound which increases the 11 β -HSD1-like enzyme activity is identified as a potential therapeutic agent for increasing the activity of the 11 β -HSD1-like enzyme, and wherein a test compound which decreases the 11 β -HSD1-like enzyme activity of the polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of the 11 β -HSD1-like enzyme.
- 10 12. A method of screening for agents which decrease the activity of a 11 β -HSD1-like enzyme, comprising the steps of:
contacting a test compound with any polynucleotide of claim 1 and detecting binding of the test compound to the polynucleotide, wherein a test compound which binds to the polynucleotide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of 11 β -HSD1-like enzyme.
- 15
13. A method of reducing the activity of 11 β -HSD1-like enzyme, comprising the steps of:
contacting a cell with a reagent which specifically binds to any polynucleotide of claim 1 or any 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide of claim 4, whereby the activity of 11 β -HSD1-like enzyme is reduced.
- 20
14. A reagent that modulates the activity of a 11 β -HSD1-like enzyme polypeptide or a polynucleotide wherein said reagent is identified by the method of any of the claim 10 to 12.
- 25
15. A pharmaceutical composition, comprising:
the expression vector of claim 2 or the reagent of claim 14 and a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 67 -

16. Use of the pharmaceutical composition of claim 15 for modulating the activity of a 11 β -HSD1-like enzyme in a disease.
- 5 17. Use of claim 16 wherein the disease is CNS disorder, osteoporosis, liver disease, obesity, blood pressure or fetal development abnormality and diabetes.
18. A cDNA encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.
- 10 19. The cDNA of claim 18 which comprises SEQ ID NO:1.
20. The cDNA of claim 18 which consists of SEQ ID NO:1.
- 15 21. An expression vector comprising a polynucleotide which encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.
22. The expression vector of claim 21 wherein the polynucleotide consists of SEQ ID NO:1.
- 20 23. A host cell comprising an expression vector which encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.
24. The host cell of claim 23 wherein the polynucleotide consists of SEQ ID NO:1.
- 25 25. A purified polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.
- 30 26. The purified polypeptide of claim 25 which consists of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 68 -

27. A fusion protein comprising a polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.
- 5 28. A method of producing a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, comprising the steps of:
culturing a host cell comprising an expression vector which encodes the polypeptide under conditions whereby the polypeptide is expressed; and
isolating the polypeptide.
- 10 29. The method of claim 28 wherein the expression vector comprises SEQ ID NO:1.
- 15 30. A method of detecting a coding sequence for a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, comprising the steps of:
hybridizing a polynucleotide comprising 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 to nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and
detecting the hybridization complex.
- 20 31. The method of claim 30 further comprising the step of amplifying the nucleic acid material before the step of hybridizing.
- 25 32. A kit for detecting a coding sequence for a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, comprising:
a polynucleotide comprising 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1; and
instructions for the method of claim 30.
- 30 33. A method of detecting a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, comprising the steps of:

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 69 -

contacting a biological sample with a reagent that specifically binds to the polypeptide to form a reagent-polypeptide complex; and detecting the reagent-polypeptide complex.

- 5 34. The method of claim 33 wherein the reagent is an antibody.
35. A kit for detecting a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, comprising:
an antibody which specifically binds to the polypeptide; and
10 instructions for the method of claim 33.
36. A method of screening for agents which can modulate the activity of a human 11 β -HSD1-like enzyme, comprising the steps of:
contacting a test compound with a polypeptide comprising an amino acid se-
15 quence selected from the group consisting of: (1) amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 and (2) the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2; and
detecting binding of the test compound to the polypeptide, wherein a test
20 compound which binds to the polypeptide is identified as a potential agent for regulating activity of the human 11 β -HSD1-like enzyme.
37. The method of claim 36 wherein the step of contacting is in a cell.
38. The method of claim 36 wherein the cell is *in vitro*.
- 25 39. The method of claim 36 wherein the step of contacting is in a cell-free system.
40. The method of claim 36 wherein the polypeptide comprises a detectable label.

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 70 -

41. The method of claim 36 wherein the test compound comprises a detectable label.
42. The method of claim 36 wherein the test compound displaces a labeled ligand which is bound to the polypeptide.
43. The method of claim 36 wherein the polypeptide is bound to a solid support.
44. The method of claim 36 wherein the test compound is bound to a solid support.
45. A method of screening for agents which modulate an activity of a human 11 β -HSD1-like enzyme, comprising the steps of:
contacting a test compound with a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (1) amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 and (2) the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2; and
detecting an activity of the polypeptide, wherein a test compound which increases the activity of the polypeptide is identified as a potential agent for increasing the activity of the human 11 β -HSD1-like enzyme, and wherein a test compound which decreases the activity of the polypeptide is identified as a potential agent for decreasing the activity of the human 11 β -HSD1-like enzyme.
46. The method of claim 45 wherein the step of contacting is in a cell.
47. The method of claim 45 wherein the cell is *in vitro*.
48. The method of claim 45 wherein the step of contacting is in a cell-free system.

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 71 -

49. A method of screening for agents which modulate an activity of a human 11 β -HSD1-like enzyme, comprising the steps of:
contacting a test compound with a product encoded by a polynucleotide which comprises the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1; and
5 detecting binding of the test compound to the product, wherein a test compound which binds to the product is identified as a potential agent for regulating the activity of the human 11 β -HSD1-like enzyme.
50. The method of claim 49 wherein the product is a polypeptide.
- 10 51. The method of claim 49 wherein the product is RNA.
52. A method of reducing activity of a human 11 β -HSD1-like enzyme, comprising the step of:
15 contacting a cell with a reagent which specifically binds to a product encoded by a polynucleotide comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, whereby the activity of a human 11 β -HSD1-like enzyme is reduced.
53. The method of claim 52 wherein the product is a polypeptide.
- 20 54. The method of claim 53 wherein the reagent is an antibody.
55. The method of claim 52 wherein the product is RNA.
- 25 56. The method of claim 55 wherein the reagent is an antisense oligonucleotide.
57. The method of claim 56 wherein the reagent is a ribozyme.
58. The method of claim 52 wherein the cell is *in vitro*.
- 30

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 72 -

59. The method of claim 52 wherein the cell is *in vivo*.
60. A pharmaceutical composition, comprising:
a reagent which specifically binds to a polypeptide comprising the amino acid
5 sequence shown in SEQ ID NO:2; and
a pharmaceutically acceptable carrier.
61. The pharmaceutical composition of claim 60 wherein the reagent is an anti-
10 body.
62. A pharmaceutical composition, comprising:
a reagent which specifically binds to a product of a polynucleotide comprising
the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1; and
15 a pharmaceutically acceptable carrier.
63. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is a ribo-
zyme.
64. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is an anti-
20 sense oligonucleotide.
65. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is an anti-
body.
- 25 66. A pharmaceutical composition, comprising:
an expression vector encoding a polypeptide comprising the amino acid se-
quence shown in SEQ ID NO:2; and
a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

- 73 -

67. The pharmaceutical composition of claim 66 wherein the expression vector comprises SEQ ID NO:1.
68. A method of treating a 11β -HSD1-like enzyme dysfunction related disease, wherein the disease is selected from CNS disorder, osteoporosis, liver disease, obesity, blood pressure or fetal development abnormality, and diabetes, comprising the step of:
5 administering to a patient in need thereof a therapeutically effective dose of a reagent that modulates a function of a human 11β -HSD1-like enzyme,
10 whereby symptoms of the 11β -HSD1-like enzyme dysfunction related disease are ameliorated.
69. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of claim 36.
15
70. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of claim 45.
71. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of claim 49.
20

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

LIO 101-Foreign Countries

- 1/7 -

Fig. 1

```
accaggggg cactgttgcc eggcgaagct cggcgetgg gtccccagg cccggcccct
ccccggagg aggtgggctt cagtcacgt gaccctgcc ctacgggagg ggtgcggtc
5 ggggaccogg caggaggcgg ccganaagag aggacogtgg gggcgttgc gtggetccca
gccccggacc ccacccccgc tggacagtgg gggaaactga ggcctgagcg gactgaccac
cccggtatg gccagccagc ctccaggag cgcgagtget gctgacagg gccaacgetg
gtgttggtga gtagctggcc tatcactacg cgcgtctgg ctcccactg gtgctactg
cccacactga ggtctctctg cagaaggtgg tagggaactg ccggaagctg gcggcccaaa
10 ggtcttctca tgcggcgga cctggcctcc nctgagcgc negagagcgt ggtgcatttg
ccctggacca gcttggcggy cttgactcct cgtgctgacc acattcagc gctatggcgg
cacgagaca cgcagcccta gccactcnct gctcatgcan gtaactttgt gagctcttgc
actgaactcn cgcctcttgc cancttgacg acatcanggc ttccttnnln gtgttncttn
tttntn
```

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

LIQ 101-Foreign Countries

- 27 -

Fig. 2

QAGTVARRRS GAGSPREGPS PGGGGLFVTX PVPTGRGCGR GPGRRRPXRE DRGGVRVAPS
EGPSPRWTVG ETRAXAEXPP RLWPASLQGA RVLLTGANAG VGEELAVHYA RLGSHLVLTA
5 HTEALLQKVV GNCRELAAPR SSHRGGPGLX XGARERGAFA LDQLGGLDSS CXPHSRAMAA
REHAALATXC SCXXLCELLH XLXASCXLDD IXASXXVXLX X

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

LIG 101-Foreign Countries

- 3/7 -

Fig. 3

MEKYLLPVLV LCLGYYSSTN REFRPEMLQG KKVIIVTGASK GIGREMYHL SEMGARVVLT
ARSEGLQKV VSRCLLGAASAHYIAGTME DMAFARFVW EAGKLLGGLD MLILNHITQT
5 TMSLFHDDIH SVRRSMEVNF LSYVVLSTAA LFMLRQSNQS IAITSSMAGK MTQPLIASYS
ASKFALDGF STIRKBLMT KVVVITLCV LGFIDTETAL KETSGIILSQ AAPKQBCALE
IKGTVLRKDE VTYDKSSWTP LLLGNPGRRI MBFLSLRSYN RDLFVSN

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

LJO 101-Foreign Countries

- 4/7 -

Fig. 4

```
accaggcggg cactgttgc cggcgaact ccggcctgg gtccccgagg ccggccct  
ccccggagg aggtggcct cagtcactg gaccctgcc ctacggagg ggtgcggtc  
5 gggaccggg caggaggcg ccgagaagag aggacctgg gggccttgc gtggctcca  
nccccggacc ccacccccg ctgaaactg gggaaactg aacctgagc ggagtacca  
ccccgctat ggcagccag cctccaggga ggcgagtg cctgacagg gccaacgct  
ggtgttggtg aggagctggc ctatcactac ggcctctgg gctccacct ggtgctact  
gccccactg aggtctctc gcgacggtg gtanggaact gcgggaact gggcgcgcc  
10 aaggtctct acatcgggc ggacatggc tcccctgag caccgagag cgtggtgaa  
tttggcctg gactgcctg cggcctggc tagcgcgtg tnaacgggt g
```

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

LJO 101-Foreign Countries

- 5/7 -

Fig. 5

```
atttattat tttatttta tttttgtat ttttagtaga gacagggttt caccatgttg
gccaggctgg ttttgaactc ctgacctcaa gtgatccatc cgccttggcc tcccaaagtg
5 ctaggattac aggcctgagc caccatgctt ggctaattt ttgtcttctt agtagagacc
aggtttgccc atgttggcca ggttggcttt gaactcctga cctcaggtga tccactttcc
tggcctccc aaagtgctga ctacaagcgt gagccaccgt gccttctgca ggagagcctc
agtgtggcca gtgagcacca ggtgggagcc cagacgcgag tagtgatagg ccagctcttc
accaacacca gcgttggccc ctgtcagcag cactcgcgct ccctggaggc tggctgggtc
10 gaattg
```

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

LIQ 101-Foreign Countries

- 6/7 -

Fig. 6

```
tttttattta tttattttrt tttttatttt tgtattttta gtagagacag ggtttcacca
tgttggccag gotggttttg aactcctgac ctoaagtgat ccatccgect tggctccca
5 aagtgcagg attacaggca tgagccacca tgcttggeet aatttttgtc ttcttagtag
agaccagggt tggccatggt ggccaggctg gtcttgaact cctgacctca ggtgatccac
tttctctggc ctcccaaagt gctgactaca agcgtgagcc accgtgcctt ctgcaggaga
ggctcaggtt gggcagtgag caccagggtg gagcccaagc ccgcgtagtg ataggccagc
tctcaaccaa caccagcgtt ggccctctgc agcagcactc gcgtccctg gaggtggct
10 gggtcgaagt t
```

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

LIO 101-Foreign Countries

- 7/7 -

Fig. 7

BLASTX - Query = AW163684; Hit = swiss|P16232|DHI1_RAT

5 This hit is scoring at : 3e-11 (expectation value)

Alignment length (overlap) : 86

Identities : 43 %

Scoring matrix : BLOSUM62 (used to infer consensus pattern)

Query reading frame : +3

10 Database searched : nrdb

Q: 252 PASLQGARVLLTGANAGVGEELAYHYARLGGHVLTAHTBALLQKVVGNCRKLAAPRSH
 P..LQG.:V.:TGA.:G.G.E:AYK.:.:G:H:VLTA.:E. LQKVV..C :L.A.:.::

H: 25 PFMQQKKVIVTGASKGIGREPMAYHLSKMGARHVLTARSEGLQKVVSRCLELGAASAHY

15 RGGPCLX*GARERGFALDQ-LGGLD 506

.G. . . .ER : LGGLD

IAGTMDMFAERFVVEAGKLLGGLD 110

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG

<120> REGULATION OF HUMAN 11 BETA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE 1-LIKE ENZYME

<130> Lio 101

<150> 60/216,350
<151> 2000-07-05

<150> 60/231,295
<151> 2000-09-08

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 666
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(146)
<223> n=a,t,g or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (451)..(452)
<223> n=a,t,g or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (461)..(462)
<223> n=a,t,g or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (568)..(569)
<223> n=a,t,g or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (580)..(581)
<223> n=a,t,g or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (610)..(611)

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

<223> n=a,t,g or c

<220>

<221> misc feature

<222> (623) .. (624)

<223> n=a,t,g or c

<220>

<221> misc feature

<222> (637) .. (638)

<223> n=a,t,g or c

<220>

<221> misc feature

<222> (647) .. (648)

<223> n=a,t,g or c

<220>

<221> misc feature

<222> (648) .. (649)

<223> n=a,t,g or c

<220>

<221> misc feature

<222> (650) .. (650)

<223> n=a,t,g or c

<220>

<221> misc feature

<222> (656) .. (657)

<223> n=a,t,g or c

<220>

<221> misc feature

<222> (660) .. (661)

<223> n=a,t,g or c

<220>

<221> misc feature

<222> (664) .. (665)

<223> n=a,t,g or c

<220>

<221> misc feature

<222> (666) .. (667)

<223> n=a,t,g or c

WO 02/02797 PCT/EP01/07632

<400> 1
accaggcggg caactgttgc cggcgcagct ccggcctgg gtccccagg cccggcccct 60
ccccgggagg aggtgggctt cgagtcacgt gaccctgccc ctacgggagg gggcgcggtc 120
ggggaccocg caggaggcgg ccganaagag aggaccctgg gggcgttgcg gtggctccca 180
gccccggacc caacccccgc tggacagtgg gggaaactga ggcctgagcg gagtgaacc 240
cccgcctatg gccagccagc ctccaggag cgcgagtgtg gctgacagg gccaacgctg 300
gtgttggtga ggagctggcc tatcactacg cgcgtctggg ctcccacctg gtgctcactg 360
cccacaactga ggctctcctg cagaaggtgg tagggaactg ccggaagctg gccgccccaa 420
ggctctctca tegggcggga cctggcctcc nctgaggcgc nccagagcgt ggtgcatttg 480
ccctggacca gcttggcggg cttgactcct cgtgctgacc acattcaccg gctatggccg 540
cagcgcagca cgcagcccta gccactnct gctcatgcan gtaactttgt gagctcttgc 600
actgactctn cgcctcttgc cancttgacg acatcanggc ttccttntn gtgtntctn 660
tttntn 666

<210> 2
<211> 221
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(30)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (47)..(48)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (74)..(75)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(78)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

<222> (149) .. (150)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (150) .. (151)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (171) .. (172)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (188) .. (189)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (192) .. (193)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (193) .. (194)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (200) .. (201)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (202) .. (203)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (206) .. (207)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (211) .. (212)
<223> Unknown

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (214)..(215)
 <223> Unknown

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (215)..(216)
 <223> Unknown

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (217)..(218)
 <223> Unknown

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (219)..(220)
 <223> Unknown

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (220)..(221)
 <223> Unknown

<400> 2

Gln Ala Gly Thr Val Ala Arg Arg Arg Ser Gly Ala Gly Ser Pro Arg
 1 5 10 15

Pro Gly Pro Ser Pro Gly Gly Gly Gly Leu Arg Val Thr Xaa Pro Val
 20 25 30

Pro Tyr Gly Arg Gly Cys Gly Arg Gly Pro Gly Arg Arg Arg Pro Xaa
 35 40 45

Arg Glu Asp Arg Gly Gly Val Arg Val Ala Pro Ser Pro Gly Pro His
 50 55 60

Pro Arg Trp Thr Val Gly Glu Thr Glu Ala Xaa Ala Glu Xaa Pro Pro
 65 70 75 80

Arg Leu Trp Pro Ala Ser Leu Gln Gly Ala Arg Val Leu Leu Thr Gly
 85 90 95

WO 02/02797 PCT/EP01/07632

Ala Asn Ala Gly Val Gly Glu Glu Leu Ala Tyr His Tyr Ala Arg Leu
100 105 110

Gly Ser His Leu Val Leu Thr Ala His Thr Glu Ala Leu Leu Gln Lys
115 120 125

Val Val Gly Asn Cys Arg Lys Leu Ala Ala Pro Arg Ser Ser His Arg
130 135 140

Gly Gly Pro Gly Leu Xaa Xaa Gly Ala Arg Glu Arg Gly Ala Phe Ala
145 150 155 160

Leu Asp Gln Leu Gly Gly Leu Asp Ser Ser Cys Xaa Pro His Ser Arg
165 170 175

Ala Met Ala Ala Arg Glu His Ala Ala Leu Ala Thr Xaa Cys Ser Cys
180 185 190

Xaa Xaa Leu Cys Glu Leu Leu His Xaa Leu Xaa Ala Ser Cys Xaa Leu
195 200 205

Asp Asp Ile Xaa Ala Ser Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa Xaa
210 215 220

<210> 3
<211> 287
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Pro Val Leu Val Leu Cys Leu Gly Tyr Tyr
1 5 10 15

Tyr Ser Thr Asn Glu Glu Phe Arg Pro Glu Met Leu Gln Gly Lys Lys
20 25 30

Val Ile Val Thr Gly Ala Ser Lys Gly Ile Gly Arg Glu Met Ala Tyr
35 40 45

His Leu Ser Lys Met Gly Ala His Val Val Leu Thr Ala Arg Ser Glu
50 55 60

Glu Gly Leu Gln Lys Val Val Ser Arg Cys Leu Glu Leu Gly Ala Ala
65 70 75 80

WO 02/02797

PCT/EP01/07632

Ser Ala His Tyr Ile Ala Gly Thr Met Glu Asp Met Ala Phe Ala Glu
85 90 95

Arg Phe Val Val Glu Ala Gly Lys Leu Leu Gly Gly Leu Asp Met Leu
100 105 110

Ile Leu Asn His Ile Thr Gln Thr Thr Met Ser Leu Phe His Asp Asp
115 120 125

Ile His Ser Val Arg Arg Ser Met Glu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Val
130 135 140

Val Leu Ser Thr Ala Ala Leu Pro Met Leu Lys Gln Ser Asn Gly Ser
145 150 155 160

Ile Ala Ile Ile Ser Ser Met Ala Gly Lys Met Thr Gln Pro Leu Ile
165 170 175

Ala Ser Tyr Ser Ala Ser Lys Phe Ala Leu Asp Gly Phe Phe Ser Thr
180 185 190

Ile Arg Lys Glu His Leu Met Thr Lys Val Asn Val Ser Ile Thr Leu
195 200 205

Cys Val Leu Gly Phe Ile Asp Thr Glu Thr Ala Leu Lys Glu Thr Ser
210 215 220

Gly Ile Ile Leu Ser Gln Ala Ala Pro Lys Gln Glu Cys Ala Leu Glu
225 230 235 240

Ile Lys Gly Thr Val Leu Arg Lys Asp Glu Val Tyr Tyr Asp Lys Ser
245 250 255

Ser Trp Thr Pro Leu Leu Leu Gly Asn Pro Gly Arg Arg Ile Met Glu
260 265 270

Phe Leu Ser Leu Arg Ser Tyr Asn Arg Asp Leu Phe Val Ser Asn
275 280 285

<210> 4
<211> 531
<212> DNA

WO 02/02797 PCT/EP01/07632

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc feature
 <222> (180)..(181)
 <223> n=a,t,c or g

<220>
 <221> misc feature
 <222> (393)..(394)
 <223> n=a,t,c or g

<220>
 <221> misc feature
 <222> (521)..(522)
 <223> n=a,t,c or g

<400> 4
 accaggcggg cactgtttgcc cggcgacgct cgggcgctgg gtcccagagg cccggcccct 60
 ccccgggagg aggtgggctt cgagtcacgt gaccogtgcc ctacgggagg ggtgcggtc 120
 ggggacccgg caggaggcgg ccgagaagag aggaccgtgg gggcgttcgc gtggtccca 180
 ncccgggacc ccacccccg ctgaacagtg ggggaaactg aagcotgago ggagtgadca 240
 ccccgctat gcccagccag cctccaggga gcgcgagtgc tgetgacagg ggccaocgt 300
 ggtggtggtg aggagctggc ctatcactac gcgcgtctgg gctcccaoct ggtgctcact 360
 gccgcactg aggcctctct gcgcacggtg gtanggaact gccggaagct gggcgcgccc 420
 aaggctctct acatcgcggc ggacatggcc tccccttgag cacccgagag cgtggtgcaa 480
 tttgcgctg gactgcctgg cgggctggac tagcgctgc tnaaocgggt g 531

<210> 5
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 atttatttat tttatttta tttttgtat ttttagtaga gacagggttt caccatgttg 60
 gccaggctgg ttttgaactc ctgacctcaa gtgatccatc cgccttggcc tcccaaagtg 120
 ctaggattac aggcctgagc caccatgcct ggctaattt ttgtctcttt agtagagacc 180
 aggttttcgc atgttgcca ggcctgtctt gaactcctga cctcagggtg tcaactttcc 240
 tcggcctccc aaagtctga ctacaagcgt gagccaccgt gctctctgca gtagagcctc 300
 agtgtggcca gtgagcacca ggtgggagcc cagacgcgcg tagtgatagg ccaqctcctc 360

WO 02/02797 PC/T/EP01/07632

```

accaacacca gcggtggccc ctgtcagcag cactcgcgct cectggaggc tggctgggtc 420
gaattg 426

<210> 6
<211> 431
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
tttttattta tttattttat tttattttt tgtattttta gtagagacag ggtttcacca 50
tgttggccag gctggttttg aactcctgac ctcaagtgat ccaccgcct tggcctccca 120
aagtgc tagg attacaggca tgagccacca tgootggoot aatttttgtc ttcttagtag 180
agaccaggtt tcgcatgtt ggccaggctg gtcttgaact cctgacctca ggtgatccac 240
tttccctggc cccccaaat gctgactaca agcgtgagcc accgtgcctt ctgcaggaga 300
gcctcagtgt gggcagttag caccaggttg gagccagac ccgcgtagtg ataggccagc 360
tcctcaacca caccagcgtt ggcccctgtc agcagcactc gcgctccctg gaggctggct 420
gggtcgaagt t 431

```

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/002797 A3

- (51) International Patent Classification: **C12N 15/53**
15/11, 15/52, 9/04, 5/10, C12Q 1/68, G01N 33/68, A61K
31/7088, 34/39
- (21) International Application Number: PCT/EP91/02632
- (22) International Filing Date: 4 July 2001 (04.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09216.559 5 July 2000 (05.07.2000) US
60/231.295 8 September 2000 (08.09.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).
- (72) Inventor: and
(75) Inventor/Applicant (for US only): **RAMAKRISHNAN, Shyam** [IN/US]; 76 Luston Road, Apt. #10, Brighton, MA 02135 (US).
- (74) Common Representative: **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT**, 51368 Leverkusen (DE).
- (81) Designated States (national): **AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.**
- (84) Designated States (regional): **ARIPO** patent (GII, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, IT, FR, GB, GR, IE, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (58) Date of publication of the international search report: 27 February 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/002797 A3

(54) Title: REGULATION OF HUMAN U BETA HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE 1 LIKE ENZYME

(57) Abstract: Reagents which regulate human U beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1-like enzyme and reagents which bind to human U beta hydroxysteroid dehydrogenase 1. Use enzyme gene products employ a role in preventing, ameliorating, or correcting dysfunction or diseases including, but not limited to, CNS disorders, osteoporosis, liver disease, obesity, blood pressure or fetal development abnormalities, and diabetes.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/07632
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/53 C12N15/11 C12N15/62 C12N9/04 C12N5/10 C12Q1/68 G01N33/68 A61K31/7088 A61K39/395		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC:		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classified on system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12Q G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EMBL, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 11 November 1999 (1999-11-11) Database accession no. AW163684 XP002217921 cited in the application abstract	1, 18-20
Y		2-17, 21-71
X	STEWART P M ET AL: "11BETA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE" VITAMINS AND HORMONES, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 57, 1999, pages 249-324, XP001004592 ISSN: 0083-6729 page 265 -page 269 page 284 -page 299	13, 14, 68-71
Y		2-17, 21-71
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" prior art document but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is deemed to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in contact with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is compared with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search:		Date of mailing of the international search report
30 October 2002		12/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. O. Box 5910, Patentstrasse 2 NL-2200 SB Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2000, Telex 31651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2008		Authorized officer Schneider, P

Form PCT/ISA210 (based on July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/EP 01/07632

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.
A	MULT M ET AL: "Selective inhibition of human type 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase by synthetic steroids and xenobiotics" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 441, no. 1, 11 December 1998 (1998-12-11), pages 25-28, XP004258864 ISSN: 0014-5793 the whole document	
A	KROZOWSKI ZYGMUNT: "The 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: Functions and physiological effects." MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 151, no. 1-2, 25 May 1999 (1999-05-25), pages 121-127, XP002217920 ISSN: 0303-7207 the whole document	
A	US 5 965 372 A (KROZOWSKI ZYGMUNT S ET AL) 12 October 1999 (1999-10-12) the whole document	
E	WO 01 90090 A (BARF TJEERD ;BIOVITRUM AB (SE); EMOND RIKARD (SE); KURZ GUIDO (SE)) 29 November 2001 (2001-11-29) page 1 -page 5 page 26 page 45 -page 52 claims 6,9	11,13, 14,68-71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		national application No. PCT/EP 01/07632
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 8, 13-15, 33, 52, 53, 60, 62, 68-71 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/JP 01 07632

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 8, 30, 31, 33 and 34 comprise a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. Although claims 13, 16, 17, 52-57, 59 and 68-71 are directed to or comprise a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 8,13-15,33,52,53,60,62,68-71

Present claims 8, 13-15, 33, 52, 53, 60, 62 and 68-71 relate to a product/compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely a reagent that interacts with the claimed polypeptide or modulates its activity.

The claims cover all products/compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products/compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product/compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the products/compounds antibody, antisense and ribozyme mentioned in the description at pages 27-34.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 01/07632

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5965372	A	12-10-1999	US 5883240 A CA 2156976 A1	16-03-1999 26-02-1997
WO 0190090	A	29-11-2001	AU 6093101 A AU 6093201 A AU 6283001 A AU 6283101 A AU 6445601 A WO 0190093 A1 WO 0190090 A1 WO 0190091 A1 WO 0190094 A1 WO 0190092 A1	03-12-2001 03-12-2001 03-12-2001 03-12-2001 03-12-2001 29-11-2001 29-11-2001 29-11-2001 29-11-2001 29-11-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/16	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 25/00	
C 1 2 N 1/15	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/02	C 1 2 N 9/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/26	C 1 2 Q 1/26	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/573	G 0 1 N 33/573	A
// A 6 1 K 38/44	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/50	

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

(72) 発明者 シャイアム・ラマクリシュナン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 5 マサチューセッツ州 ブライトン、アパートメント・ナンバー 1 0、ユー
 ストン・ロード 7 6 番

F ターム(参考) 2G045 AA29 BB03 BB20 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36
 DA37 FB01 FB02 FB03 FB07
 4B024 AA01 BA08 CA04 DA03 DA12 EA02 GA11 HA01
 4B050 CC03 DD11 LL01
 4B063 QA01 QA18 QQ22 QQ43 QR32 QR77 QS02 QS34 QX02
 4B065 AA77X AA93X AA99Y AB01 BA02 CA28 CA44
 4C084 AA02 AA13 AA17 BA44 DC23 ZA022 ZA422 ZA702 ZA752 ZA812
 ZA972 ZC192 ZC352
 4C085 AA13 AA14 BB22 DD63 DD88
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 ZA02 ZA42 ZA70 ZA75 ZA81
 ZA97 ZC19 ZC35

专利名称(译)	调节人11 β -羟基类固醇脱氢酶1样酶		
公开(公告)号	JP2004502432A	公开(公告)日	2004-01-29
申请号	JP2002508037	申请日	2001-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳股份公司		
[标]发明人	シャイラムラクリシュナン		
发明人	シャイラム・ラクリシュナン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/44 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P15/00 A61P19/10 A61P25/00 A61P43/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/02 C12N9/04 C12N15/09 C12N15/53 C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/573		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P15/00 A61P19/10 A61P25/00 A61P43/00 C12N9/0006 C12Y101/01146		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P15/00 A61P19/10 A61P25/00 A61P43/00.111 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/02 C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/573.A C12N5/00.A A61K37/50		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/BA08 4B024/CA04 4B024/DA03 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ22 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA77X 4B065/AA93X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA28 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DC23 4C084/ZA022 4C084/ZA422 4C084/ZA702 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA972 4C084/ZC192 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB22 4C085/DD63 4C085/DD88 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/ZA02 4C086/ZA42 4C086/ZA70 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA97 4C086/ZC19 4C086/ZC35		
优先权	60/216350 2000-07-05 US 60/231295 2000-09-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

调节人11 β -羟基类固醇脱氢酶1样酶的试剂和与人11 β -羟基类固醇脱氢酶1样酶基因产物结合的试剂可在预防, 改善或纠正功能障碍或疾病中起作用, 包括但不限于 中枢神经系统疾病, 骨质疏松症, 肝病, 肥胖症, 血压或胎儿发育异常以及糖尿病。

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 D	4 B 0 5 0
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395 N	4 B 0 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 138 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-508037 (P2002-508037)	(71) 出願人	591063187
(86) (22) 出願日	平成13年7月4日 (2001.7.4)		バイエル アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月6日 (2003.1.6)		ドイツ連邦共和国 レーフエルターゼン (
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/007632		番地なし)
(87) 国際公開番号	W02002/002797		D-51368 Leverkusen,
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002.1.10)		Germany
(31) 優先権主張番号	60/216,350	(74) 代理人	100062144
(32) 優先日	平成12年7月5日 (2000.7.5)		弁理士 青山 隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100088405
(31) 優先権主張番号	60/231,295		弁理士 河宮 治
(32) 優先日	平成12年9月8日 (2000.9.8)	(74) 代理人	100068526
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田村 泰生
		(74) 代理人	100103230
			弁理士 高山 裕貴

最終頁に続く