

(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2007-531502  
(P2007-531502A)

(43) 公表日 平成19年11月8日(2007.11.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4B063
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4B064
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B065
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4C084
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-523979 (P2006-523979)  
 (86) (22) 出願日 平成16年8月18日 (2004. 8. 18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成18年4月17日 (2006. 4. 17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/026670  
 (87) 国際公開番号 W02005/019264  
 (87) 国際公開日 平成17年3月3日 (2005. 3. 3)  
 (31) 優先権主張番号 60/496, 007  
 (32) 優先日 平成15年8月18日 (2003. 8. 18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

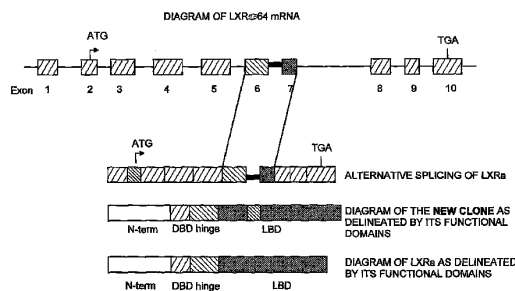
(71) 出願人 591011502  
 ワイス  
 Wyeth  
 アメリカ合衆国07940-0874ニュー  
 ジャージー州 マディソン、ファイブ・  
 ジラルダ・ファームズ  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100116311  
 弁理士 元山 忠行  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ヒトLXR αバリエント

(57) 【要約】

本発明は、新規ヒトLXR バリエントポリペプチドおよびかかるポリペプチドをコードする核酸を提供する。本発明は、治療上、診断上、および研究上の使用ならびにかかるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの産生も提供する。この要約は研究者またはその他の読者が迅速に開示された技術の対象を確認することを可能とする要約書に要求される規則に合致するために提供されることを強調する。要約書は請求項の意味の範囲を解釈または限定するために用いてはならないという理解の上で提出する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

以下からなる群から選択されるヒト肝臓X受容体アルファ (LXR ) バリエーションポリペプチドをコードする単離核酸分子:

(a) 配列番号4、6、8、17または19をコードする単離核酸分子;

(b) 配列番号4、6、8、17または19と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする単離核酸分子;

(c) 以下のハイブリダイゼーション条件下で(a) または(b)の単離核酸分子とハイブリダイズする単離核酸分子; 6X SSC (1M NaCl)、50 %ホルムアミド、1 % SDS、42 °Cでのハイブリダイゼーション、1X SSC、42 °Cでの洗浄、および68 °C、0.2XSSCおよび0.1% SDSでの洗浄; および、

(d) (a)、(b)、または(c)に相補的な単離核酸分子。

10

## 【請求項2】

配列番号3、5、7、16または18からなる請求項1の単離核酸分子。

## 【請求項3】

DNA分子である請求項1の単離核酸分子。

## 【請求項4】

RNA分子である請求項1の単離核酸分子。

## 【請求項5】

配列番号3、5、7、16または18を含む請求項1の単離核酸分子。

20

## 【請求項6】

LXR-応答性経路活性を有するポリペプチドをコードする請求項1の核酸分子。

## 【請求項7】

該単離核酸分子にコードされるポリペプチドが野生型LXR と二量体を形成することが出来る、請求項1の核酸分子。

## 【請求項8】

該単離核酸分子にコードされるポリペプチドがレチノイドX受容体 (RXR)とヘテロ二量体を形成することが出来る、請求項1の核酸分子。

## 【請求項9】

RXRが、RXR<sup>α</sup>、RXR<sup>β</sup>、またはRXR<sup>γ</sup>である請求項8の核酸分子。

30

## 【請求項10】

請求項1の単離核酸分子によってコードされるポリペプチド。

## 【請求項11】

野生型LXR と二量体を形成することが出来る請求項10のポリペプチド。

## 【請求項12】

RXRとヘテロ二量体を形成することが出来る請求項10のポリペプチド。

## 【請求項13】

該ヘテロ二量体の形成が、RXRが自然にヘテロ二量体化する核内受容体とRXRとのヘテロ二量体の形成を阻害することができる請求項12のポリペプチド。

## 【請求項14】

該ヘテロ二量体の形成がRXRのホモ二量体の形成を阻害することができる請求項12のポリペプチド。

40

## 【請求項15】

RXRが、RXR<sup>α</sup>、RXR<sup>β</sup>、またはRXR<sup>γ</sup>である請求項12のポリペプチド。

## 【請求項16】

LXR<sup>α</sup>ドミナントネガティブ活性を示しうる請求項10のポリペプチド。

## 【請求項17】

LXR<sup>α</sup>バリエーションがLXR<sup>α</sup>-64、LXR<sup>α</sup>-42<sup>+</sup>、またはLXR<sup>α</sup>-42<sup>-</sup>の断片である請求項12のポリペプチド。

## 【請求項18】

50

LXR バリアントの断片がLXR バリアントの少なくとも一つの機能を示しうる請求項17のポリペプチド。

【請求項19】

請求項1の単離核酸分子を含むコンストラクト。

【請求項20】

単離核酸分子が作動可能に調節配列に連結している請求項19のコンストラクト。

【請求項21】

プラスミドである請求項19のコンストラクト。

【請求項22】

pCMV/mycまたはpcDNA 3.1、またはその誘導体を含む請求項19のコンストラクト。

10

【請求項23】

請求項1の単離核酸分子を含む宿主細胞または該細胞の子孫。

【請求項24】

請求項19のコンストラクトを含む宿主細胞。

【請求項25】

原核細胞である請求項23の宿主細胞。

【請求項26】

大腸菌である請求項23の宿主細胞。

【請求項27】

哺乳類細胞である請求項23の宿主細胞。

20

【請求項28】

ヒト細胞である請求項23の宿主細胞。

【請求項29】

ヒト胚細胞である請求項23の宿主細胞。

【請求項30】

以下からなる群から選択される請求項23の宿主細胞：ヒト肝臓癌細胞(HepG2)、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、サルCOS-1細胞、およびヒト胎児由来腎臓細胞(HEK293)。

【請求項31】

以下からなる群から選択される請求項23の宿主細胞：出芽酵母細胞、分裂酵母細胞、およびピチア・パストリス細胞。

30

【請求項32】

LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e+</sup>、またはおよびLXR<sup>-42e-</sup>のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項33】

配列番号4、6、8、17、19のアミノ酸配列を含むポリペプチド、その天然の対立遺伝子バリエーションまたはその断片である請求項32の単離ポリペプチド。

【請求項34】

配列番号4、6、8、17、19のアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列番号2の5個を超える連続アミノ酸に対して相同性を有さないその断片である、請求項32の単離ポリペプチド。

40

【請求項35】

異種アミノ酸配列をさらに含む請求項32のポリペプチド。

【請求項36】

以下の工程を含むサンプル中の請求項32のポリペプチドの存在を検出する方法：

- a) 請求項32のポリペプチドに選択的に結合する化合物とサンプルとを接触させる工程；および、
- b) サンプル中の該ポリペプチドに該化合物が結合するか判定する工程。

【請求項37】

ポリペプチドに結合する化合物が抗体である請求項37の方法。

50

## 【請求項 38】

請求項32のポリペプチドに選択的に結合する化合物および使用説明書を含むキット。

## 【請求項 39】

請求項14または請求項32の単離ポリペプチドに特異的に結合する抗体。

## 【請求項 40】

ポリクローナル抗体である請求項39の抗体。

## 【請求項 41】

モノクローナル抗体である請求項39の抗体。

## 【請求項 42】

検出可能な標識を含む請求項39の抗体。

10

## 【請求項 43】

請求項39の抗体および医薬上許容される担体を含む組成物。

## 【請求項 44】

以下の工程を含む新規LXR バリエント核酸分子の同定方法：

(a) 1以上の核酸分子を含むサンプルと、LXR バリエント核酸分子またはその断片とを、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズさせる工程；

(b) LXR バリエント核酸分子とハイブリダイズしたサンプル中の核酸分子を同定し、それによって推定LXR バリエント核酸分子を同定する工程；および、

(c) 推定LXR バリエント核酸分子の配列を決定する工程、ここで、LXR バリエントの配列と同一でない配列を有する推定LXR バリエント核酸分子が新規LXR バリエント核酸である。

20

## 【請求項 45】

新規LXR バリエント核酸分子がLXR バリエントポリペプチドをコードする請求項44の方法。

## 【請求項 46】

新規LXR バリエントポリペプチドがLXR バリエントポリペプチドと比較して1以上の保存的置換を含む請求項45の方法。

## 【請求項 47】

以下の工程を含む生物サンプルにおけるLXR バリエントの発現を検出する方法：

(a) 生物サンプルと請求項1の核酸分子とをハイブリダイズさせる工程；および、

(b) 該核酸分子がサンプルにおける核酸分子とハイブリダイズするかどうかを判定する工程、ここで、ハイブリダイゼーションはLXR バリエントの発現を示す。

30

## 【請求項 48】

ハイブリダイゼーションの量を測定する請求項47の方法。

## 【請求項 49】

細胞と請求項10のポリペプチドとを接触させ、それによってRXR二量体形成を阻害することを含む、細胞におけるRXR二量体形成を減少させる方法。

## 【請求項 50】

RXRヘテロ二量体化が阻害される請求項49の方法。

## 【請求項 51】

RXRホモ二量体化が阻害される請求項49の方法。

40

## 【請求項 52】

以下の工程を含むLXR バリエントリガンドの同定方法：

(a) LXR バリエントポリペプチドを含むサンプルを提供する工程、

(b) サンプルと被験化合物とを接触させる工程、および、

(c) 被験化合物がLXR バリエントと結合できるかを判定する工程、ここでLXR バリエントに結合できる化合物はLXR バリエントリガンドである。

## 【請求項 53】

リガンドのKdが $1 \times 10^6$ 未満である請求項52の方法。

## 【請求項 54】

50

リガンドのKdが $1 \times 10^9$ 未満である請求項52の方法。

【請求項55】

RXRがサンプル中に存在する請求項52の方法。

【請求項56】

LXR バリエントリガンドが野生型LXR に結合できるかを判定する工程をさらに含む請求項52の方法。

【請求項57】

LXR バリエントリガンドが野生型LXR とは結合しない請求項52の方法。

【請求項58】

LXR バリエントリガンドが野生型LXR と比較してLXR バリエントに対してより高い親和性を有する請求項52の方法。 10

【請求項59】

LXR バリエントの発現または活性を調節する工程を含むLXR に制御される遺伝子の発現を調節する方法。

【請求項60】

LXR に制御される遺伝子が、FAS、CYP7A1 (コレステロール7-アルファヒドロキシラーゼ)、ApoE、CETP (コレステロールエステルトランスファータンパク質)、LPL (リポタンパク質リパーゼ)、ABCG1、ABCG5、ABCG8、ABCG4、またはPLTP (リン脂質トランスファータンパク質)である請求項59の方法。

【請求項61】

LXR に制御される遺伝子が、SREBP-1C (ステロール調節結合要素 1c)、FAS、CYP7A1 (コレステロール7-アルファヒドロキシラーゼ)、ApoE、CETP (コレステロールエステルトランスファータンパク質)、LPL (リポタンパク質リパーゼ)、ABCA1 (ATP-結合カセットトランスポーター-1)、ABCG1、ABCG5、ABCG8、ABCG4、またはPLTP (リン脂質トランスファータンパク質)である請求項59の方法。 20

【請求項62】

LXR に制御される遺伝子の発現が上昇する請求項59の方法。

【請求項63】

LXR に制御される遺伝子の発現が低下する請求項59の方法。

【請求項64】

LXR バリエントがLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42<sup>+</sup></sup>、またはLXR<sup>-42<sup>-</sup></sup>である請求項59の方法。 30

【請求項65】

LXR バリエントが発現してLXR 発現または活性を調節するのに十分な量および時間にてLXR バリエント核酸分子またはその断片を対象に導入する工程を含む、対象におけるLXR バリエント発現または活性を調節する方法。

【請求項66】

LXR バリエントが野生型LXR の発現または活性を阻害する請求項65の方法。

【請求項67】

活性がLXR ヘテロ二量体化である請求項65の方法。

【請求項68】

LXR ヘテロ二量体化がリガンドに刺激されるものである請求項66の方法。 40

【請求項69】

LXR バリエントがLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42<sup>+</sup></sup>、またはLXR<sup>-42<sup>-</sup></sup>である請求項68の方法。

【請求項70】

LXR バリエントが発現してRXRの発現または活性を調節するのに十分な量および時間にてLXR バリエント核酸分子またはその断片を対象に導入する工程を含む、対象におけるRXRの発現または活性を調節する方法。

【請求項71】

RXRのヘテロ二量体化が調節されるか、または、RXRのホモ二量体化が調節される請求項70の方法。 50

## 【請求項 7 2】

RXRと、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 、RAR、XR、またはPXRとのヘテロ二量体化が調節される請求項70の方法。

## 【請求項 7 3】

RXRのヘテロ二量体化が阻害されるか、または、RXRのホモ二量体化が阻害される請求項70の方法。

## 【請求項 7 4】

LXR $\beta$  バリアントが、LXR $\beta$ -64、LXR $\beta$ -42<sup>+</sup>、またはLXR $\beta$ -42<sup>-</sup>である請求項70の方法。

## 【請求項 7 5】

RXRが、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、またはRXR $\gamma$ である請求項70の方法。

10

## 【請求項 7 6】

個体に医薬上有効量のLXR $\beta$  バリアントを投与する工程を含む、RXR-関連疾患または障害を有する個体を治療する方法。

## 【請求項 7 7】

請求項23の細胞および医薬上許容される担体、請求項1の単離核酸分子および医薬上許容される担体、または請求項10のポリペプチドおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

20

関連出願のクロスリファレンス

本出願は、引用によりその全体を本明細書に含める2003年8月18日出願の米国仮出願60/496007号からの優先権を主張する。

## 【0002】

発明の分野

本発明は新規な肝臓X受容体 (LXR)およびかかる受容体をコードする核酸配列に関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

発明の背景

30

遺伝子発現は、真核細胞において転写因子の相互作用によって制御されている。ステロイドホルモン (例えば、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、エストロゲン、プロゲステロン、アンドロゲンおよびビタミン D)は転写因子であるそれらの核内受容体に結合し、これによって特定のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節し、分化、増殖およびアポトーシスなどの重要な細胞の活性を制御することが見いだされた (Meier, *Recept. Signal Transduct. Res.* 1997, 17, 319-335)。肝臓X受容体(LXR)は核内受容体スーパーファミリーのオファンメンバーとして最初に同定された転写因子のファミリーである。コレステロールの特定のクラスの酸化誘導体がLXRのリガンドであると同定されたことは、インビボでのこれら受容体の機能の理解の助けとして重要であり、最初にそれらの役割が脂質代謝の調節であることが示唆された。核内受容体スーパーファミリーのメンバーであるLXRには、LXR $\alpha$  (RLD-1とも称される)および遍在性受容体 (UR、LXR $\beta$ とも称される)が含まれる。LXR-依存性経路にはこれらに限定されないが以下が含まれる：胆汁酸経路を介してコレステロールの消費を増加させるコレステロール-7アルファ-ヒドロキシラーゼ、コレステロール逆輸送を刺激し、血漿 HDL-C レベルを上昇させる (Venkateswaran et al., *J. Biol. Chem.* 275, 2000, 14700-14707; Costet et al., *J. Biol. Chem.* 2000 275(36):28240-28245; Ordovas, *Nutr. Rev.* 58, 2000, 76-79; Schmitz and Kaminsky, *Front. Biosci.* 6, 2001, D505-D514)、および/またはコレステロール腸内吸収を阻害する能力があるABC タンパク質の発現 (Mangelsdorf, XIIth International Symposium on Atherosclerosis, Stockholm, June 2000)。さらに、肝臓 LXR により媒介される脂肪酸およびコレステロール代謝の間のクロストークの可能性の仮説がある (Tobin et al., *Mol*

50

. Endocrinol. 14, 2000, 741-752)。

【0004】

要約すると、進行中の研究は、LXR-依存性経路には複雑性が存在し、LXRバリエーションが異なる様式でこれらの経路に寄与していることを示唆している。

【0005】

LXR-依存性経路およびLXR作用機構を理解するためには、LXRの新規なサブタイプ、バリエーション、および/またはアイソフォームを単離し、特徴づけることが重要である。特定の疾患状態または病的状態の原因である基礎となるLXRサブタイプ、バリエーションまたはアイソフォームを同定することにより、より正確にLXR-関連疾患の予後を予測することが可能となりうる。さらに、かかるポリヌクレオチドおよび/またはかかるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの発現の存在または量は、関連する病的状態の診断、関連する病的状態に対する感受性の診断；LXRに影響を受ける疾患または障害の遺伝子特異的およびアイソフォーム特異的治療の開発、LXR-関連疾患または障害の治療の進行の追跡、および/または新しい医薬標的の開発に利用できる。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

別々にコードされるタンパク質と同様にこれらのバリエーションが代謝および生理機能に重要であり得るという認識により、LXRタンパク質のさらなるバリエーションを同定および特徴づける必要がある。本発明はこの要求を満たし、関連する利点も提供する。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

本発明は、新規LXRバリエーション(例えば、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e+</sup>、およびLXR<sup>-42e-</sup>)をコードする核酸配列の同定およびこれらバリエーションの特定の活性および特徴に関する。したがって、本発明は、ヒト肝臓X受容体アルファ(LXR<sup>α</sup>)バリエーションポリペプチドをコードする単離核酸分子、例えば、配列番号4、6、8、17、または19をコードする単離核酸分子、配列番号4、6、8、17、または19と少なくとも90%(例えば、90%、95%、または99%)の同一性を有するアミノ酸配列をコードする単離核酸分子、上記単離核酸分子と以下のハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする単離核酸分子：6X SSC (1M NaCl)、50%ホルムアミド、1% SDS、42°Cでのハイブリダイゼーション、および1X SSC、42°Cでの洗浄、および0.2XSSCおよび0.1% SDS中68°Cでの洗浄；および本明細書に記載するいずれかのLXRバリエーション配列と相補的な単離核酸分子に関する。LXRバリエーション核酸分子は、全長LXRバリエーションmRNAまたはcDNAの断片であってもよい。一般に、少なくとも断片の一部は野生型LXRmRNAまたはcDNAにはみられない配列である。ある態様において、単離核酸分子は、配列番号3、5、7、16、または18からなる。

30

【0008】

特定の態様において、単離核酸分子はDNA分子である。単離核酸分子はRNA分子であってもよく、合成ヌクレオチドと天然ヌクレオチドとを含むものであってもよい。ある場合において、単離核酸分子は、配列番号3、5、7、16または18またはその断片の核酸配列を含み、あるいは配列番号3、5、7、16または18の核酸配列からなるものであり得る。特定の態様において、本発明の核酸分子はLXR-応答性経路活性を有するポリペプチドをコードすることが出来、例えば、野生型LXR<sup>α</sup>との二量体を形成することが出来、レチノイドX受容体(RXR)(例えば、RXR<sup>α</sup>、RXR<sup>β</sup>、またはRXR<sup>γ</sup>)とのヘテロ二量体を形成することが出来、あるいはLXR-応答性経路分子の発現または活性、例えば、ABCA1またはSREBP-1Cの発現に影響を与えることが出来る。

40

【0009】

別の態様において、本発明は本明細書に記載する単離LXRバリエーション核酸分子によってコードされるポリペプチド(LXRバリエーションポリペプチド、例えば、LXR<sup>-64</sup>ポリペプチド、LXR<sup>-42e+</sup>ポリペプチド、LXR<sup>-42e-</sup>ポリペプチドまたはその断片)に関する

50

。ある場合において、ポリペプチドは野生型LXR との二量体を形成することが出来る。ある場合において、ポリペプチドはRXR (例えば、RXR 、RXR 、またはRXR )とのヘテロ二量体を形成することが出来る。ヘテロ二量体の形成は、特定の態様において、RXRと、RXRが天然にヘテロ二量体化する核内受容体との、ヘテロ二量体の形成を阻害することが出来る。この場合、ヘテロ二量体の形成の結果、RXRとRXRが天然にヘテロ二量体化する核内受容体との二量体化に関する活性が変調する(例えば、上昇または低下)。別の態様において、LXR バリアントポリペプチドは、RXR ホモ二量体の形成を阻害するヘテロ二量体を形成しうる。ある場合において、かかる阻害はRXR ホモ二量体によって誘導される活性の変調(例えば、上昇または低下)をもたらす。特定の態様において、LXR バリアントポリペプチドまたはその断片はLXR (例えば、野生型LXR )に関してドミナントネガティブな活性を示しうる。特定の態様において、本明細書に記載するポリペプチドはLXR バリアントの断片であって、LXR バリアントの少なくとも1つの機能、例えば、LXR バリアントに特異的に結合する抗体への結合を示しうるものである。

10

**【0010】**

LXR バリアントまたはその断片の単離核酸分子を含むコンストラクト (例えば限定されないが以下を含むプラスミド：pCMV/myc、pcDNA 3.1、またはその誘導體)も本発明に含まれる。単離核酸分子は調節配列に作動可能に連結しうる。

**【0011】**

別の態様において、本発明は、本明細書に記載する単離核酸分子 (例えば、LXR バリアントまたはその誘導體)を含む宿主細胞または該細胞の子孫に関する。上記のコンストラクトを含む宿主細胞も含まれる。宿主細胞は原核細胞 (例えば、大腸菌細胞)であっても、真核細胞、例えば、哺乳類細胞、例えば、マウス細胞、ラット細胞、サル細胞、またはヒト細胞(例えば、ヒト胚細胞または他のタイプの幹細胞)であってもよい。宿主細胞の例としては、これらに限定されないが以下を含む：ヒト肝臓癌細胞 (HepG2)、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、サル COS-1細胞、およびヒト胎児由来腎臓細胞 (HEK 293)。その他の宿主細胞の例としては、限定されないが、出芽酵母細胞、分裂酵母細胞、およびピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 細胞が含まれる。

20

**【0012】**

一つの側面において、本発明は、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e+</sup>、またはおよびLXR<sup>-42e-</sup>のアミノ酸配列を含む単離LXR バリアントポリペプチド、例えば、配列番号4、6、8、17、19、その天然の対立遺伝子バリアント、またはその断片のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドである。該単離ポリペプチドは、配列番号4、6、8、17、19、またはその断片のアミノ酸配列からなりうる。一般に、断片は、配列番号2の25を超える連続アミノ酸と相同性を共有しない(例えば、20、15、10、または5の連続アミノ酸)。特定の態様において、単離LXR バリアントポリペプチドは異種アミノ酸配列を含む。

30

**【0013】**

別の側面において、本発明はサンプル中のLXR バリアントポリペプチド (例えば、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e+</sup>、またはLXR<sup>-42e-</sup>)の存在を検出する方法に関する。該方法は、サンプルと、LXR バリアントポリペプチド (またはその断片)に選択的に結合する化合物(例えば、抗体、例えば、モノクローナル抗体)とを接触させる工程および該化合物がサンプル中のポリペプチドに結合するかを判定する工程を含む。本発明はまた、LXR バリアントポリペプチド (例えば、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e+</sup>、またはLXR<sup>-42e-</sup>)に選択的に結合する化合物および使用説明書を含むキットも含む。

40

**【0014】**

本発明の一つの態様は本明細書に記載する単離LXR バリアントポリペプチド (例えば、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e+</sup>、またはLXR<sup>-42e-</sup>)、またはその断片に特異的に結合する抗体を含む。ある場合において、抗体は野生型LXR には有意に結合しない。抗体は、特定の態様において、ポリクローナル抗体である。別の態様において、抗体はモノクローナル抗体である。抗体は検出可能な標識を含みうる。LXR バリアントに特異的に結合する抗体の断片、例えば、抗体のFab 断片も含まれる。本発明はまた本明細書に記載する抗体また

50



はその断片と医薬上許容される担体とを含む組成物にも関する。

【0015】

本発明の一つの側面は、新規LXR バリエーション核酸分子（例えば、LXR -64、LXR -42e+、またはLXR e-）を同定する方法を含む。該方法は、1以上の核酸分子を含むサンプルと、LXR バリエーション核酸分子またはその断片とをストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズさせる工程、LXR バリエーション核酸分子にハイブリダイズするサンプル中の核酸分子を同定し、推定LXR バリエーション核酸分子を同定する工程、および推定LXR バリエーション核酸分子の配列を決定する工程を含み、ここで、LXR バリエーションの配列と同一でない配列を有する推定LXR バリエーション核酸分子が新規LXR バリエーション核酸である。ある場合において、新規LXR バリエーション核酸分子は既知のLXR バリエーションポリペプチドをコードする。ある場合において、新規LXR バリエーション核酸分子は既知のLXR バリエーション（例えば、LXR -64、LXR -42e+、またはLXR e-）と同一でないLXR ポリペプチドをコードする。新規LXR バリエーションポリペプチドは、既知のLXR バリエーションポリペプチドと比較して1以上の保存的置換を含みうる。

10

【0016】

一つの側面において、本発明は生物サンプルにおけるLXR バリエーション（例えば、LXR -64、LXR -42e+、またはLXR -42e-）の発現を検出する方法に関する。該方法は、生物サンプルと（本明細書に記載する）LXR バリエーション核酸分子またはその断片とをハイブリダイズさせる工程およびサンプル中の核酸分子に該核酸分子がハイブリダイズするかどうかを判定する工程を含み、ここで、ハイブリダイゼーションはLXR バリエーションが発現していることを示す。ある態様において、ハイブリダイゼーションの量が測定される（例えば、絶対量または対照または参照量と比較した相対量）。

20

【0017】

本発明の別の側面は細胞におけるRXR 二量体形成を低下させる方法に関する。該方法は、細胞とLXR バリエーションポリペプチド（例えば、LXR -64、LXR -42e+、またはLXR -42e-）またはその断片とを接触させ、それによってRXR 二量体形成を阻害することを含む（例えば、RXR ヘテロ二量体化が阻害されるか、またはRXR ホモ二量体化が阻害される）。

【0018】

さらなる側面において、本発明は、LXR バリエーション（例えば、LXR -64、LXR -42e+、またはLXR -42e-）リガンドを同定する方法に関する。該方法は、LXR バリエーションポリペプチドを含むサンプルを提供すること、サンプルと被験化合物とを接触させること、被験化合物がLXR バリエーションに結合できるかを判定することを含み、LXR バリエーションに結合することが出来る化合物はLXR バリエーションリガンドである。ある態様において、リガンドのKdは $1 \times 10^6$ 未満、 $1 \times 10^9$ 未満、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{12}$ である。ある場合において、RXRはサンプル中に存在する。該方法はLXR バリエーションリガンドが野生型LXR に結合することが出来るかを判定すること、例えば、LXR バリエーションリガンドが野生型LXR には結合しないことを判定することを含みうる。ある場合において、同定されたLXR バリエーションリガンドは野生型LXR と比較してLXR バリエーションに対しての方がより高い親和性を有する。

30

【0019】

本発明の一つの側面は、LXR に制御される遺伝子発現の調節（例えば、上昇または低下）に関する。該方法は、LXR バリエーション（例えば、LXR -64、LXR -42e+、またはLXR -42e-）の発現または活性を調節することを含む。LXR に制御される遺伝子の例としては、これらに限定されないが、SREBP-1C（ステロール調節結合要素 1c）、FAS、CYP7A1（コレステロール 7-アルファヒドロキシラーゼ）、ApoE、CETP（コレステロールエステルトランスファータンパク質）、LPL（リポタンパク質リパーゼ）、ABCA1（ATP-結合カセットトランスポーター-1）、ABCG1、ABCG5、ABCG8、ABCG4、およびPLTP（リン脂質トランスファータンパク質）が挙げられる。

40

【0020】

さらなる側面において、本発明は対象におけるLXR バリエーション（例えば、LXR -64、L

50

XR -42e+、またはLXR -42e-) 発現または活性を調節する方法に関する。該方法は、対象にLXR バリアント核酸分子またはその断片を、LXR バリアントが発現してLXR 発現または活性を調節するのに十分な量および時間、導入することを含む。ある態様においてLXR バリアントは野生型LXR の発現または活性を阻害する(例えば、LXR 依存性経路遺伝子の発現誘導)。ある場合において、活性は、LXR ヘテロ二量体化、例えばリガンド刺激ヘテロ二量体化である。

【0021】

別の側面において、本発明は対象におけるRXRの発現または活性を調節する方法に関する。該方法は、LXR バリアントが発現してRXRの発現または活性を調節するのに十分な量および時間、LXR バリアント(例えば、LXR -64、LXR -42e+、またはLXR -42e-) 核酸分子またはその断片を対象に導入することを含む。ある態様において、RXRのヘテロ二量体化(例えば、RXRの、PPAR<sub>α</sub>、PPAR<sub>β</sub>、PPAR<sub>γ</sub>、RAR、XR、またはPXRとのヘテロ二量体化)が調節されるか(例えば、阻害される)あるいはRXRホモ二量体化が調節される(例えば、阻害される)。RXRは例えば、RXR<sub>α</sub>、RXR<sub>β</sub> またはRXR<sub>γ</sub> であってよい。

10

【0022】

さらなる側面において、本発明はRXR-関連疾患または障害を有する個体を治療する方法を含み、該方法は、個体に医薬上有効量のLXR バリアント(例えば、LXR -64、LXR -42e+、またはLXR e-) またはその断片を投与することを含む。

【0023】

本発明はまた、LXR バリアント(例えば、LXR -64、LXR -42e+、またはLXR e-) またはその断片を発現しうる細胞を含み、そして所望により、医薬上許容される担体を含む、以下のようなものを含む医薬組成物にも関する；本明細書に記載する単離LXR バリアント核酸分子またはその断片および医薬上許容される担体；または本明細書に記載するLXR バリアント(例えば、LXR -64、LXR -42e+、またはLXR e-) ポリペプチドおよび医薬上許容される担体。

20

【0024】

特に断りのない限り、本明細書において用いられるすべての技術および科学用語は、本発明の属する分野の当業者に一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。方法および材料が本明細書に記載するものと類似または同等のものが本発明の実施または試験において使用されうるが、好適な方法および材料を以下に説明する。すべての刊行物、特許出願、特許、およびその他の本明細書にて言及する文献はその全体を引用により本明細書に含める。さらに、材料、方法、および実施例は単に例示の目的であって、限定を意図するものではない。

30

【0025】

本発明のその他の特徴および利点は詳細な説明、図面および特許請求の範囲から明らかであろう。

【0026】

図面の簡単な説明および配列の記載

本発明は、本出願の一部を形成する以下の詳細な説明、図面および配列からより完全に理解することが可能であろう。

40

【0027】

図1Aは、野生型LXR (ネイティブ) cDNAとバリアント LXR -64 cDNAの一部との配列比較を示す(実施例2に説明)。上段は野生型LXR 配列の一部を示し、下段はLXR -64 配列の一部を示す。ヌクレオチド位置を示す番号は各cDNA 配列の開始コドンから始める。

【0028】

図1Bは、ヒト LXR (ネイティブ)の推定アミノ酸配列と図1Aにおける配列に対応するLXR -64との配列比較を示す。上段はネイティブな LXR アミノ酸配列の一部を示し、下段は LXR 64 アミノ酸配列の一部を示す。数は推定配列におけるアミノ酸位置を表す。LXR -64 バリアントに特異的な付加的な配列を下線で示す。

50

## 【0029】

図2Aは、野生型LXR cDNAの一部と新規バリエーション LXR<sup>-42e+</sup> cDNAの一部との配列比較を示す(実施例2に説明)。上段はネイティブなLXR配列の部分を示し、下段はLXR<sup>-42e+</sup>配列の一部を示す。数はcDNAの開始コドンからのヌクレオチド位置を表す。

## 【0030】

図2BはヒトLXR(野生型)とLXR<sup>-42e+</sup>の推定アミノ酸配列の配列比較を示す。上段はネイティブなLXR配列の一部であり、下段は新規バリエーションの一部である。数はアミノ酸位置を表す。LXR<sup>-42e+</sup>バリエーションに特異的な配列を下線で示す。

## 【0031】

図3Aは、野生型LXR cDNAの一部と新規バリエーション LXR<sup>-42e-</sup> cDNAの一部との配列比較を示す(実施例2に説明)。上段は野生型LXR配列の部分を示し、下段はLXR<sup>-42e-</sup>配列の一部である。数はcDNAの開始コドンからのヌクレオチド位置を表す。 10

## 【0032】

図3Bは野生型ヒトLXRとLXR<sup>-42e-</sup>の推定アミノ酸配列の配列比較を示す。上段は野生型LXR配列の一部であり、下段は新規バリエーションの一部である。数はアミノ酸位置を表す。LXR<sup>-42e-</sup>バリエーションに特異的な配列を下線で示す。

## 【0033】

図4はLXR<sup>-64</sup> mRNAの模式図である。

## 【0034】

図5はLXR<sup>-42e+</sup> mRNAの模式図である。 20

## 【0035】

図6はLXR<sup>-42e-</sup> mRNAの模式図である。

## 【0036】

図7Aは様々な組織におけるLXR<sup>-64</sup>のRNA相対発現をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。

## 【0037】

図7Bは様々な組織におけるLXR<sup>-42</sup>(LXR<sup>-42e+</sup>およびLXR<sup>-42e-</sup>を組み合わせた)のRNA相対発現をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。

## 【0038】

図8AはTHP-1細胞におけるLXR<sup>-64</sup>のRNA発現の遺伝子調節をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。 30

## 【0039】

図8BはTHP-1細胞におけるLXR<sup>-42</sup>のRNA発現の遺伝子調節をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。

## 【0040】

図9はレポーター遺伝子のLXRリガンド-依存的活性化のLXR<sup>-64</sup>およびLXR<sup>-42</sup>による阻害をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。

## 【0041】

図10はLXR<sup>-64</sup>およびLXR<sup>-42</sup>によるレポーター遺伝子のLXRリガンド-依存的活性化の阻害をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。この実験と図9の結果を示す実験の違いは、293細胞が野生型LXRと各新規バリエーションとで同時に共トランスフェクトされたことである。 40

## 【0042】

図11はRXR(RXRα)、野生型LXR(LXRα)およびRXR、またはLXR<sup>-64</sup>(L64)およびRXRをコードする発現ベクターでトランスフェクトされたHEK293細胞における、LXRアゴニスト(T0901317)、RXRアゴニスト(9RA)、または両アゴニストの存在下または非存在下におけるSREBP-1C発現をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。サンプルは、RXR + pCMV(対照ベクター)、RXRα + L64、RXRα + LXRαである。発現は対照と比べて何倍変化したかによって表す。

## 【0043】

図12は、RXR (RXRa)、野生型LXR (LXRa)およびRXR、またはLXR -64 (L64) および LXR をコードする発現ベクターでトランスフェクトしたHEK293細胞における LXR アゴニスト (T0901317)、RXR アゴニスト (9RA)、または両アゴニストの存在下または非存在下でのABCA1 発現をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。サンプルは、RXR + pCMV (対照ベクター)、RXRa + L64、RXRa + LXRaである。発現は対照と比べて何倍変化したかによって表す。

【 0 0 4 4 】

配列の記載の簡単なリストを以下に提供し、配列は実施例および図面の後に示す。

配列番号1は野生型LXR をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号2は野生型LXR の推定アミノ酸配列である。

10

配列番号3はバリエーション、LXR -64をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号4はバリエーション、LXR -64の推定アミノ酸配列である。

配列番号5はバリエーション、LXR -42e<sup>+</sup>をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号6はバリエーション、LXR -42e<sup>+</sup>の推定アミノ酸配列である。

配列番号7はバリエーション、LXR -42e<sup>-</sup>をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号8はバリエーション、LXR -42e<sup>-</sup>の推定アミノ酸配列である。

配列番号9はフォワードプライマー LXR -Forのヌクレオチド配列である。

配列番号10はリバースプライマー LXR -revのヌクレオチド配列である。

配列番号11はフォワードプライマー L64-forのヌクレオチド配列である。

配列番号12はリバースプライマー L64-revのヌクレオチド配列である。

20

配列番号13はL64 TaqMan プローブのヌクレオチド配列である。

配列番号14はルシフェラーゼアッセイに用いたLXR プロモーター配列の部分である(実施例 6に説明)。

配列番号15はLXR 応答要素 (LXRE)のヌクレオチド配列である。

配列番号16は野生型LXR のエキソン6および7を連結する野生型と比べて付加的配列を含むLXR -64 バリエーションの特有のヌクレオチド配列であり、LXR -64 バリエーションにおいてより長いエキソン6が生じる。この新しいエキソン6は野生型LXR に記載のエキソン6のすべてとそれに加えてエキソン6とエキソン7との間に位置する野生型LXR のイントロン6における配列に由来するさらなる配列を含む。

配列番号17は配列番号16によってコードされる推定アミノ酸配列である。

30

配列番号18はLXR -42 バリエーションにおいてより長いエキソン8を生じる野生型LXR のエキソン8を取り込んだLXR -42eの特有のヌクレオチド配列である。この配列は234ヌクレオチドの長さであり、位置 126において停止コドン (TAG)を含み、従ってその後の108ヌクレオチドは翻訳されない。LXR -42eとLXR -42e+との両方にそれは見られる。

配列番号19は配列番号18によってコードされる推定アミノ酸配列である。

配列番号20は本発明において用いるLXR 応答要素 (LXRE)のヌクレオチド配列である。

配列番号21はプライマー L42-Forのヌクレオチド配列である。

配列番号22はプライマー L42-Revのヌクレオチド配列である。

配列番号23はL42 プローブのヌクレオチド配列である。

配列番号24は野生型 (ネイティブ) LXR cDNAのヌクレオチド配列の一部である。

40

配列番号25はLXR -64 cDNAのヌクレオチド配列の一部である。

配列番号26はLXR -64 cDNAのヌクレオチド配列の一部である。

配列番号27は野生型LXR cDNAのアミノ酸配列の一部である。

配列番号28はLXR -64 cDNAのアミノ酸配列の一部である。

配列番号29は野生型LXR cDNAのヌクレオチド配列の一部である。

配列番号30はLXR -42e+ cDNAのヌクレオチド配列の一部である。

配列番号31はLXR -42e+ cDNAのヌクレオチド配列の一部である。

配列番号32は野生型LXR のアミノ酸配列の一部である。

配列番号33はLXR -42e+ cDNAのアミノ酸配列の一部である。

配列番号34は野生型LXR cDNAのヌクレオチド配列の一部である。

50

配列番号35はLXR -42e- cDNAのヌクレオチド配列の一部である。  
 配列番号36はLXR -42e- cDNAのヌクレオチド配列の一部である。  
 配列番号37は野生型LXR cDNAのヌクレオチド配列の一部である。  
 配列番号38はLXR -42e- cDNAのヌクレオチド配列の一部である。  
 配列番号39は野生型LXR のアミノ酸配列の一部である。  
 配列番号40はLXR -43e-のアミノ酸配列の一部である。

#### 【0045】

##### 発明の詳細な説明

本出願人は本明細書においてそれぞれ LXR -64、LXR -42e<sup>+</sup> および LXR -42e<sup>-</sup> と称する新規 LXR バリエーションをコードする LXR 遺伝子の新規サブタイプバリエーションの同定および特徴付けに成功した。新規に同定された配列は既知の LXR タンパク質と構造的および機能的に異なるバリエーションを生じる。LXR -64、LXR -42e<sup>+</sup> および LXR -42e<sup>-</sup> バリエーションはそれぞれ配列番号3、配列番号5、および配列番号7のポリヌクレオチド配列によってコードされ、全長 LXR cDNAの選択的バリエーションを表す。

10

#### 【0046】

ゲノム構成分析により、新規に単離されたバリエーションが示された；LXR -64、LXR -42e<sup>+</sup>、および LXR -42e<sup>-</sup> は野生型 LXR と特定のタンパク質ドメインおよび構造的構成を共有する(図4、5および6)。RT-PCR 分析により本発明のバリエーション mRNA 転写産物は肝臓においてもっとも豊富であることが判明した(図7Aおよび7B)。より具体的には、LXR -64は、肝臓、小腸、および膵臓においてもっとも発現量が多い。LXR -42e<sup>+</sup> および LXR -42e<sup>-</sup> は肝臓においてもっとも発現量が多い。その他の組織での発現は有意に低い。3つのLXR

20

サブタイプのN-末端、DNA結合およびヒンジドメインは野生型 LXR の対応する領域と同一であるが、C-末端ドメインおよびリガンド結合ドメイン(LBD)はある程度の可変性を示す。野生型 LXR とは対照的に、LXR -64 バリエーションはそのリガンド結合ドメインにおいてさらなる64アミノ酸を有し、LXR -42e<sup>+</sup> は野生型 LXR 配列の残基367から開始する選択的な42アミノ酸を有し、残基368から野生型 LXR の末端までのC末端(80アミノ酸)はこのバリエーションには存在せず、それゆえ野生型 LXR に存在するリガンド結合ドメインの一部を欠いている。LXR -42e<sup>-</sup> は349アミノ酸を含み、野生型 LXR のエクソン6によってコードされる60アミノ酸を欠いている。LXR -42<sup>-</sup> のアミノ酸237から開始して、野生型 LXR と71アミノ酸について100%同一性が存在する。その後の42アミノ酸は野生型とは全く異なる。LXR -42<sup>+</sup> と同様に、野生型 LXR のC-末端はLXR -42e<sup>-</sup> には存在しない。

30

#### 【0047】

本明細書において、新規 LXR バリエーションは野生型 LXR 活性のドミナントネガティブな調節因子として作用する点で機能的であることも示された。さらに、LXR -64 および LXR -42e<sup>+</sup> および LXR -42e<sup>-</sup> バリエーションはヒト単球/マクロファージ THP-1細胞においてLXR またはRXR アゴニストによって上方制御されていることが見いだされた(図8)。さらに、LXR リガンド-依存的活性化が新規 LXR -64、LXR -42e<sup>+</sup> および LXR -42e<sup>-</sup> バリエーションをレポーター遺伝子とともに共トランスフェクトした場合、鋭く低下することが見いだされた(図9および10)。LXR-依存性経路遺伝子のリガンド-依存的誘導も LXR アゴニストの存在下でLXR -64の存在下において低下し(図11および12)、ある場合において、LXR アゴニストの非存在下においてさらに低下した(図11)。

40

#### 【0048】

この3つの新規 LXR バリエーションはドミナントネガティブな遺伝子として作用することにより天然の(野生型) LXR タンパク質の生物学的/生化学的活性と拮抗することも示された。LXR タンパク質の一部、例えば、DNA結合ドメイン(DBD)は、野生型 LXR と比較するといくらか効率は低いが生化学的/生物学的活性を活性化することも出来る。

#### 【0049】

LXR バリエーション(例えば、LXR -64)の発現または活性の上昇はSREBP-C1の発現に関連

50

する障害の治療に有用である。例えば、LXR<sup>-64</sup>の過剰発現または細胞において発現するLXR<sup>-64</sup>の活性の上昇によるLXR<sup>-64</sup>の活性の破壊(例えば、野生型LXR<sup>-64</sup>と比較してLXR<sup>-64</sup>に示差的に結合する化合物の投与による)によって、SREBP-C1のインスリン誘導を阻害する方法を提供することが出来、それゆえ、インスリンによる脂肪酸合成の望ましくない誘導を阻害する方法が提供される。別の例において、LXR<sup>-64</sup>バリエーション(例えば、LXR<sup>-64</sup>)の過剰発現またはLXR<sup>-64</sup>バリエーションの選択的活性化(例えば、LXR<sup>-64</sup>バリエーションに示差的に結合する化合物による)により、SREBP-C1が阻害され得、それゆえ、心臓疾患の強い前兆である症状である高トリグリセリド血症の治療方法が提供される。別の例において、SREBP-C1発現の低下(LXR<sup>-64</sup>バリエーション、例えば、LXR<sup>-64</sup>の発現または活性の上昇による)により、VLDL-TG(超低密度リポタンパク質トリグリセリド)発現が低下し、これは特定の障害、例えば、糖尿病および特定のタイプの高リポタンパク血症において望ましい効果である。野生型LXRはコレステロール逆輸送に關与するABCA1を上方制御する効果を有し、LXR<sup>-64</sup>バリエーションはトリグリセリド合成に關与するSREBP-1Cの基底状態の発現を阻害しうることが見いだされた。

10

## 【0050】

RXRとヘテロ二量体化する核内受容体およびこれらヘテロ二量体の活性化によって、特定の遺伝子発現が上昇する。1以上のこれら遺伝子の発現が望ましくない場合(例えば、SREBP1cのLXR媒介上方制御)、LXR<sup>-64</sup>の過剰発現は、もしLXR<sup>-64</sup>バリエーション発現産物がRXRに結合し、それによってヘテロ二量体化に利用可能なRXRが減少し、望ましくない遺伝子発現の誘導が低下するとすれば対象にとって有益である。

20

## 【0051】

以下により完全に記載するように、本発明はLXR<sup>-64</sup>ホモログおよびその断片の新規バリエーションのそれぞれをコードする単離核酸を提供する。本発明はさらに本発明の核酸の増殖および発現のためのベクター、本発明の核酸およびベクターを含む宿主細胞、本発明のタンパク質、タンパク質断片および融合タンパク質、およびこれらすべてのバリエーションのいずれかに特異的な抗体を提供する。本発明は、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび/または抗体、そして典型的には生理学的に許容される担体を含む医薬上または生理学上許容される組成物を提供する。本発明はさらに本発明のLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>核酸断片、ポリペプチドおよび抗体に基づく診断上、研究用、および治療上の方法を提供する。

30

## 【0052】

定義

以下の定義および略語を本明細書に用いられる用語および略語を完全に理解するために提供する。

## 【0053】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる、単数形「ある」、および「その」は、特に断りのない限り複数の意味も含む。したがって、例えば、「ある宿主細胞」とは複数のかかる宿主細胞も含み、「ある抗体」とは、当業者に知られている1以上の抗体およびそれと等価なものを含むといった具合である。

## 【0054】

本明細書における略語は以下のような測定単位、技術、性質または化合物に対応する：「min」は分、「h」は時間、「 $\mu$ L」はマイクロリットル、「mL」はミリリットル、「mM」はミリモル、「M」はモル、「mmole」はミリモル、「kb」はキロベース、「bp」は塩基対、「IU」は国際単位を意味する。

40

「ダルベッコ修飾イーグル培地」はDMEM、

「高速液体クロマトグラフィー」はHPLC、

「ハイスループットスクリーニング」はHTS、

「オープンリーディングフレーム」はORF、

「ポリアクリルアミドゲル電気泳動」はPAGE、

「ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動」はSDS-PAGE、

50

「ポリメラーゼ連鎖反応」はPCR、  
 「逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応」はRT-PCR、  
 「肝臓X受容体アルファ」はLXR、  
 「レチノイドX受容体」はRXRとそれぞれ略する。RXRはRXR、RXR、RXR、およびその組み合わせを含むすべてのRXRの意味である。  
 「DNA結合ドメイン」はDBD、  
 「リガンド結合ドメイン」はLBD、  
 「非翻訳領域」はUTR、そして  
 「ドデシル硫酸ナトリウム」はSDSとそれぞれ略する。

## 【0055】

10

本開示の文脈において、多くの用語が用いられる。本明細書において用いられる、用語「核酸分子」は一本鎖形態または二本鎖ヘリックスのいずれかの、リボヌクレオチド (RNA分子) またはデオキシリボヌクレオチド (DNA分子)、またはいずれかのホスホエステルアナログのリン酸エステル形態をいう。二本鎖 DNA-DNA、DNA-RNAおよびRNA-RNAヘリックスが可能である。用語、核酸分子、特に DNAまたはRNA分子は、分子の一次および二次構造のみをいい、特定の三次構造にそれを限定しない。したがってこの用語はとりわけ直鎖状 (例えば、制限断片) または環状DNA分子、プラスミドおよび染色体にみられる二本鎖 DNAを含む。特定の二本鎖 DNA分子の構造を議論する際、配列は慣習に従ってDNAの非転写鎖 (即ち、mRNAに対応する配列を有する鎖) にそって5' 3'方向における配列を与え得る。

## 【0056】

20

「組換え核酸分子」は、分子生物学的操作を経ているか、または生物学的操作を経た分子由来の核酸分子、即ち、非天然核酸分子をいう。さらに、用語「組換えDNA分子」は、非天然の核酸配列をいい、即ち、通常は連続していないDNAをライゲーションにより一緒にすることにより、操作しなければ離れているはずの2つの配列セグメントの人工的組み合わせによって作られるものをいう。「組換え産生」とは、非天然組み合わせの産生を意味し、化学合成手段または核酸の単離セグメントの人工操作によってしばしば達せられるものであり、例えば以下のような操作が挙げられる：制限酵素、リガーゼを用いた遺伝子操作技術および以下に記載の同様の組換え技術：例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N.Y.; (1989)、またはAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY (1989)、およびDNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (ed. D. N. Glover) IREL Press, Oxford, (1985)。

30

## 【0057】

ある場合において、組換え核酸分子は同一または保存的アミノ酸をコードする縮重コドン (redundant codon) によりコドンを置換するよう設計され、典型的には配列認識部位が導入または排除される。あるいは、組換え核酸分子は所望の機能の核酸セグメントと一緒に結合させて、操作される配列の通常天然形態においてはみられない機能の所望の組み合わせを含む一つの遺伝的実体 (genetic entity) が作られるよう設計される。制限酵素認識部位はかかる人工操作の標的となりうるが、その他の部位特異的標的、例えば、プロモーター、DNA複製部位、調節配列、制御配列、またはその他の有用な特徴が設計により導入できる。組換え核酸分子の例としては、組換えベクター、例えば、5' 3' (センス) 方向または3' 5' (アンチセンス) 方向でDNA配列を含むクローニングまたは発現ベクターが挙げられる。LXRパリアント配列およびその断片を含む組換えベクター (例えば、発現ベクター) の作成に好適なベクターは当該技術分野において知られている。

40

## 【0058】

用語、「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸配列」、「核酸断片」、「オリゴヌクレオチド」、「遺伝子」、「遺伝子によりコードされるmRNA」は、DNAおよびRNAにおける一連のヌクレオチド塩基 (「ヌクレオチド」とも称される) をいい、2以上のヌクレオチド、RNAまたはDNA (一本鎖または二本鎖、コード鎖、相補鎖またはアンチセンス鎖のいずれでも) のあらゆる鎖、あるいは一本鎖または二本

50

鎖形態の2以上のヌクレオチドのRNA/DNA ハイブリッド配列 (ただし上記各概念は具体的に特定されることもある)を含む。

【0059】

ポリヌクレオチドはキメラ混合物であっても誘導体でもよいし、あるいはそれらの修飾バージョンでもよく、一本鎖でも二本鎖でもよい。ポリヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格のいずれにおいても、例えば、分子の安定性を向上させるか、そのハイブリダイゼーションパラメーターを変化させるために修飾することができる。アンチセンスポリヌクレオチドは以下を含む群から選択されるがそれらに限定されない修飾塩基部分を含んでいてもよい：5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルクエオシン (queosine)、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ワイプトキソシン、シュード (pseudo) ウラシル、クエオシン (queosine)、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、および2,6-ジアミノプリン。ヌクレオチド配列は、典型的にはタンパク質および酵素を作る細胞機構により使用される情報を含む遺伝情報を担持する。これらの用語は、二本鎖または一本鎖 ゲノムDNAおよびcDNA、RNA、あらゆる合成ポリヌクレオチド、遺伝子操作されたポリヌクレオチド、ならびにセンスおよびアンチセンスポリヌクレオチドの両方を含む。これは、一本鎖および二本鎖分子、即ちDNA-DNA、DNA-RNAおよびRNA-RNA ハイブリッド、ならびにアミノ酸骨格に塩基を連結して形成される「タンパク質核酸」(PNA)を含む。これはまた、修飾塩基、例えばチオ-ウラシル、チオ-グアニン、およびフルオロ-ウラシルを含む、または炭水化物あるいは脂質を含む核酸も含む。

10

20

30

【0060】

「ゲノムDNA」は遺伝子と相同的なヌクレオチド配列を有するDNA鎖である。例えば、染色体DNAの断片はゲノムDNAである。

【0061】

本発明に関して、普通に存在する核酸塩基について以下の略語を用いる。「A」はアデノシン、「C」はシチジン、「G」はグアノシン、「T」はチミジン、および「U」はウリジンを指す。

【0062】

本発明のポリヌクレオチドは当該技術分野において知られている方法、例えば自動DNA合成機 (例えば、Biosearch、Applied Biosystemsから市販されているもの)の使用により合成することが出来る。例として、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドはStein et al.、Nucl. Acids Res.、16、3209、(1988)の方法により合成でき、メチルホスホナートオリゴヌクレオチドは制御された多孔性ガラスポリマー支持体 (controlled pore glass polymer supports)の使用により調製することが出来る (Sarin et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85、7448-7451、(1988))。

40

【0063】

細胞へのアンチセンス DNAまたはRNAの送達には多数の方法が開発されており、例えば、アンチセンス分子は組織部位に直接注入することが出来る。標的特異的細胞に対して設計された修飾アンチセンス分子 (例えば、受容体または標的細胞表面に発現する抗原に特異的に結合できるペプチドまたは抗体と結合したアンチセンス核酸)を全身投与することも出来る。アンチセンス RNA分子はアンチセンス RNA分子をコードするDNA配列のインビ

50



トロまたはインビボ転写によって作ることが出来る。かかるDNA配列は好適なRNAポリメラーゼプロモーター、例えば、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターを組み込んだ様々なベクターに導入することが出来る。あるいは、用いたプロモーターに応じて構成的にまたは誘導可能なようにアンチセンスRNAを合成するアンチセンスコンストラクトは安定に細胞株に導入することが出来る。標的化した内在性mRNAの翻訳を抑制するのに十分なレベルにアンチセンスの細胞内濃度を向上させるために、アンチセンスオリゴヌクレオチドが強力なプロモーターの制御下に配置された組換えDNAコンストラクトを用いることが出来る。かかるコンストラクトを標的細胞へのトランスフェクトに用いることにより、内在性標的遺伝子転写産物と相補的塩基対を形成する十分な量の一本鎖RNAが転写され、それによって標的遺伝子mRNAの翻訳を妨げることが出来る。例えば、ベクターは細胞により取り込まれ細胞におけるアンチセンスRNAの転写を引き起こすようにインビボにて導入してもよい。かかるベクターは所望のアンチセンスRNAを生産するように転写されうる限りエピソームとして維持されてもよいし、染色体に組み込まれてもよい。かかるベクターは当該技術分野において知られている組換えDNA技術によって構築することが出来る。ベクターはプラスミドベクター、ウイルスベクター、またはその他の哺乳類細胞における複製および発現に好適である当該技術分野において知られているベクターであってもよい。アンチセンスRNAをコードする配列の発現は、哺乳類、例えば、ヒト細胞において作用することが当該技術分野において知られているいずれのプロモーターを用いて促進してもよい。かかるプロモーターは誘導性であっても構成的であってもよい。かかるプロモーターにはこれらに限定されないが以下が含まれる：SV40初期プロモーター領域 (Bernoi 20 st and Chambon, Nature, 290, 304-310, (1981))、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター (Yamamoto et al., Cell, 22, 787-797, (1980))、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1441-1445, (1981))、およびメタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster et al., Nature 29 6, 39-42, (1982))。プラスミド、コスミド、酵母人工染色体、またはウイルスベクターのいずれのタイプを用いて組織部位に直接導入されうる組換えDNAコンストラクトを調製してもよい。あるいは、ウイルスベクターは所望の組織に選択的に感染するように用いることが出来、この場合投与は別の経路(例えば、全身投与)で達成しうる。

#### 【0064】

リボザイムはDNA制限エンドヌクレアーゼと類似の方法で一本鎖RNAを特異的に切断する能力を有するRNA分子である。リボザイムをコードするヌクレオチド配列の修飾により、RNA分子における特定のヌクレオチド配列を認識し、それを切断する分子を操作により得ることが出来る (Cech, JAMA, 260, 3030, (1988))。このアプローチの主な利点はそれらが配列特異的であるため、特異的配列を有するmRNAしか不活性化されないことである。

#### 【0065】

本明細書に記載するポリヌクレオチドは天然の調節(発現制御)配列に隣接していてもよいし、以下を含む異種配列と連結していてもよい：プロモーター、配列内リボソーム進入部位(IRES)およびその他のリボソーム結合部位配列、エンハンサー、応答要素、サブレッサー、シグナル配列、ポリアデニル化配列、イントロン、5'-および3'-非コード領域など。核酸は当該技術分野において知られているその他の方法にて修飾してもよい。かかる修飾の限定的でない例としては、メチル化、「キャップ」、1以上の天然ヌクレオチドのアナログによる置換、およびヌクレオチド間修飾、例えば、非荷電結合(例えば、メチルホスホナート、ホスホトリエステル、ホスホロアミダート、またはカーバメート)および荷電結合(例えば、ホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート)による修飾が挙げられる。ポリヌクレオチドは1以上のさらなる共有結合した部分を含んでいてもよく、かかる部分としては、例えば、タンパク質(例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチドまたはポリ-L-リジン)、挿入剤(例えば、アクリジンまたはソラレン)、キレート化剤(例えば、金属、放射性金属、鉄、または酸化金属)、およびアルキル化剤が挙げられる。ポリヌクレオチドはメチルまたはエチルホスホトリエステルまたはアルキルホスホラミダート結合の形成により誘導体化されていてもよい。さらに、本明細書におい 50

てポリヌクレオチドは検出可能シグナルを直接または間接的に提供することが出来る標識により修飾してもよい。標識の例としては、放射性同位体、蛍光分子、ビオチンなどが挙げられる。

【0066】

用語「上流」は、特定の参照地点からポリヌクレオチドの5'末端に向かう位置をいう。

【0067】

用語「塩基対形成」および「ワトソン・クリック 塩基対形成」は本明細書において互換的に用いられ、その配列同一性により互いに、チミンまたはウラシル残基とアデニン残基との2つの水素結合による結合、およびシトシンとグアニン残基の3つの水素結合による結合を有する二重らせん DNAにみられるように、水素結合しうるヌクレオチドをいう (Stryer, (1995) Biochemistry, 4th edition参照、その開示は引用によりその全体を本明細書に含める)。

【0068】

用語「エキソン」は、成熟 mRNA 転写産物への連続配列に寄与することが予測(例えば、バイオインフォマティクスの使用により) および/または実験的に確認されているゲノムDNAにみられる核酸配列をいう。

【0069】

用語「分枝部位」および「3' 受容部位」は、真核 mRNAにおける3-スプライス接合部の共通配列をいう。ほとんどすべてのイントロンはGUで始まり、AGで終わる。多くのエキソン-イントロン境界部の分析により、好ましいヌクレオチドの5' および3'末端におけるより長い (extended) 共通配列が確認されている。AGに加えて、3' スプライス接合部のすぐ上流にあるその他のヌクレオチドも正確なスプライシングに重要である(即ち、分枝部位共通、YNYURAYおよび3' 受容部位、(Y)nNAG G)。

【0070】

「ポリペプチドをコードする核酸断片」という用語は、コード配列のみを含むポリヌクレオチドならびにコード配列およびさらなるコード配列または非コード配列を含むポリヌクレオチドを含む。

【0071】

核酸分子は別の核酸分子、例えば、cDNA、ゲノムDNAまたはRNAに、核酸分子の一本鎖形態が適当な温度および溶液イオン強度の条件下でその他の核酸分子とアニーリングできる場合、「ハイブリダイズできる」という(Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3 (ISBN 0-87969-309-6)。温度およびイオン強度の条件はハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。相同的核酸の予備スクリーニングのためには、 $T_m$  が55 に対応する低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、例えば、5x SSC、0.1% SDS、0.25% ミルク、ホルムアミド無し;または30% ホルムアミド、5x SSC、0.5% SDSを用いることが出来る。より高い $T_m$ に対応する中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は例えば、40% ホルムアミド、5x または6x SCCである。より高い $T_m$ に対応する高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、例えば、50% ホルムアミド、5x または6x SSCである。一般に、高いストリンジェンシーの条件とは、6X SSC (1M NaCl)、50 % ホルムアミド、1 % SDS での42 でのハイブリダイゼーション、次いで20 分間、1X SSC、0.1% SDS、42 での洗浄、次いで20 分間それぞれ68 での0.2XSSC、0.1% SDSによる3回の洗浄のハイブリダイゼーション条件である。ハイブリダイゼーションには2つの核酸が相補的配列を含んでいることが必要であり、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに依存するが、塩基間のミスマッチは許容される。核酸のハイブリダイズに適当なストリンジェンシーは核酸の長さおよび相補性の程度、当該技術分野に周知の変数に依存する。2つのヌクレオチド配列間の類似性または相同性の程度が大きければ、かかる配列を有する核酸のハイブリッドの $T_m$ 値は高くなる。核酸ハイブリダイゼーションの相対的安定性(より高い $T_m$ に対応)は次の順に低下する:RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。100ヌクレオチド長より長いハイブリッドについては  $T_m$  を計算する式

が導かれている (Sambrook et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6)、9.50-9.51)。より短い核酸、即ちオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションでは、ミスマッチの位置がより重要となり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する (Sambrook et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6)、11.7-11.8)。かかる配列の $T_m$  は計算することが出来、適当なハイブリダイゼーション条件を決定することができる。

#### 【0072】

本明細書に記載する核酸分子には、ストリンジェントな条件下で本明細書に記載するLXR 10  
R バリエーションコード配列およびその相補的配列にハイブリダイズする核酸配列が含まれる。本発明の目的のための、用語「ストリンジェントな条件」は、核酸配列の間に少なくとも90%、例えば、少なくとも95%の同一性がある場合にのみハイブリダイゼーションが起こる条件を意味する。したがって、本発明は添付の配列表に報告される完全長配列に相補的な単離核酸断片ならびにかかる配列に少なくとも95%同一な断片および前記ポリヌクレオチドに相補的な配列を有するポリヌクレオチドを含む。本明細書に記載するLXR バリエーションコード配列の相補鎖にハイブリダイズする本発明のポリヌクレオチドは一般に、配列番号3、配列番号5または配列番号7のcDNAにコードされる成熟 LXR ポリペプチドと実質的に同一の生物学的機能または活性を保持するポリペプチドをコードする。

#### 【0073】

アミノ酸またはヌクレオチド配列の「実質的な部分」とは、当業者による配列の直接的 20  
評価またはコンピュータにより自動化された以下のアルゴリズムを用いる配列比較および同定、例えば、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S. F., et al., (1993) J. Mol. Biol. 215:403-410; ncbi.nlm.nih.gov/BLASTも参照)によりポリペプチドまたは遺伝子を推定により同定する遺伝子のヌクレオチド配列またはポリペプチドのアミノ酸配列の十分な量をいう。一般に、少なくとも10、例えば、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、または少なくとも30またはそれを超える連続ヌクレオチドの配列が既知のタンパク質または遺伝子に対して相補的であることがポリペプチドまたは核酸配列を推定により同定するのに必須である。さらに、ヌクレオチド配列に関しては、 30  
15-30 (例えば、20-30)の連続ヌクレオチドを含む遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプロローブが遺伝子同定 (例えば、サザンハイブリダイゼーション)および単離 (例えば、細菌コロニーまたはバクテリオファージプラークのインサイチュハイブリダイゼーション)の配列依存的方法に用いられうる。さらに、短い12-25塩基 (例えば、12-20塩基、15-20塩基)のオリゴヌクレオチドはプライマーを含む特定の核酸断片を得るためにPCRにおける増幅プライマーとして利用できる。したがってヌクレオチド配列の「実質的な部分」は配列を含む核酸断片の特異的な同定および/または単離のために十分な配列を含む。本明細書は1以上の特定のLXRバリエーションをコードする部分的または完全長のアミノ酸およびヌクレオチド配列を教示する。本明細書において報告する配列の利点を有する当業者は、当業者に知られている目的のために開示された配列のすべてまたは実質的な部分を使用することができる。したがって、本発明は添付の配列表に報告する完全長配列および前記のかかる配列の実質的な部分を含む。 40

#### 【0074】

用語「相補的」は、互いにハイブリダイズすることができるヌクレオチド塩基の間の関係を記載するのに用いられる。例えば、DNAについては、アデノシンはチミンに対して相補的でありシトシンはグアニンに対して相補的である。

#### 【0075】

「同一性」または「類似性」は、当該技術分野において知られているように、配列の比較により決定される2以上のポリペプチド配列または2以上のポリヌクレオチド配列の関係をいう。当該技術分野において、同一性はまた、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の間の配列関連性の程度を意味し、場合によってはかかる配列の列間の一致により 50

決定される。同一性および類似性はともに公知の方法により容易に決定でき、かかる方法としては、例えば：Computational Molecular Biology、Lesk、A. M.、ed.、Oxford University Press、New York、1988；Biocomputing：Informatics and ゲノム Projects、Smith、D. W.、ed.、Academic Press、New York、1993；Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje、G.、Academic Press、1987；Computer Analysis of Sequence Data、Part I、Griffin、A. M.、and Griffin、H. G.、eds.、Humana Press、New Jersey、1994；およびSequence Analysis Primer、Gribskov、M. and Devereux、J.、eds.、M Stockton Press、New York、1991に記載された方法がある。配列間の同一性または類似性を決定するのに通常用いられる方法にはこれらに限定されないがCarillo、H. and Lipman、D.、SIAM J. Applied Math. 48:1073 (1988)に記載の方法が含まれる。同一性および類似性を決定する方法は公共のコンピュータプログラムにコード化されている。2以上の配列間の同一性および類似性を決定するコンピュータプログラム方法にはこれらに限定されないがGCG プログラムパッケージ (Devereux、J.、et al.、Nucleic Acids Res. 12(1): 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Paschal、S. F. et al.、J. Molec. Biol. 215 : 403 (1990)) が含まれる。

10

20

30

40

50

**【0076】**

用語「相同的」とは2つのポリマー(即ち、ポリペプチド分子または核酸分子)の間の配列類似性の程度をいう。本明細書において言及される相同性パーセンテージの値は、2つのポリマー間の可能な最大相同性、即ち、2つのポリマーがマッチする(相同的)位置の数が最大となるようにアラインされた場合のパーセント相同性である。

**【0077】**

用語「パーセント相同性」はポリペプチド間のアミノ酸配列同一性の程度を言う。いずれの2つのポリペプチド間の相同性も、いずれかの配列の所定の位置におけるマッチするアミノ酸の総数の直接の関数であり、例えば、いずれかの配列のアミノ酸の総数の半分が同一である場合、2つの配列は50%の相同性を示すといわれる。

**【0078】**

用語「オルソログ」は種分化により相同的な遺伝子またはタンパク質をいい、例えば、密接に関連しており、構造と機能を考慮して共通の家系を有するものである。オルソログアスなタンパク質は一般的に異なる種において同一の機能および同一の活性を有する。用語「パラログ」は遺伝子重複によって相同的な遺伝子またはタンパク質をいい、例えば、ゲノム内の遺伝子の重複したバリエーションである。Fritch、W M (1970) Syst. Zool. 19:99-113も参照されたい。用語「オルソログ」は配列番号4、6、8、17、または19に示すLXR バリエーション-様ポリペプチドアミノ酸配列に対応する別の種由来のポリペプチドでありうる。例えば、マウスおよびヒト LXR -様ポリペプチドは互いにオルソログとみなされる。

**【0079】**

本発明のポリペプチド(例えば、配列番号4、6、8、17、および19)に言及する場合の用語、「断片」、「アナログ」、および「誘導体」は、参照ポリペプチドと少なくとも1つの同じ生物学的機能または活性を実質的に保持するポリペプチドを指しうる。したがって、アナログは前駆タンパク質部分の切断により活性化されて活性化された成熟ポリペプチドを生ずることが出来る前駆タンパク質を含む。本明細書に記載するポリペプチド(例えば、配列番号4、6、8、17、および19)の断片、アナログ、または誘導体は、保存的または非保存的アミノ酸置換を有するものであってよい。置換されたアミノ酸残基は遺伝コードによってコードされてもされなくてもよく、すなわち置換は置換基を含む1以上の置換アミノ酸残基であってよく、ポリペプチドが化合物と融合しているものでもよい。例えば、ポリペプチドの半減期を長くするポリエチレングリコールまたはさらなるアミノ酸がポリペプチドに融合したもの、例えば、シグナルペプチドまたは配列、例えば、ポリペプチドまたは前駆タンパク質の精製に用いることが出来るポリヒスチジンタグに融合したものも本発明の範囲内である。かかる断片、アナログ、または誘導体は本発明の範囲内である。

**【0080】**

ポリヌクレオチド配列の「保存」残基は比較する2以上の関連配列の同じ位置において

変化せずに現れる残基をいう。比較的保存された残基は、配列のどこかに現れる残基よりもより関連の高い配列間が保存されていることをいう。

【0081】

関連ポリヌクレオチドは、同一残基を有意な部分共有するポリヌクレオチドである。

【0082】

異なるポリヌクレオチドは一方が他方に究極的には由来する場合互いに「対応する」。例えば、メッセンジャー RNAはそれが転写された遺伝子に対応する。cDNAはそれが例えば、RNA配列の知見に基づくDNAの化学合成または逆転写反応によって生じたRNAに対応する。cDNAはまた、RNAをコードする遺伝子にも対応する。ポリヌクレオチドはそれらが類似の機能を有する、例えば、比較される異なる種、株またはバリエーションにおける関連ポリペプチドをコードする場合も互いに「対応する」。

10

【0083】

DNA、RNAまたはポリヌクレオチドの「アナログ」は形態および/または機能において天然のポリヌクレオチドと(例えば、相補的ポリヌクレオチド配列上の塩基対に対する配列特異的水素結合に關与する能力において)類似する分子であるが、例えば、希少塩基または非天然塩基または骨格変化を有する点でDNAまたはRNAとは異なる。例えば、Uhlmann et al., Chemical Reviews 90, 543-584, (1990)を参照。

【0084】

対象について用いられる用語「天然」とは、対象が自然界にみられることを意味する。例えば、自然の源から単離することが出来、研究室でヒトによって意図的に改変されていない生物(細菌を含む)に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は天然のものである。本明細書において用いられる、用語「天然」とは「野生型」LXRとも称される既知のLXRをいうのに用いられる。該用語のこの使用は本明細書に記載するLXRバリエーションが天然ではないということの意味する意図ではない。

20

【0085】

「コード配列」または発現産物、例えば、RNA、ポリペプチド、タンパク質、または酵素を「コードする」配列は、発現させた場合にそのRNA、ポリペプチド、タンパク質、または酵素の産生をもたらすヌクレオチド配列、即ちポリペプチドまたはタンパク質、例えば、酵素のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列をいう。

【0086】

用語「コドン縮重」はコードされるポリペプチドのアミノ酸配列に影響を与えない様々なポリヌクレオチド配列を与える遺伝コードにおける相違をいう。したがって、本発明は、配列番号4、6、および8に示すLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、またはLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>タンパク質をコードするアミノ酸配列の全部または実質的な部分をコードするあらゆる核酸断片またはその相補鎖に關する。当業者には、所与のアミノ酸を特定するヌクレオチドコドンを使用するために特定の宿主細胞によって示される「コドン偏位」は周知である。それゆえ、宿主細胞において発現を向上させるために遺伝子を合成する場合、そのコドン使用頻度が宿主細胞の好ましいコドン使用頻度に近くなるよう遺伝子を設計するのが望ましい。

30

【0087】

用語「コードする」は、所定のヌクレオチド配列(即ち、rRNA、tRNA、およびmRNA)または所定のアミノ酸配列のいずれかを有し、それに起因する生物学的性質を有する、生物学的的方法における別のポリマーおよび巨大分子の合成のためのテンプレートとして機能するポリヌクレオチド、例えば、遺伝子、cDNA、またはmRNAのヌクレオチドの特異的配列の固有の性質をいう。したがって、遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が細胞またはその他の生物系においてタンパク質を産生する場合、遺伝子はタンパク質をコードする。コード鎖、つまりヌクレオチド配列がmRNA配列と同一である鎖(通常配列表に提供される)、および遺伝子またはcDNAの転写のためのテンプレートとして用いられる非コード鎖はともにその遺伝子またはcDNAのタンパク質またはその他の産物をコードすると称されうる。

40

【0088】

50

本発明のポリヌクレオチドはRNAの形態でもDNAの形態でもよく、DNAにはcDNAおよび合成DNAが含まれる。DNAは一本鎖であっても二本鎖であってもよい。それが一本鎖の場合、それはコード鎖であっても非コード（アンチセンス）鎖であってもよい。コード配列は配列番号3、5、7、16、18のいずれかのコード配列またはその断片と同一であってもよいし、遺伝コードの縮重または重複の結果、参照コード配列、例えば、配列番号3、5、7、16、18、またはその断片のいずれかと同一のポリペプチドをコードする異なるコード配列であってもよい。

**【0089】**

本発明は、配列番号4、6、8、17、または19の推定アミノ酸配列を特徴とするポリヌクレオチドの断片、アナログおよび誘導体をコードする本明細書に記載する上記のポリヌクレオチドのパリアントを含む。ポリヌクレオチドのパリアントはポリヌクレオチドの天然の対立遺伝子パリアントであってもよいし、ポリヌクレオチドの非天然のパリアントであってもよい。

10

**【0090】**

本発明のポリヌクレオチドは配列番号4、6または8、17および19のDNA配列を特徴とするコード配列の天然の対立遺伝子パリアントであるコード配列を有しうる。

**【0091】**

成熟ポリペプチド、即ちLXR をコードするポリヌクレオチドは成熟ポリペプチドのコード配列のみを含むものであってもよいし、または成熟ポリペプチドと、遺伝子制御配列、調節配列、または分泌配列などの付加的配列のコード配列を含むものであってもよい。

20

**【0092】**

本発明はそれゆえ宿主細胞からのポリペプチドの発現および分泌を助けるポリヌクレオチド配列（例えば、シグナルペプチド）と同一のリーディングフレームにて作動可能に連結していてもよい成熟ポリペプチドのコード配列のポリヌクレオチドを含む。ポリヌクレオチドは前駆タンパク質をコードするものでもよい。

**【0093】**

本発明のポリヌクレオチドは、例えば、ポリペプチドの精製を可能にするために、遺伝子の3'または5'末端のいずれかにヘキサヒスチジンタグ (Qiagen Inc.)などのマーカー配列とインフレームに融合したコード配列を有するものでもよい。

**【0094】**

「合成遺伝子」は、当業者に公知の手順を用いて化学合成されたオリゴヌクレオチド構築単位から組み立てることが出来る。これら構築単位は完全な遺伝子を構築するよう酵素により組み立てられた遺伝子セグメントを形成するようにライゲーションおよびアニリングされる。DNA配列に関する「化学合成」とは、構成要素のヌクレオチドがインビトロで組み立てられたことを意味する。DNAの手動化学合成を周知手段により達成してもよいし、自動化学合成を、市販の多数の機器を用いて行ってもよい。したがって、遺伝子は宿主細胞のコドン偏位を反映するヌクレオチド配列の最適化に基づいて最適な遺伝子発現のためにテーラーメイドすることが出来る。当業者はコドン使用頻度が宿主に好まれるコドンに偏っている場合の遺伝子発現の成功可能性を理解している。好ましいコドンの決定は、配列情報が入手できる宿主細胞由来の遺伝子の調査に基づいて行うことが出来る。

30

40

**【0095】**

用語「遺伝子」は、特定のタンパク質を発現する核酸断片をいい、先行する調節配列（5'非コード配列）および後に続く（3'非コード配列）コード配列も含まれる。「ネイティブな遺伝子」とは、その固有の調節配列を有する自然界にみられる遺伝子をいう。「キメラ遺伝子」または「キメラコンストラクト」はネイティブな遺伝子ではない遺伝子またはコンストラクトであり、天然には一緒にみられない調節およびコード配列を含む。したがって、キメラ遺伝子またはキメラコンストラクトは、異なる起源由来の調節配列およびコード配列を含んでいてもよいし、同じ起源由来の調節配列およびコード配列を含んでいてもよいが、天然にみられる配列と異なるように並んだものである。「内在遺伝子」は生物のゲノム中にその天然の位置にあるネイティブな遺伝子をいう。「外来」遺伝子は、宿主

50

生物に通常みられない遺伝子であるが、宿主生物に遺伝子導入によって導入されたものをいう。外来遺伝子はネイティブでない生物またはキメラ遺伝子に挿入されたネイティブな遺伝子を含むものでもよい。「導入遺伝子」は形質転換法によりゲノムに導入された遺伝子である。

【0096】

「標的遺伝子」、「標的遺伝子配列」、「標的 DNA 配列」または「標的配列」は、遺伝子、そのRNA 転写産物、またはそのタンパク質産物が転写因子によって調節されている遺伝子をいう。標的配列はインタクトな遺伝子、エキソン、イントロン、調節配列または遺伝子間のいずれの領域を含むものであってよい。標的遺伝子は、対象のゲノムDNAにおいて特定の遺伝子または遺伝子座の一部を含むものでもよい。本明細書において用いられる「標的遺伝子」は、LXR 応答性経路に關与する示差的に発現する遺伝子をいう。「示差的発現」は、遺伝子の時間的および/または組織発現パターンにおける量的および質的の両方の相違を意味する。LXR 標的遺伝子の例は、SREBP-1c (ステロール調節結合要素 1c)、FAS、CYP7A1 (コレステロール 7-アルファヒドロキシラーゼ)、ApoE、CETP (コレステロールエステルトランスファータンパク質)、LPL (リポタンパク質リパーゼ)、ABCA1 (ATP-結合カセットトランスポーター-1)、ABCG1、ABCG5、ABCG8、ABCG4、および PLTP (リン脂質トランスファータンパク質) (Edwards et al. Vasc. Pharmacol. 38, (2002) 249-256)である。用語「調節配列」はコード配列の上流 (5' 非コード配列)、内部または下流 (3' 非コード配列)に位置するヌクレオチド配列であって、例えば、転写、RNA プロセッシング、RNA 安定性、または関連コード配列の翻訳に影響を与えるものをいう。調節配列としては、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロンおよびポリアデニル化認識配列が挙げられる。

10

20

【0097】

用語「遺伝子制御配列」は、遺伝子転写の開始に要求されるDNA 配列と開始が起こる速度を制御するのに要求されるDNA 配列をいう。したがって、遺伝子制御配列はプロモーターからなるものでもよく、ここで一般的な転写因子およびポリメラーゼが集合し、そしてすべての調節配列がプロモーターにおけるかかる集合工程の速度を制御するために遺伝子調節タンパク質に結合する。例えば、原核生物に好適な制御配列には、プロモーター、所望によりオペレーター配列、およびリボゾーム結合部位が含まれる得る。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、および/またはポリアデニル化シグナルを利用することが知られている。

30

【0098】

用語「プロモーター」は、コード配列または機能性RNAの発現を制御することが出来るヌクレオチド配列をいう。一般に、コード配列はプロモーター配列の3'側に位置する。プロモーター配列は、近位およびより遠位の上流要素からなり、後者の要素はエンハンサーと呼ばれることがある。したがって、「エンハンサー」は、プロモーター活性を刺激することが出来るヌクレオチド配列であり、プロモーターの固有の要素であってもよいし、プロモーターのレベルまたは組織特異性を向上させるために挿入された異種要素であってもよい。プロモーターはその全体がネイティブな遺伝子に由来するものであってもよいし、天然にみられる異なるプロモーター由来の異なる要素から構成されるものでもよいし、合成ヌクレオチドセグメントからなるものでもよい。当業者には、異なるプロモーターは、異なる組織または細胞タイプ、または異なる発達段階または異なる環境条件に応答して遺伝子発現を引き起こすことが理解されるだろう。

40

【0099】

用語「3' 非コード配列」とはコード配列の下流に位置するヌクレオチド配列をいい、ポリアデニル化認識配列およびmRNA プロセッシングまたは遺伝子発現に影響を与えることが出来る調節シグナルをコードするその他の配列を含む。ポリアデニル化シグナルは通常、mRNA 前駆体の3' 末端へのポリアデニル酸尾部の付加に影響を与えることを特徴とする。

【0100】

50

用語「翻訳リーダー配列」は遺伝子のプロモーター配列とコード配列との間に位置するヌクレオチド配列をいう。翻訳リーダー配列は翻訳開始配列の上流の完全にプロセシングされた mRNA 内に位置する。翻訳リーダー配列は、一次転写産物の mRNA へのプロセシング、mRNA 安定性または翻訳効率に影響を与える。

**【0101】**

用語「作動可能に連結した」とは、一つの核酸断片上の 2 以上の核酸断片の関係であって、一方の機能が他方によって影響される関係をいう。例えば、プロモーターは、コード配列の発現に影響を与えることが出来る場合、コード配列に作動可能に連結している(即ち、コード配列がプロモーターの転写制御下にある)。コード配列はセンスまたはアンチセンスのいずれの方向で調節配列に作動可能に連結していてもよい。

10

**【0102】**

用語「ドメイン」は特定の生物学的性質を有するアミノ酸断片をいう。この用語にはすべての公知の構造的および直鎖状生物学的モチーフが含まれる。かかるモチーフの例にはこれらに限定されないがヘリックス・ターン・ヘリックス・モチーフ、ロイシンジッパー、グリコシル化部位、ユビキチン化部位、アルファヘリックス、およびベータシート、タンパク質分泌を起こすシグナルペプチド、翻訳後修飾のための部位、酵素活性部位、基質結合部位、および酵素切断部位が含まれる。

**【0103】**

「DNA結合ドメイン」は、デオキシリボヌクレオチド鎖と特異的に相互作用するあらゆる DNA 結合タンパク質の部分の部分をいう。配列特異的 DNA 結合タンパク質は、特異的配列または互いに高度の配列同一性を示す特異的配列のファミリーに結合する。

20

**【0104】**

用語「LBD」または「リガンド結合ドメイン」は、核内受容体、例えば、ステロイドスーパーファミリー受容体またはその他の本明細書において記載する好適な核内受容体の、リガンド(例えば、ステロイドホルモン)に結合するタンパク質ドメインをいう。

**【0105】**

用語「レポーター遺伝子」は、物理的、免疫学的、化学的、生化学的、または生物学的アッセイによって、その発現が検出可能および/または定量可能な産物をコードする遺伝子を意味する。レポーター遺伝子産物は例えば、以下の特性の 1 つを有しうるが、これに限定されない: 特異的核酸チップハイブリダイゼーションパターン、蛍光(例えば、緑色蛍光タンパク質)、酵素活性、毒性、標識または非標識の第二の分子によって特異的に結合される能力。

30

**【0106】**

用語「RNA 転写産物」は、DNA 配列の RNA ポリメラーゼに触媒される転写の結果として生じる産物をいう。RNA 転写産物が DNA 配列の相補的コピーである場合、それは一次転写産物と称されるが、一次転写産物の転写後プロセシングを経た RNA 配列である場合、成熟 RNA と称される。「メッセンジャー RNA (mRNA)」はイントロンを有さず、細胞によってポリペプチドへと翻訳されうる RNA をいう。「cDNA」は mRNA テンプレートに相補的であってそれに由来する DNA をいう。cDNA は一本鎖であってもよいし、例えば、DNA ポリメラーゼ I の Klenow 断片を使用して二本鎖に変換してもよい。

40

**【0107】**

RNA の一部に「相補的」な配列は、RNA とハイブリダイズして、安定な二本鎖を形成することが出来るのに十分な相補性を有する配列をいう; 二本鎖アンチセンス核酸の場合、二本鎖 DNA の一本鎖を試験することができるし、三重らせん形成をアッセイすることもできる。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度とアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。アンチセンス RNA の相補性は特定のヌクレオチド配列のいずれの部分とであってもよく、即ち、5' 非コード配列、3' 非コード配列、イントロンまたはコード配列のいずれでもよい。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、RNA との塩基ミスマッチをより多く含むようになるが、それでも安定な二本鎖(または、場合によっては三重らせん)を形成する。当業者であればハイブリダイズした複合体の融点を決定する標準的手法を用い

50



ることによりミスマッチの許容度を確認することが出来る。

【0108】

「機能性RNA」は、センス RNA、アンチセンス RNA、リボザイム RNA、またはその他の、翻訳されないが細胞過程に影響を有するRNAをいう。

【0109】

特定のポリヌクレオチドの「アンチセンス」コピーとは、ポリヌクレオチドに水素結合することができ、それゆえポリヌクレオチドの発現を調節することができる相補的配列をいう。それらはDNA、RNAまたはそのアナログであり、上記のように変化した骨格を有するアナログも含まれる。アンチセンスコピーが結合するポリヌクレオチドは一本鎖形態でも二本鎖形態でもよい。「アンチセンス方向」にプロモーターに連結したDNA配列は標的遺伝子のコードmRNAに相補的なRNA分子が生じるようにプロモーターに連結していることを言う。

【0110】

アンチセンスポリヌクレオチドは以下を含む群から選択されるがそれらに限定されない少なくとも一つの修飾糖部分を含んでいてもよい：アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソース。一つの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホラミドチオエート、ホスホラミダート、ホスホジアミダート、メチルホスホナート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタールまたはそのアナログからなる群から選択される少なくとも一つの修飾リン酸骨格を含んでいてもよい。

【0111】

用語「センス」とは、コードmRNA核酸配列と同じ方向にある核酸の配列をいう。「センス方向」にプロモーターに連結したDNA配列とは、mRNAと同じ配列を含むRNA分子が転写されるように連結していることを言う。しかし産生されたRNA分子は、転写されて機能性タンパク質となる必要はない。

【0112】

「センス」鎖および「アンチセンス」鎖は同じ文脈で用いられる場合、互いに相補的な一本鎖ポリヌクレオチドをいう。それらは二本鎖ポリヌクレオチドの反対鎖であってもよいし、一つの鎖は一般的に受け入れられている塩基対形成規則にしたがってその他から予測されたものでもよい。特に断りのない限り、一方または他方の鎖を「センス」または「アンチセンス」として任意に割り当てられる。

【0113】

用語「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」は、コード配列のみを含むポリヌクレオチドならびにさらなるコード配列または非コード配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

【0114】

用語「siRNA」または「RNAi」は、低分子干渉RNAおよびそれが機能する工程をいう。siRNAはRNA干渉を引き起こすことが出来、細胞、例えば、哺乳類細胞(ヒト細胞を含む)および体内、例えば、哺乳類体内(ヒト体内を含む)において特定の遺伝子の転写後サイレンシングを引き起こすことが出来る。RNA干渉という現象は以下に記載され論じられている：Bass、Nature、411、428-29、(2001)；Elbahir et al.、Nature、411、494-98、(2001)；およびFire et al.、Nature、391、806-11、(1998)、ここで干渉RNAの作成方法も論じられている。本明細書において開示される配列にもとづいたsiRNAは当該技術分野において知られているアプローチ、例えば相補的DNA鎖の使用または合成アプローチにより作ることが可能である。例示的なsiRNAは29 bpまで、25 bp、22 bp、21 bp、20 bp、15 bp、10 bp、5 bpまたはそれらの間のあらゆる整数を含む。

【0115】

本明細書において用いられる用語「発現」は、本発明の核酸断片に由来のセンス(mRNA)またはアンチセンスRNAの転写および安定な蓄積をいう。発現はまた、mRNAのポリペプチドへの翻訳のこともさす。「アンチセンス阻害」は、標的タンパク質の発現を抑制する

ことが出来るアンチセンス RNA 転写産物の産生をいう。

【0116】

用語「過剰発現」は、正常または非形質転換生物における産生レベルを上回るトランスジェニック生物における遺伝子産物の産生をいう。「共抑制」は、同一または実質的に類似の外來または内在遺伝子の発現を抑制することが出来るセンス RNA 転写産物の産生をいう(米国特許第5231020号、引用により本明細書に含める)。

【0117】

用語「レベル変化」は、正常または非形質転換生物からのものと量または割合が異なるトランスジェニック生物における遺伝子産物の産生をいう。本発明のポリペプチドの過剰発現はまず、所望の組織において所望の発達段階で遺伝子またはコンストラクトの発現を誘導することができるプロモーターにコード領域が作動可能に連結しているキメラ遺伝子またはキメラコンストラクトを構築することによって達成される。簡便化のため、キメラ遺伝子またはキメラコンストラクトは同じ遺伝子由来のプロモーター配列および翻訳リーダー配列を含んでいてもよい。転写終結シグナルをコードする3' 非コード配列を提供してもよい。本発明のキメラ遺伝子またはキメラコンストラクトは遺伝子発現を促進するために1以上のイントロンを含んでいてもよい。本発明のキメラ遺伝子またはキメラコンストラクトを含むプラスミドベクターを構築することも出来る。プラスミドベクターの選択は宿主細胞の形質転換に用いる方法に依存する。当業者であればキメラ遺伝子またはキメラコンストラクトを含む宿主細胞をうまく形質転換、選択および増殖させるためにプラスミドベクターに存在しなければならない遺伝的要素をよく知っているであろう。当業者はまた、異なる独立の形質転換事象の結果発現レベルとパターンが変化することも認識しているであろうし (Jones et al., 1985, EMBO J. 4:2411 2418; De Almeida et al., 1989, Mol. Gen. Genetics 218:78 86)、複数の事象を所望の発現レベルとパターンを示す株を得るためにスクリーニングしなければならないことも認識しているであろう。かかるスクリーニングはDNAのサザン分析、mRNA 発現のノザン分析、タンパク質発現のウェスタン分析または表現型分析によって達成されうる。

【0118】

用語「カセット」または「発現カセット」とは、規定された制限部位でベクターに挿入できる発現産物をコードするDNA コード配列またはDNAセグメントである。カセット制限部位は、正しいリーディングフレームにおけるカセットの挿入を確保するように設計される。一般的に、外來 DNAはベクター DNAの1以上の制限部位に挿入され、伝達性ベクター DNAとともに宿主細胞中にベクターによって担持される。DNAが挿入または付加されたDNAのセグメントまたは配列、例えば、発現ベクターは「DNA コンストラクト」と称されることもある。

【0119】

用語「発現系」は、例えば、ベクターによって担持され宿主細胞に導入される外來 DNAによってコードされるタンパク質の発現のために、好適な条件下での宿主細胞と適合性ベクターを意味する。一般的な発現系としては、大腸菌宿主細胞とプラスミドベクター、昆虫宿主細胞とバキュロウイルスベクターおよび哺乳類宿主細胞とベクターが挙げられる。

【0120】

用語「トランスフェクション」とは、挿入に用いた方法や、挿入されたポリヌクレオチドの分子形態にかかわらず、外來性ポリヌクレオチドの宿主細胞への挿入をいう。ポリヌクレオチドの挿入それ自体および外來性ポリヌクレオチドを含むベクターまたはプラスミドの挿入の両方が含まれる。外來性ポリヌクレオチドは細胞によって転写および翻訳されることが出来、非組込みベクター、例えば、プラスミドとして維持されうるし、宿主ゲノムに安定に組み込まれることも出来る。

【0121】

用語「形質転換」とは、核酸断片の宿主原核細胞への挿入のあらゆる公知方法をいう。用語「トランスフェクト」とは、核酸断片の宿主真核細胞への挿入のあらゆる公知方法をいう。かかる形質転換またはトランスフェクトされた細胞には、安定に形質転換またはト

10

20

30

40

50

ランスフェクトされた細胞が含まれ、ここで挿入されたDNAは宿主細胞中で複製できるようになる。これらには限られた時間のみ挿入されたDNAまたはRNAを発現する一過性に発現する細胞も含まれる。形質転換またはランスフェクション手法は形質転換される宿主細胞に依存する。ウイルスへの核酸断片のパッケージングおよび例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション、またはマイクロインジェクションによる核酸断片の直接の取り込みが含まれる。形質転換およびランスフェクションの結果、挿入されたDNAが宿主細胞のゲノムへ組込まれるか、またはプラスミド形態で宿主細胞に挿入されたDNAが維持されることになる。形質転換の方法は当該技術分野において周知であり、これらに限定されないが以下が含まれる：リポフェクション、エレクトロポレーション、ウイルス感染、およびリン酸カルシウム媒介直接取り込み。ランスフェクション方法は当該技術分野において公知であり、例えば、リン酸カルシウム DNA 共沈 (Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols, Ed. E. J. Murray, Humana Press (1991)); DEAE-デキストラン; エレクトロポレーション; カチオン性リポソーム-媒介ランスフェクション; およびタングステン粒子加速微粒子銃 (Johnston, Nature 346:776-777 (1990))が挙げられる。リン酸ストロンチウム DNA 共沈 (Brash et al., Mol. Cell. Biol. 7:2031-2034 (1987))は代替のランスフェクション方法である。

10

## 【0122】

「細胞」「宿主細胞」または「組換え宿主細胞」は本明細書において互換的に用いられる用語である。かかる用語は特定の対象細胞をいうのみではなく、かかる細胞の子孫または潜在的子孫のこともさすことが理解される。突然変異または環境的影響のいずれかにより後世において特定の修飾が起こりうるため、かかる子孫は親細胞と同一でなくてもよく、それでも本明細書において用いられる用語の範囲に含まれる。用語「組換え細胞」とは、異種核酸を含む細胞をいい、用語「天然の細胞」とは人工的に導入された異種核酸を含まない細胞をいう。

20

## 【0123】

細胞は原核細胞または真核細胞のいずれでもよい。典型的な原核宿主細胞には、様々な株の大腸菌が含まれる。典型的な真核宿主細胞は哺乳類、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞またはヒト胎児腎臓293細胞(HEK293細胞)である。導入されたDNAは通常DNAの導入小片を含むベクターの形態である。導入されたDNA配列は宿主細胞と同種由来であってもよいし宿主細胞とは異なる種由来であってもよいし、外来および同種DNAを含むハイブリッドDNA配列であってもよい。かかる用語は特定の対象細胞だけでなく、かかる細胞の子孫または潜在的子孫のこともいうことがさらに理解される。特定の修飾は突然変異または環境的影響によって後世において起こりうるのかかる子孫は親細胞と同一でなくてもよく、それでもまだ本明細書において用いられる用語の範囲に含まれる。

30

## 【0124】

用語「クローン」とは、単一の細胞または共通の祖先からの有糸分裂に由来する細胞集団をいう。「細胞株」とは、数世代にわたってインビトロで安定に生育することが出来る初代細胞のクローンをいう。

## 【0125】

用語「細胞増殖」とは、細胞集団のサイズの増加をいう。

40

## 【0126】

用語「細胞分裂」とは、有糸分裂、即ち細胞生殖工程をいう。

## 【0127】

用語「増殖」とは、細胞の増殖と分裂をいう。「活発に増殖している」とは、活発に増殖および分裂している細胞をいう。

## 【0128】

用語「分化」とは、もとの組織または細胞タイプと異なる特徴または機能を有することをいう。したがって「分化」は分化作用の工程である。

## 【0129】

用語「遺伝子誘導系」とは遺伝子発現を調節するリガンドの使用をいう。遺伝子発現の

50

誘導に低分子を利用するいくつかの調節系が開発されている(Clackson, Curr. Opin. Chem. Biol., 1, 210-218, (1997); Lewandoski, Nat Rev Genet. 2, 743-755, (2001)に概説)。遺伝子誘導系は系が活性化されない場合は低いか検出不可能な基底の標的遺伝子の発現を可能とし、系が活性化すると標的遺伝子の発現レベルを上昇させる分子的ツールである。

【0130】

用語「細胞増殖の阻害」とは、細胞の増殖と分裂を遅延および/または妨害することをいう。細胞はさらに特定の細胞周期の段階に捕捉されるよう決定されうる：G1 (Gap 1)、S 期 (DNA 合成)、G2 (Gap 2)またはM 期 (有糸分裂)。

【0131】

用語「優先的に細胞増殖を阻害する」とは、正常細胞と比較して細胞の増殖と分裂を遅延および/または妨害することをいう。

【0132】

用語「アポトーシス」とは、細胞健康状態の老化または段階が指示した場合に正常に機能しているヒトおよび動物細胞において核によってシグナルを伝えられて起こるプログラムされた細胞死をいう。「アポトーシス」は死にゆく細胞による代謝活性を要求する能動的工程であり、ゲルでいわゆるラダー状のパターンを与えるDNAの断片への切断によってしばしば特徴づけられる。アポトーシスによって死ぬ細胞は、理由は不明であるが壊死に伴う炎症応答を通常は誘発しない。しかし癌細胞は、正常細胞の伝達またはアポトーシスによる天然の細胞死工程を経験する能力がないか、あるいはかかる能力が低下している。形態学的には、アポトーシスは、隣接する細胞との接触の喪失、細胞質濃度、エンドヌクレアーゼ活性に関連するクロマチン凝縮および核濃縮、およびとりわけ核の断片化によって特徴づけられる。

【0133】

用語「ポリペプチド」とはアミノ酸のポリマーのことであり、ポリマーの長さとは関係なく用いられる；したがって「ペプチド」、「オリゴペプチド」および「タンパク質」は本明細書において互換的に用いられるポリペプチドの定義に含まれる。この用語は長さにかかわらず、アミノ酸モノマー(残基)の天然または合成ポリマーをいい、本明細書においてアミノ酸モノマーには、ペプチド結合に参加することができる天然のアミノ酸、天然のアミノ酸構造バリエーション、または合成非天然アナログが含まれる。この用語はまた、ポリペプチドの化学的または発現後修飾は特定の態様では含まれるが、特定の態様では含まれないにもかかわらず、本発明のポリペプチドの化学的または発現後修飾を特定したり、除外したりすることはない。それゆえ、例えば、グリコシル基、アセチル基、リン酸基、脂質基などの共有結合を含むポリペプチドの修飾は用語、ポリペプチドに含まれる。さらに、かかる修飾ポリペプチドはそれぞれの種として特定される場合があり、本発明の範囲に含まれる場合もあるが、除外される場合もある。天然またはその他の化学的修飾、例えば、上記例に挙げたものはポリペプチドのあらゆるところに起こりえ、例えば、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端に起こりうる。同じタイプの修飾が所与のポリペプチドにおいていくつかの部位でなんらかのまたは様々な程度にて存在しうることが理解されよう。また、所与のポリペプチドは多くのタイプの修飾を含むことがある。ポリペプチドは例えばユビキチン化の結果、分岐していてもよく、分岐の有無にかかわらず環状であってもよい。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、閉環、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPI アンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク分解性プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのトランスファー-RNA 媒介アミノ酸付加、例えば、アルギニル化、およびユビキチン化が含まれる(例えば、Protein--structure and molecular properti

10

20

30

40

50

es、2nd Ed.、T. E. Creighton、W. H. Freeman and Company、New York (1993); posttranslational covalent modification of protein、b. c. Johnson、Ed.、Academic Press、New York、pgs. 1-12、1983; Seifter et al.、Meth. Enzymol. 182:626-646、1990; Rattan et al.、Ann. NY Acad. Sci. 663:48-62、1992参照)。ポリペプチドの定義に含まれるものとしてはまた、1以上のアミノ酸アナログ(例えば、非天然アミノ酸、非関連生物系においてのみ天然に存在するアミノ酸または哺乳類系からの修飾アミノ酸)、結合が置換されたポリペプチドおよびその他の当該技術分野において知られている天然および非天然修飾が挙げられる。用語「ポリペプチド」はまた用語「タンパク質」または「ペプチド」と互換的に用いられる。

【0134】

用語「ペプチド」とは2以上のアミノ酸のあらゆるポリマーをいい、ここで各アミノ酸は、隣接アミノ酸のNH<sub>2</sub>およびCOOH基の間に形成されるペプチド結合(--CONH--)を介して1または2の別のアミノ酸が連結している。好ましくは、アミノ酸は天然のアミノ酸であり、特に、L-エナンチオマー形態のアルファ-アミノ酸である。しかし、その他のアミノ酸、エナンチオマー形態およびアミノ酸誘導体がペプチドに含まれていてもよい。ペプチドには、加水分解によって3以上のアミノ酸を生ずる「ポリペプチド」も含まれる。ポリペプチドはタンパク質を含み、これは典型的には50またはそれ以上のアミノ酸を含む。本明細書において、用語「オリゴペプチド」は25以下のモノマーサブユニットを有するタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをいう。

【0135】

「バリエーション」とは、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドと異なるが、その必須の性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。典型的なポリヌクレオチドのバリエーションは参照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列において異なる。バリエーションのヌクレオチド配列の変化は、参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変えることもあれば変えないこともある。ヌクレオチド変化は以下に説明するように参照配列にコードされるポリペプチドにおけるアミノ酸置換、付加、欠失、融合および切断を導きうる。

【0136】

用語「バリエーション」とは参照ポリペプチドと異なる単一のポリペプチド、複数のポリペプチドをいう。一般的に、参照ポリペプチドとアミノ酸配列において異なるポリペプチドと参照ポリペプチドとの差は、参照およびバリエーションのアミノ酸配列が非常に似ており、ある領域においては同一でありうるように制限される。バリエーションと参照ポリペプチドとは、1以上の置換、欠失、付加、融合および切断によってアミノ酸配列において異なり、置換、欠失、付加、融合および切断はいかなる組み合わせにおいて存在してもよい。置換または挿入されたアミノ酸残基は遺伝コードによってコードされるものでもそうでないものでもよい。典型的な保存的置換としては、Gly、Ala; Val、Ile、Leu; Asp、Glu; Asn、Gln; Ser、Thr; Lys、Arg; PheおよびTyrが挙げられる。さらに、バリエーションは末端または内部欠失によって参照配列よりも短いことにより参照ポリペプチド配列と異なる本発明のポリペプチドの断片でありうる。本発明のポリペプチドのバリエーションには、かかるポリペプチドと実質的に同一の生物学的機能または活性を保持しているポリペプチドが含まれ、例えば、前駆体部分の切断によって活性化されて活性の成熟ポリペプチドを生じる前駆タンパク質も含まれる。さらにバリエーションは以下のいずれであってもよい：(i) 1以上のアミノ酸残基が保存または非保存アミノ酸残基(好ましくは保存アミノ酸残基)によって置換されており、かかる置換されたアミノ酸残基は遺伝コードによってコードされるものでもそうでなくてもよいもの、または(ii) 1以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、または(iii) 成熟ポリペプチドが別の化合物、例えば、ポリペプチドの半減期を増加させる化合物(例えば、ポリエチレングリコール)と融合しているもの、または(iv) さらなるアミノ酸、例えば、リーダー配列または分泌配列あるいは成熟ポリペプチドの精製に利用される配列または前駆タンパク質配列が成熟ポリペプチドに融合しているもの。ポリペプチドのバリエーションは天然のバリエーション、例えば、天然の対立遺伝子バリエーションでもよいし

10

20

30

40

50

、天然に存在することが知られていないバリエーションであってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非天然バリエーションは突然変異誘発技術または直接合成によって作ることが出来る。バリエーションに含まれるのはまた、1以上の翻訳後修飾、例えばグリコシル化、リン酸化、メチル化、ADP リボシル化などを有するポリペプチドである。態様によっては、N-末端アミノ酸のメチル化、セリンおよびスレオニンのリン酸化、ならびにC-末端グリシン修飾が含まれる。この点に関するポリペプチドバリエーションは、上記ポリペプチドと、アミノ酸置換、欠失または付加によって異なるバリエーションである。置換、欠失または付加は1以上のアミノ酸によるものでもよい。アミノ酸配列の変化は保存的または非保存的アミノ酸置換、欠失または付加のいずれでもよい。上記すべてのバリエーションは本明細書の教示および技術常識から当業者の能力の範囲内で行われる。

10

## 【0137】

本明細書に記載する、LXR<sup>-64</sup> (配列番号4)と称されるLXR バリエーションは、従来既知のLXR と、DNA結合ドメインおよびリガンド結合ドメインを含む点で相同的である；しかし、配列の中央部分それが64の新規アミノ酸を含む点では既知のLXR と異なる。これらアミノ酸配列の部分的同一性と部分的相違により、バリエーションおよび既知のホモログは共通の機能も有するが、別の機能においては異なる。例えば、野生型LXR は細胞オキシステロールのセンサーであることが知られており、そのアゴニストによって活性化されると、ステロールおよび脂肪酸代謝/恒常性を制御する遺伝子発現が増加し、ここでLXR<sup>-L64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>は野生型LXR のドミナントネガティブな調節因子として機能する。

20

## 【0138】

用語「ドミナントネガティブなポリペプチド」はタンパク質の不活性バリエーションをいい、細胞機構と相互作用することにより、活性のタンパク質を、その細胞機構との相互作用から解離させるか、あるいは活性のタンパク質と競合して、活性のタンパク質の効果を低下させる。例えば、リガンドに結合するがリガンドの結合に応答したシグナルを伝達しないドミナントネガティブな受容体はリガンドの発現の生物学的効果を低下させることが出来る。同様に、正常に標的タンパク質と相互作用するが、標的タンパク質をリン酸化しないドミナントネガティブな触媒的に不活性のキナーゼは、細胞シグナルに応答した標的タンパク質のリン酸化を低下させることが出来る。同様に、遺伝子の制御領域におけるプロモーター部位に結合するが、遺伝子転写を増加させないドミナントネガティブな転写因子は転写を上昇させることなくプロモーター結合部位を占有することにより、正常の転写因子の効果を低下させることが出来る。

30

## 【0139】

用語「スプライスバリエーション」とは同じゲノムDNA配列から最初転写されたRNA分子から生じたcDNA分子であるが、異なる選択的RNAスプライシングを経たものである。選択的RNAスプライシングは一次RNA転写産物が、一般的にはイントロンの除去のためであるスプライシングを経た場合に生じ、その結果、それぞれ異なるアミノ酸配列をコードする2以上のmRNA分子の産生を導く。用語スプライスバリエーションは上記cDNA分子によってコードされるタンパク質もいう。スプライスバリエーションは既知の相同的遺伝子産物と配列において部分的に同一であり得る。「スプライスバリエーション」は、同一でない一次アミノ酸配列を有する複数のタンパク質であるが、少なくとも一つの共通のエキソンによってコードされるアミノ酸配列を共有するものをいう。

40

## 【0140】

本明細書において用いられる、用語「選択的スプライシング」およびその語学上の同等物は一つの遺伝子から複数のタンパク質アイソフォームの発現を導くあらゆるタイプのRNAプロセッシングを含む；したがって、用語「スプライスバリエーション」およびその語学上の同等物には、所与の遺伝子から転写されたmRNAであればいかにプロセッシングされたにしても複数のタンパク質アイソフォームをコードするかぎりすべて含まれる。例えば、例示にすぎないが、スプライスバリエーションは、エキソン挿入、エキソン伸長、エキソン切断、エキソン欠失、5'非翻訳領域(「5'UT」)におけるオルターナティブおよび3'非翻訳領

50

域 (「3' UT」)におけるオルターナティブを含みうる。かかる3' オルターナティブには、例えば、RNA 転写産物切断部位およびポリ(A)付加部位における相違が挙げられる (例えば、Gautheret et al., Genome Res. 8:524-530 (1998))。

【0141】

用語「単離」は、物質がその起源または天然の環境(例えば、物質が天然物であれば自然環境)から取り出されていることをいう。それゆえ、生きた動物において存在する天然のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドであってもヒトの手を介して天然の系に共存する物質のいくらかあるいはすべてから分離されたものは、単離されている。例えば、「単離核酸断片」は一本鎖または二本鎖の所望により合成、非天然または修飾ヌクレオチド塩基を含んでいてもよいRNAまたはDNAのポリマーである。DNAのポリマーの形態の単離核酸断片は1以上のcDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAセグメントから構成され得る。かかるポリヌクレオチドはベクターの一部に異種部位にて宿主細胞染色体に導入されたものあり得、および/または、かかるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは組成物の一部であり得、かかるベクターまたは組成物がそれが自然界でみられる環境の一部でない限り、単離されている。

【0142】

用語「精製」は完全な純粋を要求するものではない;むしろ、相対的な定義が意図される。出発物質または天然物質の少なくとも一桁、好ましくは2または3桁、より好ましくは4または5桁の精製が考慮される。同様に、用語「実質的に精製」とは、天然にその物質が存在する直接の化学的環境からヒトの手の介入によって分離されたかあるいは取り出されていることをいう。実質的に精製されたポリペプチドまたは核酸は、当該技術分野において一般的に知られている多数の技術および手法によって得るかあるいは作ることが出来る。

【0143】

用語「精製」はさらに本明細書において用いられる場合、その他の化合物、例えば以下を含むがそれらに限定されないものから分離された本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう:ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物または脂質。用語「精製」は、オリゴマー形態、例えば、ホモ二量体、ヘテロ二量体または三量体から本発明のモノマーポリペプチドの分離をいうのにも用いられる。用語「精製」は直鎖状ポリヌクレオチドから、共有結合により閉環した(即ち、環状)ポリヌクレオチドの分離を特定する場合にも用いられる。実質的に純粋なポリペプチドまたはポリヌクレオチドは典型的にはそれぞれポリペプチドまたはポリヌクレオチドサンプルの約50%、好ましくは60~90%重量/重量を構成し、通常は約95%、好ましくは約99%を超えて純粋であるが、50~100%の間のいずれのパーセントとして特定してもよい。ポリペプチドおよびポリヌクレオチド純度、または均一性は、当該技術分野において周知の多数の手段によって示され、例えば、サンプルのアガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動、次いでシングルバンドのゲルの染色による可視化が挙げられる。特定の目的のためには、より高い分離度がHPLCまたは当該技術分野において知られているその他の手段を用いて提供できる。別の態様において、本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドの精製は、異種ポリペプチドおよびポリヌクレオチド(DNA、RNAまたはそれら両方)に対する「少なくとも」パーセント純度として表してもよい。一つの態様において、本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドはそれぞれ異種ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに対して少なくとも;10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、96%、98%、99%、または100%純粋である。別の態様において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドはそれぞれ異種ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、あるいはキャリアに存在するもの以外のすべての化合物と分子に対して重量/重量比で表して、90%~100%の間の小数点以下3桁のいずれかの数の純度を有する(例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは少なくとも99.995%純粋である)。小数点以下3桁までのパーセント純度を表すいずれの数を、個別の純度として要求してもよい。

【0144】

10

20

30

40

50

タンパク質は、その純度が別の配列のタンパク質、非タンパク質化合物、例えば、核酸、脂質または生物学的細胞要素の存在に関して調整されてもよい純度で存在する場合、あるいは天然にはみられない組成物中、例えば、天然にはタンパク質を発現しない宿主細胞に存在する場合「単離」されているといわれる。

【0145】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは好ましくは、単離形態、好ましくは均一に精製された形態で提供される。

【0146】

用語「成熟」タンパク質とは、翻訳後プロセッシングされたポリペプチド；即ち、一次翻訳産物に存在するあらゆるプレまたはプロペプチドが除かれたものをいう。「前駆体」タンパク質はmRNAの一次翻訳産物；即ち、プレおよびプロペプチドが存在しているものをいう。プレおよびプロペプチドにはこれらに限定されないが細胞内局在化シグナルが含まれる。

【0147】

用語「抗体」とは、少なくとも一部が少なくとも一つの免疫グロブリン遺伝子またはその断片にコードされるポリペプチドであって、所望の標的分子に特異的に結合することができるものをいう。この用語には、天然の形態、ならびに断片および誘導体が含まれる。

【0148】

断片は、それが標的分子に対する特異的結合能力を維持している限り、様々なプロテアーゼでの消化によって生じたもの、化学的切断および/または化学的解離によって生じたもの、および組換え生産されたものを含む。かかる断片には、Fab、Fab'、Fv、F(ab)'<sub>2</sub>、および一本鎖 Fv (scFv) 断片が挙げられる。この用語の範囲に含まれる誘導体としては、配列が修飾されているが、標的分子への特異的結合能を維持している抗体（またはその断片）が挙げられ、さらに以下が挙げられる：種間キメラおよびヒト化抗体；抗体融合；ヘテロマー抗体複合体および抗体融合、例えば、二価抗体（二重特異的抗体）、一本鎖二価抗体、および細胞内抗体（例えば、Marasco (ed.)、Intracellular Antibodies: Research and Disease Applications、Springer-Verlag New York, Inc. (1998) (ISBN: 3540 641513)、その開示内容全体を引用により本明細書に含める）。

【0149】

用語「免疫反応性」とは、ポリペプチドが抗体と「免疫学的に反応性」の場合をいい、ポリペプチドに含まれる特異的エピトープの抗体認識により抗体に結合した場合をいう。免疫学的反応性は抗体結合により決定することができ、より具体的には抗体結合の動力学により、および/またはコンペティター、つまり、抗体が向けられたエピトープを含む既知のポリペプチドを用いた結合における競合により決定することができる。ポリペプチドが抗体と免疫学的に反応性であるかを決定する技術は当該技術分野において知られている。「免疫反応性」ポリペプチドはまた「免疫原性」でもある。

【0150】

抗体はいずれの公知技術によって作ってもよく、ネイティブな B リンパ球の細胞培養物からの回収、ハイブリドーマ培養物、組換え発現系およびファージディスプレイからの回収が挙げられる。

【0151】

分子は、免疫系の抗原認識分子、例えば、免疫グロブリン（抗体）またはT細胞抗原受容体と特異的に相互作用することが出来る場合、「抗原性」である。抗原性ポリペプチドは少なくとも約 5、好ましくは少なくとも約 10のアミノ酸を含む。分子の抗原性部分は、抗体またはT細胞受容体認識について免疫優性の部分であってもよいし、抗原性部分とキャリア分子を免疫化のために結合させることにより分子に対して作成した抗体の一部であってもよい。抗原性である分子はそれ自体免疫原性である必要はなく、即ち、キャリアなしで免疫応答を誘発する能力が有る必要はない。抗体と接触する抗原の部分は「エピトープ」と称される。

【0152】

10

20

30

40

50



用語「分子結合パートナー」、そしてそれと同等の「特異的結合パートナー」とは、分子のペア、典型的には生物分子のペアであって、特異的結合を示すものである。限定的でない例としては、受容体とリガンド、抗体と抗原、およびビオチンとアビジン、ストレプトアビジン、NeutrAvidin(商標)およびCapt Avidin(商標)が挙げられる。

【0153】

用語「結合パートナー」または「相互作用タンパク質」とは、特定の分子または分子複合体を特異的に認識することが出来るか、あるいはそれらによって認識されることが出来る分子または分子複合体、例えば、抗原と抗原特異的抗体または酵素とその阻害剤である。結合パートナーには、例えば、ビオチンとアビジンまたはストレプトアビジン、IgGとタンパク質 A、受容体-リガンド結合、タンパク質-タンパク質 相互作用、および相補的ポリヌクレオチド鎖が挙げられる。用語「結合パートナー」は細胞におけるポリペプチドに結合するポリペプチド、脂質、低分子または核酸のこともいう。タンパク質と結合パートナーとの相互作用の変化は、相互作用の形成確率の増減または、タンパク質-結合パートナー複合体の濃度の増減としてそれ自体で現れうる。例えば、LXR<sup>-64</sup> または LXR<sup>-42</sup> タンパク質は別のタンパク質またはポリペプチドと結合し、複合体を形成することが出来、それによってLXRまたはRXR 活性の調節が起こる。

10

【0154】

「特異的結合」とは、不均一(不均質)サンプルに同時に存在する2つの分子種の、サンプル中の別の分子種に対する結合に優先して互いに結合する能力をいう。典型的には、特異的結合相互作用は、反応における不定の結合相互作用を少なくとも2倍、より典型的には少なくとも10倍、しばしば少なくとも100倍、超えて識別する;分析物の検出に用いる場合、特異的結合は不均一(不均質)サンプルにおける分析物の存在を決定する場合に十分に識別力がある。

20

【0155】

用語「二量体」とは、2つのタンパク質ポリペプチドが共有結合または非共有結合相互作用によって結合する特定の多量体分子をいう。「二量体分子」は、2つの同一の(ホモ二量体)または異なる(ヘテロ二量体)タンパク質分子サブユニットから構成される受容体でありうる。

【0156】

用語「ホモ二量体」とは、2つのサブユニット構成物が実質的に同一である二量体分子をいい、例えば、RXRとRXRとの二量体が挙げられる。「ホモ二量体複合体」とは、2つの同一の受容体間のタンパク質複合体(例えば、RXR/RXR)をいう。「ホモ二量体複合体」はa、組換えタンパク質の産生またはプロセッシングにおいて偶発的に生じるわずかな微小不均一性を有する二量体タンパク質を含む。用語「ホモ二量体化」とは、2つの同一のサブユニット(例えば、RXRとRXR)とが二量体化する工程をいう。

30

【0157】

用語「ヘテロ二量体」とは、2つのサブユニット構成物が異なる二量体分子、例えばRXRとLXRとの二量体分子をいう。用語「ヘテロ二量体複合体」とは核内受容体間のあらゆるタンパク質複合体をいう(例えば、RXRと、本発明のバリエーションのいずれか、またはRXRとLXR、LXR、PPAR、PPAR、PPAR、RAR、XR、またはPXR)。用語「ヘテロ二量体化」とは、2つの異なるサブユニット(例えば、RXRとLXR<sup>-64</sup>)の二量体化工程をいう。

40

【0158】

用語「自然にヘテロ二量体化する」とは、分子(例えば、ポリペプチド)が天然で異なる分子と通常ヘテロ二量体化する工程をいう。例えば、自然にRXRとヘテロ二量体化するポリペプチドは、天然にはRXRと通常ヘテロ二量体化する核内受容体であり、例えば、LXR、LXR、PPAR、PPAR、PPAR、RAR、XR、およびPXRが挙げられる。

【0159】

用語「LXR 応答性経路」とは核内受容体(例えば、LXRまたはRXR)の活性化または不活性化を伴い、少なくとも部分的にLXRに媒介される当該技術分野において知られている経路のいずれかをいう。

50

## 【0160】

用語「シグナル伝達経路」とは、細胞外シグナルを細胞膜を介して増幅して細胞内シグナルとする分子をいう。このシグナルはしたがって細胞応答を刺激しうる。シグナル伝達工程に参与するポリペプチド分子は受容体であっても非受容体タンパク質であってもよい。

## 【0161】

用語「受容体」とは、一般的に、特定の物質との選択的結合によって特徴づけられる細胞内または細胞表面の分子構造をいう。受容体の例としては、ペプチドホルモン、神経伝達物質、抗原、相補鎖断片および免疫グロブリンの細胞表面受容体、ならびにステロイドホルモンの細胞質内受容体が挙げられる。

10

## 【0162】

用語「調節」とは、生物学的活性または工程の機能的特性、例えば、受容体結合またはシグナル伝達活性の促進または阻害能力をいう。かかる促進または阻害は特定の事象の発生による偶発的なものであってもよく（例えば、シグナル伝達経路の活性化）、および/または、特定の細胞タイプにのみ現れるものであってもよい。タンパク質の「調節因子」とは、広範な分子（例えば、抗体、核酸断片、低分子、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質）をいい、および/または、直接的または間接的に、タンパク質（例えば、目的の受容体）の活性化および/または抑制に影響を及ぼしうる条件をいい、例えば、タンパク質への物理的結合、タンパク質発現の量または質の変化、タンパク質の測定可能または検出可能活性、性質、または挙動の変化、あるいはタンパク質または化合物との何らかの相互作用が挙げられる。

20

## 【0163】

用語「阻害」とは、減少、抑制、軽減、妨害、低減または排除の作用をいい、機能または活性が部分的であるか全体的であるかを問わない。例えば、遺伝子転写または発現の阻害とは、これら機能のあらゆるレベルの下方制御をいい、これら機能の完全な排除も含まれる。用語「阻害」はインビトロおよびインビボ系の両方に適用できる。本明細書において用いられる、用語「阻害剤」または「抑制剤」とは、阻害するあらゆる薬剤をいう。

## 【0164】

用語「低分子」とは、合成または天然の化学的化合物をいい、例えば所望により誘導体化されていてもよいペプチドまたはオリゴヌクレオチド、天然物またはその他のあらゆる低分子量（典型的には約5KD未満）の天然または合成起源のいずれであってもよい有機、生物無機または無機化合物をいう。かかる低分子は、治療上送達可能な物質であってもよいし、送達を促進するためにさらに誘導体化されたものでもよい。

30

## 【0165】

用語「誘導物質」とは特定の活性、例えば、脂質代謝、またはLXR分子発現を誘導、促進、推進または上昇させるあらゆる薬剤をいう。

## 【0166】

用語「薬剤」または「被験薬剤」または「被験サンプル」とは、試験すべきあらゆる分子または2以上の分子の組み合わせをいう。

## 【0167】

本発明の薬剤の例にはこれらに限定されないが以下が含まれる：ペプチド、タンパク質、低分子および抗体。ヌクレオチド断片および部分、上記のアンチセンス態様も、所望により薬剤として機能しうる。薬剤はランダムに選択されたものでもよいし、合理的に選択または設計されたものでもよい。本明細書において用いられる薬剤は、薬剤と標的化合物または部位との特異的相互作用を考慮せずにランダムに選択された場合、「ランダムに選択された」といわれる。本明細書において用いられる薬剤は、薬剤と標的化合物または部位との特異的相互作用および/または薬剤の作用に関する立体配置を考慮して非ランダムに選択された場合、「合理的に選択または設計された」といわれる。

40

## 【0168】

用語「生物サンプル」はあらゆる細胞、組織、生物学的液体、器官、多細胞生物などを

50

含むよう広く定義される。生物サンプルは、例えば、細胞またはインビトロ組織培養物由来であってよい。あるいは、生物サンプルは生体または単細胞生物の集団由来であってもよい。生物サンプルは生きた組織、例えば、肝臓であってもよい。用語「生物サンプル」はまた、例えば、対象から単離された細胞、組織または生物学的液体由来のサンプルを含み、そして、対象に存在するサンプルも含む。即ち、本発明の検出方法はLXRバリエーション mRNA、タンパク質、ゲノムDNA、または生物サンプル中のインビトロおよびインビボ活性の検出に利用できる。例えば、LXRバリエーション mRNA検出のためのインビトロ技術としては、TaqMan 分析、ノザンハイブリダイゼーション、およびインサイチュハイブリダイゼーションが含まれる。LXR タンパク質検出のためのインビトロ技術には、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光が含まれる。LXRバリエーション ゲノムDNA検出のためのインビトロ技術にはサザンハイブリダイゼーションが含まれる。

10

**【0169】**

用語「被験サンプル」とは、目的の対象からの生物サンプルをいう。例えば、被験サンプルは細胞サンプルまたは組織サンプルであってよい。「被験サンプル」および「生物サンプル」は本明細書において互換的に用いられる。

**【0170】**

用語「体液」とは限定されないが以下を含むあらゆる体液をいう：血清、血漿、リンパ液、滑液、卵胞液、精液、羊水、乳汁、全血、汗、尿、脳脊髄液、唾液、痰、涙、蒸泄液、粘液、組織培養培地、組織抽出液、および細胞抽出液。体液の語は体液の画分および希釈物にも適用される。体液の源は、人体、動物体、実験動物、植物、またはその他の生物のいずれでもよい。

20

**【0171】**

用語「治療」、「治療する」および「療法」は、ヒトを含む対象が、対象の症状を改善する目的で、直接的または間接的に医療扶助を提供されること、または対象における症状または障害の進行を遅延させるための、あらゆる工程、作用、適用、療法などをいう。

**【0172】**

さらに、用語「治療」は対象または対象由来の単離組織または細胞株に、薬剤(例えば、治療薬または治療用組成物)を適用または投与することとして定義され、ここで対象は疾患、疾患の徴候または疾患への素因を有する者であり、ここで投与は疾患、疾患の症状または疾患への素因を治療、治癒、軽減、緩和、変化、回復、軽減、改善または影響を与える。本明細書において用いられる、「治療薬」とは疾患の治療を助ける物質または物質の組み合わせをいう。したがって、治療薬にはこれらに限定されないが、低分子、ペプチド、抗体、リボザイムおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。

30

**【0173】**

治療薬または治療用組成物は特定の疾患の症状を予防および/または軽減する医薬上許容される形態である化合物も含む。例えば、治療用組成物は脂質代謝障害の症状を予防および/または軽減する医薬組成物であってよい。本発明の治療用組成物はいずれの好適な形態で提供してもよいと考えられる。治療用組成物の形態は多数の因子に依存し、かかる因子としては、投与態様が挙げられる。治療用組成物はその他の成分のなかでも、希釈剤、アジュバントおよび賦形剤を含んでいてもよい。

40

**【0174】**

用語「治療上有効量」とは疾患の治療のために対象に投与された場合、かかる疾患の治療に十分有効な化合物または化合物の組成物の量を言う。「治療上有効量」は当該技術分野において公知のパラメーターによって変動し得、例えば、化合物、疾患、疾患の重篤度、および治療される哺乳類の年齢、体重または性別に依存する。

**【0175】**

用語「対象」とはあらゆる哺乳類をいい、ヒト、または非ヒト対象を含む。非ヒト対象としては、実験動物、試験動物、家畜、ペットまたはコンパニオン・アニマルが含まれる。

50

## 【0176】

本発明は分子細胞生物学技術分野において既知の方法および技術を引用により含める。かかる技術にはこれらに限定されないが以下の刊行物記載の技術が含まれる：Old, R. W. & S. B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4)、Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6); Miller, J. H. & M. P. Calos eds., Gene Transfer Vector For Mammalian Cells (1987) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (ISBN 0-87969-198-0)。本発明のタンパク質をコードするDNAは本発明の上記タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む限りいずれのものでもよい。 10

## 【0177】

核酸分子

本発明は、3つの新規 LXR バリエーションタンパク質 (即ち、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>)をコードする単離核酸分子に関する。LXR バリエーションタンパク質またはその断片に対して少なくとも90%配列同一性を有する核酸分子、LXR バリエーションの縮重バリエーション、保存的または中程度の保存的置換を有し、交差ハイブリダイズする核酸を有する (例えば、高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする) LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> タンパク質をコードするバリエーション、およびその断片も含まれる。 20

## 【0178】

本発明の配列をそれぞれ以下に表す：配列番号3 (LXR<sup>-64</sup>の全長ヌクレオチド配列、cDNA)、配列番号4 (LXR<sup>-64</sup>の全長アミノ酸配列)、配列番号5 (LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>のすべてをコードするヌクレオチド配列)、配列番号6 (LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>全長アミノ酸配列)、配列番号7 (LXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>のすべてをコードするヌクレオチド配列)、配列番号8 (LXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>全長アミノ酸配列)、配列番号16 (野生型LXR のエキソン6と7とが連結しており、野生型LXR のエキソン6と比較してLXR<sup>-64</sup> バリエーションにおいてより大きいエキソン6を生じるLXR<sup>-64</sup> バリエーションの特有のヌクレオチド配列)、配列番号17 (配列番号16にコードされる推定アミノ酸配列)、配列番号18 (野生型LXR のエキソン8を組合わせて野生型LXR のエキソン8と比較してLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> バリエーションにおいてより長いエキソン8を生じるLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>の特有のヌクレオチド配列)、および配列番号19 (配列番号18にコードされる推定アミノ酸配列)。 30

## 【0179】

本発明の核酸はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)によって作ることが出来る。かかる反応は当業者に知られている (米国特許第4754065; 4800159; 4683195および4683202号はPCR技術と方法を提供し、これら米国特許はその内容全体を引用により本明細書に含める)。

## 【0180】

本発明の別の態様において、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup> またはLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> 核酸分子は合成核酸または核酸疑似体であって、天然の LXR バリエーションと比較して、バイオアベイラビリティ、安定性、作用強度が上昇するか、あるいは毒性が低下しているものでもよい。かかる合成核酸は、核酸の効果を変化させるヌクレオチドポリマーを作る基本的A、T、C、G、またはU塩基あるいは糖の変化を伴っていてもよい。 40

## 【0181】

本明細書に記載するLXR バリエーションおよびLXR バリエーション由来の核酸断片は、単離手法、診断アッセイおよび法医学手法における試薬として利用できる。例えば、本明細書に記載するLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup> またはLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> ポリヌクレオチドからの配列であってそれらに (例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で)ハイブリダイズすることができる配列を検出可能に標識し、プローブとして別の配列の単離に利用することができる。さらに、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、またはLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> ポリヌクレオチドからの配列は、単離、診断または法医学手法に使用するためのPCRプライマーの設計に利用できる。

## 【0182】

本明細書に記載する、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> 核酸分子は、対応するゲノムDNA上のLXR パリアント配列の上流に位置する配列のクローニングに用いることが出来る。かかる上流配列は遺伝子発現を調節することが可能であり得、例えば、プロモーター配列、エンハンサー 配列、またはその他の転写または翻訳レベルに影響を与える上流配列を含みうる。いったん同定され、クローニングされたら、それら上流調節配列は、所望の空間的、時間的、発達段階的、または量的態様で挿入された遺伝子の発現を駆動するよう設計された発現ベクターにおいて使用することができる。

## 【0183】

本明細書に記載するポリヌクレオチド由来の配列は、染色体歩行技術を用いて対応する遺伝子のプロモーターを単離するのに用いることが出来る。染色体歩行技術は当該技術分野において知られており、例えば、BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA)から入手可能なGenomeWalker (登録商標) キットが挙げられ、これは製造業者の指示にしたがって用いることが出来る。

## 【0184】

いったん上流ゲノム配列がクローニングおよび配列決定されると、上流配列中の予測されるプロモーターおよび転写開始部位を、既知の転写開始部位、転写因子結合部位またはプロモーター配列を含むデータベースを用いて本発明のポリヌクレオチドの上流配列と比較することによって同定することが出来る。

## 【0185】

さらに、上流配列におけるプロモーターは以下のようにプロモーターレポーターベクターを用いて同定することも出来る:レポーター遺伝子の発現は、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、またはLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> 遺伝子の第一エキソンの上流に位置する、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup> およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> プロモーター領域の調節活性のあるポリヌクレオチド断片またはパリアントの制御下におかれたときに検出される。好適なプロモーターレポーターベクターはその中にLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、またはLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> プロモーター配列がクローニングされている。例えば、pSEAP-Basic、pSEAP-エンハンサー、p gal- Basic、p gal-エンハンサー、またはpEGFP-1 プロモーターレポーターベクターがClontechから入手可能であり、またはpGL2-basicまたはpGL3-basic プロモーターレスルシフェラーゼレポーター遺伝子ベクターはPromegaから入手可能である。簡単に説明すると、これらプロモーターレポーターベクターのそれぞれは、迅速にアッセイ可能なタンパク質(例えば、分泌アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、または緑色蛍光タンパク質)をコードするレポーター遺伝子上流に位置するマルチクローニングサイトを含む。LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、またはLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> コード領域の上流の配列はレポーター遺伝子上流のクローニングサイトに両方の方向で挿入され、適当な宿主細胞に導入される。レポータータンパク質のレベルがアッセイされ、クローニングサイト中にインサートを含まないベクターからのレベルと比較される。インサートを含むベクターによる対照ベクターと比較した発現レベルの上昇の存在は、インサートにおけるプロモーターの存在を示す。ある場合において、上流配列は、弱いプロモーター配列からの転写レベルを上昇させるためのエンハンサーを含むベクターにクローニングされる。インサート非含有ベクターのものよりも高い、インサート含有ベクターによる発現の顕著なレベルは、挿入された上流配列にプロモーター配列が存在することを示す。上流ゲノムDNAにおけるプロモーター配列はさらに部位特異的突然変異誘発、リンカー・スキニング分析、またはその他の当業者に周知の技術によってさらに規定されうる。

## 【0186】

各LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup> およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> 遺伝子のプロモーターの強度および特異性は、様々なタイプの細胞および組織においてLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、またはLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> プロモーターに作動可能に連結した検出可能なポリヌクレオチドの発現レベルを介して評価することが出来る。検出可能なポリヌクレオチドは、あらかじめ規定されたオリゴヌクレオチドプローブ、または検出可能なタンパク質(LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup> およびLXR<sup>-4</sup>

10

20

30

40

50

2e<sup>-</sup> ポリペプチドまたはその断片またはバリエーションを含む)をコードするポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドのいずれでもよい。このタイプのアクセシビリティは当業者に周知である。いくつかの方法を本明細書においてより詳細に説明する。

【0187】

プロモーターおよび本発明のポリヌクレオチドの上流に位置するその他の調節配列を用いて、所望の空間的、時間的、発達段階的、または量的態様で挿入された遺伝子の発現を駆動することが出来る発現ベクターを設計することが出来る。所望の空間的、時間的、発達段階的、および量的パターンを導くことが出来るプロモーターは本明細書に記載する発現分析の結果を用いて選択すればよい。例えば、筋肉における高レベルの発現を与えるプロモーターが所望の場合は、筋肉において高レベルに発現するmRNA由来の本発明のポリヌクレオチドの上流のプロモーター配列を発現ベクターに用いればよい。

10

【0188】

さらに、本発明の核酸断片は当業者に周知の方法(この節に記載のハイブリダイゼーションまたは増幅に基づく技術を含む)のいずれかを用いて類似の核酸を単離および/または精製するのに用いることが出来る。これら方法を用いてLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup> およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> cDNAの起源であるmRNAをコードするゲノムDNA、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup> およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> cDNAに対応するmRNA、またはLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup> およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> cDNAs またはその断片に相同的な核酸、例えば、バリエーション、種ホモログまたはオルソログをコードする核酸を得ることが出来る。

【0189】

あるいは本発明の核酸断片および遺伝子は受容体に関連する機能が低下した対象(例えば、哺乳類、ヒト、患者)の同定のための参照として用いることが出来る。

20

【0190】

ベクターおよび宿主細胞

本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクター(例えば、クローニングベクターまたは発現ベクター)によって遺伝子操作された宿主細胞に関し、また、組換え技術による本発明のポリペプチドの産生に関する。例えば、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup> およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup> 核酸分子をベクターに連結させてもよい。ベクターは、自己複製型ベクターであっても複製不能ベクターであってもよい。ベクターは遺伝子治療の方法のためには医薬上許容されるベクターであり得る。

30

【0191】

本発明はさらに、好適な宿主にて本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現させ、発現産物を既知の組換え技術によって回収することによる本発明のポリペプチドの産生方法にも関する。本発明のポリペプチドはペプチド合成機を用いて合成することも出来る。宿主細胞は本発明のベクターによって操作すればよい。宿主生物(組換え宿主細胞)はいずれの真核または原核細胞、あるいは多細胞生物であってもよい。別の態様では、哺乳類またはヒト細胞を用いることが出来る。特に胚性哺乳類およびヒト細胞である。好適な宿主細胞にはこれらに限定されないが以下が含まれる: 哺乳類細胞、例えば、ヒト胎児由来腎臓細胞(HEK 293)、ヒト肝臓癌細胞(HepG2)、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、サル COS-1細胞株、哺乳類細胞(CV-1)、両生類細胞(例えば、アフリカツメガエル卵細胞)、酵母細胞(出芽酵母、分裂酵母、ピチア・パストリス)、および昆虫細胞。さらに、大腸菌の様々な株(例えば、DH5<sup>+</sup>、HB101、MC1061)も宿主細胞として、特に分子生物学的操作のために用いることが出来る。

40

【0192】

ベクターはクローニングベクターであっても発現ベクターであってもよく、例えば、プラスミド、コスミド、またはファージの形態またはその他の宿主細胞において複製および生存可能なあらゆるベクターであってもよい。操作された宿主細胞はプロモーターの活性化、形質転換体の選択または本発明のポリヌクレオチドの増幅に適当なように改変した常套の栄養培地で培養すればよい。培養条件、例えば、pH、温度などはポリヌクレオチドの発現に選択した宿主細胞に用いるのに好適なものとし、それらは当業者に知られている。

50

## 【0193】

プラスミドは一般に本明細書において小文字「p」で始まり、および/または、その後は大文字および/または数で表すが、これは当業者に周知の常套の標準的命名法にしたがったものである。本明細書においてプラスミドは市販のもの、民間ベースの公共のものであってもよいし、周知の確立された手法をルーチンの適用することによって入手可能なプラスミドから構築したものでよい。さらに、本発明に用いることが出来る多くのプラスミドおよびその他のクローニングおよび発現ベクターは周知であり、当業者に容易に入手可能である。さらに、当業者であれば本発明に好適な多数のその他のプラスミドを容易に構築することが出来よう。本発明においてかかるプラスミドの性質、構築および使用はその他のベクターと同様に、本開示から当業者に明白であろう。

10

## 【0194】

適当な DNA 配列は当該技術分野において知られている様々な手法によってベクターに挿入することができる。

## 【0195】

発現ベクター中のDNA配列はmRNA合成の駆動に適当な発現制御配列(プロモーター)に作動可能に連結すればよい。かかるプロモーターにはこれらに限定されないが以下が含まれる:SV40、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(例えば、pCMV/mycベクター、pcDNA 3.1ベクターまたはpcDNAシリーズのその他のもの)、SP6、T7、およびT3 RNAポリメラーゼプロモーター。発現ベクターは翻訳開始のためのリボゾーム結合部位、転写ターミネーター、および発現の増幅に適当な配列を含んでいてよい。発現ベクターはさらに、形質転換された宿主細胞の選択のために特定の表現型を提供する1以上の選択可能マーカー遺伝子を含んでいてもよく、例えば、真核細胞にはネオマイシン耐性、大腸菌にはアンピシリン耐性が挙げられる。

20

## 【0196】

発現ベクターは少なくとも一つの選択可能マーカーを含んでいてもよい。かかるマーカーにはこれらに限定されないが以下が含まれる:真核細胞培養には、ジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性、大腸菌およびその他の細菌培養には、テトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子。適当な宿主の代表例にはこれらに限定されないが以下が含まれる:細菌細胞、例えば、大腸菌、ストレプトマイセス、およびネズミチフス菌細胞;真菌細胞、例えば、酵母細胞;昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエS2およびシロイチモンジヨトウ(Spodoptera) Sf9細胞;動物細胞、例えば、CHO、Cos、およびBowes黒色腫細胞;および植物細胞。上記宿主細胞に適当な培地および条件は当該技術分野において知られている。

30

## 【0197】

細菌に使用するベクターの例としてはこれらに限定されないが以下が含まれる:pA2、pQE70、pQE60およびpQE-9、Qiagen (Valencia, CA); pBSベクター、Phaegescryptベクター、Bluescript(商標)ベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、Stratagene (Cedar Creek, TX); およびpGEMEX(登録商標)-1、pGEMEX(登録商標)-2、PinPoint(商標)Xシリーズ、pET-5シリーズ、Promega (Madison, WI)。真核ベクターにはこれらに限定されないが以下が含まれる:pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、およびpSG、Stratagene;そしてpSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVL、Pharmacia。その他の好適なベクターは当業者に明白である。

40

## 【0198】

遺伝子は、プロモーター、リボゾーム結合部位(細菌発現のため)、好適な遺伝子制御配列または調節配列の制御下に置き、タンパク質をコードするDNA配列が発現コンストラクトを含むベクターにより形質転換された宿主細胞中でRNAが転写されるようにすればよい。かかるプロモーターにはこれらに限定されないが以下が含まれる:SV40、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(例えば、pCMV/mycベクター、pcDNA 3.1ベクターまたはpcDNAシリーズのその他の形態)、SP6、T7、およびT3 RNAポリメラーゼプロモーター。ある場合において、宿主細胞からのポリペプチドの分泌を起こす配列を付加し、分

50

泌シグナルが後で切断されるようにするのが望ましい。

【0199】

用途によっては、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を低下または排除することが望ましい。これを達成するために、本発明のポリペプチドの共抑制のために設計されたキメラ遺伝子またはキメラコンストラクトを、ポリペプチドをコードする遺伝子または遺伝子断片をプロモーター配列に連結させることによって構築してもよい。あるいは、本発明の核酸断片の全部または一部に対するアンチセンス RNAを発現するよう設計されたキメラ遺伝子またはキメラコンストラクトを遺伝子または遺伝子断片をプロモーター配列と逆方向に連結することによって構築してもよい。共抑制またはアンチセンスキメラ遺伝子はいずれも形質転換によって所望の宿主細胞に導入することが出来、対応する内在遺伝子の発現が低下または排除される。

10

【0200】

ポリペプチド

LXR バリエーションポリペプチドは様々な用途に有用であり、これらに限定されないが以下が含まれる：抗体の産生(例えば、LXR バリエーションに特異的に結合する抗体)、LXR 野生型活性の調節および脂肪酸およびコレステロール代謝の改変(例えば、LXR バリエーションが発現する細胞における脂肪酸およびコレステロール代謝を制御する酵素の遺伝子発現の調節による)。LXR バリエーションポリペプチドはLXR 野生型ポリペプチドおよびLXR バリエーションポリペプチドに示差的に結合する化合物の同定にも有用である。かかる化合物はLXR に関係する代謝活性を示差的に調節する候補化合物である。

20

【0201】

本発明のポリペプチドは目的のポリペプチドが発現する条件下で上記の発現ベクターにより形質転換された好適な宿主細胞の培養によって産生できる。ポリペプチドはこうして単離、精製することができる。細胞培養からのタンパク質精製方法は当該技術分野において知られており、これらに限定されないが以下が含まれる：硫酸アンモニウム沈降、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、および親和性クロマトグラフィー。

【0202】

無細胞翻訳系は本発明のポリヌクレオチド由来のRNAを用いて本発明のポリペプチドを産生するのに利用することが出来る。

【0203】

本発明のポリペプチドは、(例えば、本明細書に記載するように)目的のポリペプチドが発現する条件下で発現ベクターによって形質転換された好適な宿主細胞の培養によって産生できる。ポリペプチドは次いで単離、精製することができる。細胞培養からのタンパク質の精製方法は当該技術分野において知られており、これらに限定されないが以下が含まれる：硫酸アンモニウム沈降、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、および親和性クロマトグラフィー。

30

【0204】

無細胞翻訳系を本発明のポリヌクレオチド由来のRNAを用いて本発明のポリペプチドの産生に利用してもよい。

【0205】

クローニングしたLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>のラージスケール産生により、多数のLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>アナログのスクリーニングが可能となり、脂質代謝障害の治療のための新規または改良されたアゴニストおよびアンタゴニストの開発が促進されうる。より具体的には、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>活性の多数のアナログのスクリーニングにより、脂質代謝に影響する改良された薬剤の開発が導かれうる。脂質代謝障害および症状にはこれらに限定されないが以下が含まれる：アテローム性動脈硬化症、糖尿病、肥満、アルツハイマー病、炎症性障害、および高コレステロール血症。

40

【0206】

いくらかの用途では、本明細書に記載するポリペプチドを様々な細胞区画に向かわせる

50



、あるいは細胞からのポリペプチドの分泌を促進するのが有用である。上記のキメラ遺伝子は、適当な細胞内標的配列、例えば、輸送配列の付加および/または既に除かれた配列の標的化によって本発明のポリペプチドをコードするコード配列を変化させることによってさらに増強しうると考えられる。

#### 【0207】

さらに、本発明のポリペプチドまたはそれらを発現する細胞は、当業者に公知の方法を用いて抗体を調製するための免疫原として利用できる。例えば、配列番号3、5、または7によってコードされるポリペプチドまたはその断片および/または配列番号16または18にコードされるポリペプチドまたは上記ポリペプチドを発現する細胞は免疫原として利用できる。特定の使用は、野生型LXRには存在しないLXR<sup>-64</sup>の新規な64アミノ酸に対する抗体である。該抗体はポリクローナルであってもモノクローナルであってもよく、キメラ、一本鎖、およびFab断片またはFab発現ライブラリーの産物を含みうる。該抗体は細胞中でインサイチュで、または細胞抽出液中でインビトロで本発明のポリペプチドを検出するのに有用である。

10

#### 【0208】

さらに、本発明のポリペプチドは薬剤として有用な化合物(例えば、候補化合物)の設計および/または同定を促進するための標的として利用できる。特に、これら化合物は、経路、例えば、胆汁酸合成経路の変化、血漿リポタンパク質組成の制御、コレステロールの末梢組織から肝臓への輸送、細胞増殖の調節、分化、およびアポトーシスの調節に起因する疾患の治療に有用であり得る。さらに、本発明のポリペプチドはさらなる標的(例えば、共活性化因子または共抑制因子タンパク質)であってLXRに影響を与えうるものの同定にも利用できる。本発明のLXRバリエーションの様々な用途としては、これらに限定されないが以下が含まれる：病態生理学的イソプレノイド合成経路、コレステロール代謝、コレステロール異化、胆汁酸合成、および細胞分化の治療的調節(例えば、遺伝子送達アプローチ、遺伝子サイレンシングアプローチ、タンパク質医薬、抗体医薬)、診断上の用途、医薬標的、受容体に基づくアゴニストまたはアンタゴニストの同定および、LXR作用の分子機構の研究。

20

#### 【0209】

さらに、本発明の内在性ドミナントネガティブLXRバリエーションの細胞における表現型発現、遺伝子サイレンシングアプローチ、例えば、アンチセンス、siRNA(低分子干渉RNA)によるLXR活性低下は、LXR活性の誘導または刺激の戦略として利用することが出来る。さらに、本発明の新規バリエーションをLXRバリエーションとの融合に用いてもよく、それは受容体に基づくアゴニストおよびアンタゴニストの開発に使用され得る。

30

#### 【0210】

さらに、本発明の新規配列、例えば、配列番号16および配列番号18を用いて、野生型LXRのドミナントネガティブな調節因子を作ることが出来る。配列番号16または18の核酸分子またはその断片は、既存のバリエーション、例えば、LXR、および/またはその他の核内受容体のいずれかに組み込むことが出来る。結果として得られる配列番号16および18にコードされるアミノ酸配列を含む新規ポリペプチドまたはその断片(例えば、配列番号17および19に示す配列)は、野生型LXRのドミナントネガティブな調節因子を作り出すことが出来る。

40

#### 【0211】

LXRおよび特にLXRがコレステロール代謝および脂肪酸生合成を微妙にバランスすることの重要性により、胆汁酸およびコレステロール代謝に関する障害の治療のための治療薬または診断薬として有用なLXRの調節因子の開発が導かれた。本発明の新規ドミナントネガティブLXRバリエーションは、かかる治療薬または診断薬の開発に利用できる。したがって、本発明の一つの態様は対象におけるLXR(例えば、LXR)の異常または望ましくないレベルの発現を特徴とする症状の治療方法である。該方法は、治療上有効量のLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、またはLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>タンパク質、相同的タンパク質、または望ましい活性、例えば、LXRバリエーション活性の阻害能力を有するLXRバリエーションタンパク質の断片

50

またはそれらの組み合わせであって、LXR 活性を調節できるものを対象に提供することを含む。該タンパク質は、対象のLXR -担持細胞に、LXR -64、LXR -42e<sup>+</sup>、またはLXR -42e<sup>-</sup> タンパク質、相同的タンパク質、または断片、あるいはそれらの組み合わせをコードする核酸配列を、細胞がLXR -64、LXR -42e<sup>+</sup>、またはLXR -42e<sup>-</sup> タンパク質、相同的タンパク質、またはその断片を発現し、野生型LXR 受容体および/またはその他のXRとヘテロ二量体化する核内受容体の調節を導く条件下で導入することによって提供することが出来る。かかる受容体の例にはこれらに限定されないがLXR 、LXR 、PPAR 、PPAR 、RAR、XR、およびPXRが含まれる。

#### 【0212】

対象の細胞へのLXR バリエーション核酸の導入は以下を含みうる：a) 対象への移植に好適な対象の細胞または培養細胞または組織に、エキソピボで核酸配列を細胞(例えば、培養幹細胞株、骨髄細胞、臍帯血細胞)に挿入する処理；および b) 工程a)からの細胞を対象に導入する工程(例えば、米国特許第6068836 および5506674号)。

#### 【0213】

対象は動物であればよく、例えば、哺乳類(例えば、マウス、ラット、非ヒト霊長類、イヌ、ヤギまたはヒツジ)であってよい。哺乳類対象はヒトであってよい。

#### 【0214】

LXRはレチノイドX受容体(RXR)とのヘテロ二量体として機能する。さらに、RXRはホモ二量体受容体およびヘテロ二量体パートナー(例えば、LXR 、LXR 、PPAR 、PPAR 、PPAR 、RAR、XR、およびPXR (Miyata et al., J. Biol. Chem., 271 9189-9192, 1996))の両方として複数のホルモン応答性経路において機能する能力において特有である。本発明のLXRバリエーション、LXR64、LXR -42e<sup>+</sup>、およびLXR -42e<sup>-</sup>はRXRとヘテロ二量体化することができる。したがって、例えば、LXR64、LXR -42e<sup>+</sup>、および/またはLXR -42e<sup>-</sup> バリエーションが翻訳される場合、RXRはLXR 、LXR 、PPAR 、PPAR 、PPAR 、RAR、XR、および/またはPXRとヘテロ二量体化するか、またはそれ自体(RXR)とホモ二量体化するよりもむしろ、これらバリエーションとヘテロ二量体化する。このことは、特定の核内受容体とのヘテロ二量体化および/またはホモ二量体化に利用可能なRXRのプールを低減させる。

#### 【0215】

それゆえ、ドミナントネガティブバリエーションとして、本発明の新規 LXR -64、LXR -42e<sup>+</sup>、およびLXR -42e<sup>-</sup>は特定の受容体、例えば、LXR 、LXR 、PPAR 、PPAR 、PPAR 、RAR、XR、またはPXRの標的化に用いることが出来る。したがって、本発明のドミナントネガティブLXR バリエーションは病態生理学的症状の治療的調節、診断、疾患発生のリスク、または様々な疾患状態の治療における有用性を提供し、ここで、RXR、LXR、またはその他の核内受容体(例えば、LXR 、LXR 、PPAR 、PPAR 、PPAR 、RAR、PXR、XR)は病態生理学的症状または疾患に関連する工程を媒介するものである。かかる疾患の例は、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、肥満、癌、および薬剤代謝障害である。

#### 【0216】

さらに、本発明のLXR バリエーションは野生型LXR 結合パートナー、例えば、RXRとの相互作用により標的遺伝子発現または標的遺伝子産物活性を調節することができる。本明細書において用いられるLXRまたはRXR 活性とは、それぞれLXR (例えば、LXR )またはRXR 標的遺伝子発現または活性の調節をいう。

#### 【0217】

一つの態様において、RXR-含有細胞の標的遺伝子特異性は、細胞と少なくとも一つの本発明の新規 LXR バリエーションとを接触させることにより変化させることが出来る。一つの具体的態様において、配列 5'-AGGTTAnnnnTGGTCA-3' (配列番号15) (ここで各「n」は独立にA、G、TまたはCから選択される)を有する応答要素と作動可能に連結しているRXR-含有細胞の標的遺伝子は、細胞と少なくとも一つの本発明の新規 LXR バリエーションとを接触させることにより活性化できる。

#### 【0218】

本発明のLXR バリエーションのホモ二量体化またはヘテロ二量体化工程に対する効果は、

当該技術分野において知られている様々な方法を用いて決定することができる。かかる方法の例は、Terrillon et al. *Molecular Endocrinology* 2003、17: 677-691、Germain-Desprez et al., *J. Biol. Chem.*、2003、278 (25) 22367-22373、およびMercier et al., *J. Biol. Chem.* 2002、277 (47) 44925-44931.に記載されている。例えば、RXRの活性は、RXR ホモ二量体化またはヘテロ二量体化の上記参考文献における技術を用いた量的評価により決定することが出来る。例えば、核内受容体ホモおよびヘテロ二量体化は、核内受容体の1つ(例えば、RXR)のcDNAをエネルギードナー RLuc (ウミシイタケルシフェラーゼ)とカルボキシル末端にて融合させ、そして、第二核内受容体(例えば、LXR) cDNAをエネルギーアクセプター GFP (緑色蛍光タンパク質)に融合することにより定量することが出来る。ウミシイタケルシフェラーゼと緑色蛍光タンパク質の発光スペクトルの分離を可能とするBRET技術(Biosignal Packard)を用いて、核内受容体のホモおよびヘテロ二量体化を定量することが出来る。

#### 【0219】

さらに、本発明はまた、哺乳類 SREBP-1 遺伝子の発現を低減させる方法に関する。本発明はLXR バリエーションがドミナントネガティブとして、野生型LXR を阻害し、それによって哺乳類細胞におけるSREBP-1 発現を阻害することができるという発見に基づく。後者の結論は本発明のバリエーションの存在下および非存在下でのSREBP-1 遺伝子発現を評価することにより容易に確認できる。SREBP-1 遺伝子の異常発現は以下のような症状ともなう：例えば、脂肪異常栄養症、高グリセリン血症(hyperglyceremia)、高トリグリセリド血症および糖尿病。本発明のバリエーションはSREBP-1 過剰発現によって媒介される症状の治療的および予防的治療としてのみならず、脂肪酸恒常性機構、脂肪異常栄養症の原因および機構の調査にも有用である。

#### 【0220】

##### 抗体

本発明はまた、単離および精製抗体、例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を提供し、かかる抗体としては新規 LXR バリエーションに特異的なイディオタイプまたは抗イディオタイプ抗体が含まれる。本発明のポリペプチドまたはそれらを発現する細胞は当業者に公知の方法によって抗体を調製するための免疫原として利用できる。例えば、配列番号3、5、7、16または18、または配列番号3、5、7、16または18の部分によってコードされるポリペプチドおよび/または配列番号3、5、7、16または18によってコードされるポリペプチドまたは上記ポリペプチドのいずれかを発現する細胞は免疫原として利用できる。これら抗体はポリクローナルであってもモノクローナルであってもよく、以下を含みうる：キメラ、一本鎖、およびFab断片またはFab発現ライブラリーの産物。抗体は細胞においてインサイチュで、または細胞抽出液においてインビトロで本発明のポリペプチドを検出するのに有用である。

#### 【0221】

例えば、該抗体は、新規 バリエーションの新規 64 アミノ酸を特異的に認識しうる。ウサギを配列番号4を含むペプチドまたはその免疫原性部分または配列番号4を含む融合ペプチドによって免疫すると、新規バリエーションに特異的なポリクローナル抗血清が単離される。あるいは、免疫された動物からの脾臓細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作ることも出来る。該ハイブリドーマをスクリーニングして、新規 LXR -64 バリエーションの64 アミノ酸配列を含むポリペプチドまたはペプチドに特異的なモノクローナル抗体を分泌するものを同定する。これら抗体は生物サンプル、例えば臨床サンプルにおいて新規 LXR -64 バリエーションを検出するのに有用であり、新規バリエーションのその他のバリエーションに対する相対量を検出するのにも有用である。

#### 【0222】

##### スクリーニングアッセイ

一般に、本明細書に記載する新規方法には、LXR バリエーションの発現または活性を調節することができる化合物の同定方法が含まれる。ある場合において、LXR バリエーションの発現または活性を調節するが、野生型LXR の発現または活性には影響をしないか、より

低い程度で影響する化合物が同定される。

【0223】

LXR の産生方法 (例えば、クローニングされたLXR のラージスケール産生)も含まれ、これにより比較的多数のLXR アナログのスクリーニングが可能となり、新規または改良アゴニストおよびアンタゴニストの開発が促進され、クローニングされた LXR の臨床治療規模での産生により、多数のLXR 関連障害、例えば、脂質代謝障害のスクリーニングが可能となる。より具体的には、クローニングされたLXR のスケール産生のための多数のアナログのスクリーニングにより、多数の LXR 活性のスクリーニングが、例えば、脂肪異栄養症、高トリグリセリド血症、高グリセリン血症、糖尿病、または高コレステロール血症の診断および臨床治療に使用するための改良された手法および薬剤の開発を導き

10

【0224】

一つの態様において、本発明のポリペプチドは、例えば、ポリペプチドへの結合によってポリペプチドの発現または活性を調節する化合物の設計および/または同定を促進する標的として使用される。かかる化合物はLXR -媒介経路に関連する障害の治療のための候補化合物であり、例えば、1以上のLXR 経路の側面を制御する薬剤として利用できる。特に、かかる化合物はホルモン応答性経路の変化に起因する疾患、例えば、糖尿病および薬剤代謝障害の治療に利用できる。さらに、本発明のポリペプチドは、ホルモンシグナル伝達に影響を与えうるさらなる標的(例えば、共活性化因子または共抑制因子タンパク質)の同定に用いることも出来る。本発明のLXR バリエーションの様々な用途にはこれらに限定

20

【0225】

LXR バリエーションの系統的研究により問題のタンパク質の構造-活性関係を推定することが可能となる。これらバリエーションの疾患研究に関する知識は分子的な病因の理解を可能にするため基本的である。さらに、新規 LXR バリエーションは特定の受容体相互作用を、組織選択的核内受容体調節因子、例えば、LXR 、LXR 、PPAR 、PPAR 、PPAR 、RAR、XR 、および PXRの同定における明らかなアプローチとしての標的化に用いることが出来る。

30

【0226】

したがって、本発明は、LXR バリエーションタンパク質に結合し、例えば、LXR バリエーション発現または活性に対して刺激または阻害効果を有し、または例えば、LXR バリエーション基質の発現または活性に刺激または阻害効果を有する調節因子、即ち、候補化合物または薬剤(例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチド疑似体、ペプチド、低分子またはその他の薬剤)を同定するための方法(本明細書において「スクリーニングアッセイ」とも称される)を提供する。このようにして同定された化合物は治療プロトコールにおいて、標的遺伝子産物の生物学的機能の解明または正常標的遺伝子相互作用を破壊する化合物の同定のため、標的遺伝子産物(例えば、LXR バリエーション遺伝子)の活性を調節するのに使用されう。

40

【0227】

一つの態様において、本発明は、LXR バリエーションタンパク質またはポリペプチドまたはその生物学的に活性の部分の基質である候補または被験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。別の態様において、本発明は、LXR バリエーションタンパク質またはポリペプチドまたはその生物学的に活性の部分に結合するかその活性を調節する候補または被験化合物のスクリーニングのためのアッセイを提供する。

【0228】

本発明の被験化合物は、例えば、当該技術分野において知られているコンビナトリアルライブラリー方法における多数のアプローチのいずれかを使用することによって得られる、ライブラリーとしては、生物学的ライブラリー; ペプチドライブラリー(ペプチドの

50

機能を有するが、酵素分解に耐性であってしかも生物活性は保持している新規な非ペプチド骨格を有する分子のライブラリー;例えば、Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37:2678-85を参照されたい); 空間的に位置指定可能な並列固相または溶液相ライブラリー; 解析を必要とする合成ライブラリー方法; 「ワン・ベッド・ワン (one-bead one) -化合物」ライブラリー方法; および親和性クロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー方法が挙げられる。生物学的ライブラリーおよびペプチドライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限られているが、その他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは低分子化合物ライブラリーに適用できる (Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12:145)。

#### 【0229】

分子ライブラリーの合成方法の例は当該技術分野において知られており、例えば以下に記載されている: DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6909; ErベータI. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422; Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37:2678; Cho et al. (1993) Science 261:1303; Carrell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; および Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37:1233。

#### 【0230】

化合物ライブラリーは溶液中に存在してもよいし (例えば、Houghten (1992) Biotechnologies 13:412-421)、またはビーズ上 (Lam (1991) Nature 354:82-84)、チップ (Fodor (1993) Nature 364:555-556)、細菌上 (Ladner、米国特許第5223409号)、孔内 (Ladner、前掲)、プラスミド (Cull et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869) またはファージ (Scott and Smith (1990) Science 249:386-390; Devlin (1990) Science 249:404-406; Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382; Felici (1991) J. Mol. Biol. 222:301-310; Ladner 前掲.) のいずれに存在してもよい。

#### 【0231】

一つの態様において、アッセイは細胞に基づくアッセイであり、ここで細胞は被験化合物と接触しているLXR バリエーションタンパク質またはその生物学的に活性の部分を発現しており、被験化合物がLXR バリエーション活性を調節する能力が測定される。被験化合物がLXR バリエーション活性を調節する能力の測定は、例えば、野生型LXR を発現する細胞におけるLXR バリエーションのドミナントネガティブ活性をモニターすること、例えば、LXR - 誘導性遺伝子または遺伝子産物の発現をモニターすることによって達成されうる。細胞は、例えば、哺乳類起源、例えば、ヒト起源であってもよい。

#### 【0232】

LXR バリエーションの化合物 (例えば、天然のLXR バリエーションリガンド) への結合を調節する被験化合物の能力、またはLXR バリエーションへ結合する被験化合物の能力も評価することが出来る。これは、例えば、化合物のLXR バリエーションへの結合が複合体における標識化合物の検出によって測定されるように、化合物に放射性同位体または酵素標識を結合することによって達成される。あるいは、LXR バリエーションを放射性同位体、酵素標識に結合するか、ペプチド標識を含むよう操作して、被験化合物のLXR バリエーション、例えば、LXR バリエーション、野生型LXR との結合の調節能力をモニターすることが出来る、あるいは複合体におけるステロイド受容体スーパーファミリーの別のメンバーとヘテロ二量体化する能力をモニターすることが出来る。例えば、化合物は<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、または<sup>3</sup>Hによって直接的または間接的に標識してもよく、放射性同位体は、放射の直接カウントまたはシンチレーションカウンターでのカウントによって検出される。あるいは、化合物を、例えば、セイヨウ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によって酵素標識してもよく、かかる酵素標識は適当な基質の生成物への変換を測定することによって検出される。

#### 【0233】

相互作用物質の標識の有無にかかわらず、化合物がLXR バリエーションと相互作用する能力を評価することが出来る。例えば、マイクロフィジオメーターを用いて、化合物または

10

20

30

40

50

LXR バリエーションのいずれも標識することなく化合物とLXR バリエーションとの相互作用を検出することが出来る(例えば、McConnell et al. (1992) Science 257:1906-1912)。本明細書において用いられる、「マイクロフィジオメーター」(例えば、サイトセンサー (Cytosensor))は、光アドレス可能電位差測定センサー (LAPS)を用いて細胞がその環境を酸性にする速度を測定する分析機器である。この酸性化速度の変化を、化合物とLXR バリエーションとの相互作用の指標として用いることが出来る。

#### 【0234】

さらに別の方法において、細胞無含有アッセイが提供され、ここでLXR バリエーションタンパク質またはその生物学的に活性の部分が被験化合物と接触され、被験化合物がLXR バリエーションタンパク質またはその生物学的に活性の部分に結合する能力が評価される。アッセイでの使用に好ましいLXR バリエーションタンパク質の生物学的に活性の部分としては、LXR バリエーション分子、非-LXR バリエーション分子(例えば、表面確率スコアの高い断片)、およびLXR バリエーションの推定リガンド結合ドメインとの相互作用に参加する断片が含まれる。

10

#### 【0235】

可溶性および/または膜結合型の単離タンパク質(例えば、LXR バリエーションタンパク質またはその生物学的に活性の部分)を本発明の細胞無含有アッセイに用いることが出来る。

#### 【0236】

細胞無含有アッセイには、2つの成分が相互作用して結合し、そして当該技術分野において知られている方法によって除去および/または検出できる複合体を形成するのに十分な時間および条件下で標的遺伝子タンパク質と被験化合物との反応混合物を調製することを含む。

20

#### 【0237】

2つの分子間の相互作用は例えば、蛍光エネルギー移動(FET)(例えば、Lakowicz et al.、米国特許第5631169号; Stavrianopoulos, et al.、米国特許第4868103号を参照)を用いて検出することも出来る。第一のフルオロフォア標識、即ち「ドナー」分子をそれが放射する蛍光エネルギーが第二の蛍光標識、即ち「アクセプター」分子によって吸収され、「アクセプター」分子が、吸収したエネルギーにより蛍光を発することができるように選択する。あるいは、「ドナー」タンパク質分子は単にトリプトファン残基の天然の蛍光エネルギーを利用してよい。標識は異なる光波長で発光し、「アクセプター」分子標識は「ドナー」分子標識と異なるように選択すればよい。標識間のエネルギー移動の効率は分子を分離している距離に関係するので、分子間の空間的關係が評価できる。分子間に結合が起こるような状況では、アッセイにおける「アクセプター」分子標識の蛍光発光が最大となる。FET結合現象は当該技術分野において周知の標準的蛍光定量的検出手段によって簡単に測定することが出来る(例えば、蛍光光度計の使用)。

30

#### 【0238】

別の態様において、LXR バリエーションタンパク質が標的分子に結合する能力の測定は、リアルタイム生物分子相互作用分析(BIA)(例えば、Sjolander and Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345 および Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705)を用いて達成することが出来る。「表面プラズモン共鳴」または「BIA」は、相互作用物質のいずれも標識することなくリアルタイムで生物特異的相互作用を検出する(例えば、BIAcore)。結合表面での質量変化(結合現象の指標)の結果、表面近くの光の屈折率が変化し(表面プラズモン共鳴(SPR)の光学的現象)、その結果、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として用いることが出来る検出可能シグナルが生じる。

40

#### 【0239】

一つの態様において、標的遺伝子産物(例えば、LXR バリエーションタンパク質またはその断片)または被験物質は固相にアンカーされる。固相にアンカーされた標的遺伝子産物/被験化合物複合体は反応の最後に検出することが出来る。一般に、標的遺伝子産物を固体表面にアンカーし、被験化合物(アンカーされていない)を直接的または間接的に本明細

50

書において記載する検出可能な標識によって標識すればよい。

【0240】

LXR バリアント、抗-LXR バリアント抗体、またはその標的分子を固定化して、一方または両方のタンパク質の非複合体化形態からの複合体形態の分離を促進するのが望ましく、アッセイを自動化するのも好ましい。被験化合物のLXR バリアントタンパク質への結合または、LXR バリアントタンパク質と標的分子との、候補化合物の存在下および非存在下での相互作用は、反応物を収容するのに好適ないかなる容器にて行ってもよい。かかる容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管、および微量遠心管が挙げられる。一つの態様において、タンパク質の一方または両方のマトリックスへの結合を可能にするドメインを付加した融合タンパク質を提供することも出来る。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/LXR バリアント融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質を、グルタチオンセファロース(商標)ビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレートに吸着させ、そこで被験化合物または被験化合物と非吸着標的タンパク質またはLXR バリアントタンパク質とを混合し、そして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について生理的条件)。インキュベーションの後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して非結合成分、そしてビーズの場合は固定化されたマトリックスを洗浄し、複合体を例えば上記のように直接的または間接的に測定する。あるいは、複合体をマトリックスから解離させ、LXR バリアント結合または活性のレベルを標準的技術によって測定する。

10

20

【0241】

マトリックス上にLXR バリアントタンパク質または標的分子のいずれかを固定化するその他の技術としては、ビオチンとストレプトアビジンとの結合の使用が挙げられる。ビオチン化LXR バリアントタンパク質または標的分子は当該技術分野において知られている技術を用いてビオチン-NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド)から調製することが出来る(例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL)、ストレプトアビジンでコーティングされた96ウェルプレートのウェルに固定化すればよい(Pierce Chemical)。

【0242】

アッセイを行うために、非固定化成分を、アンカーされた成分を含むコーティングされた表面に添加する。反応完了後、未反応成分を形成された複合体のすべてが固体表面に固定化されたままとなる条件下で除く(例えば、洗浄により)。固体表面にアンカーされた複合体の検出は多数の方法で達成することが出来る。以前に固定化されていない成分をプレ標識した場合、表面に固定化された標識の検出は複合体が形成したことを示す。以前に固定化されていない成分をプレ標識しない場合、間接的標識を、表面にアンカーされた複合体の検出に用いればよい;例えば、固定化した成分に特異的な標識化抗体を用いる(抗体は直接標識しても間接標識してもよく、例えば、標識化抗-Ig抗体を用いる)。

30

【0243】

一つの態様において、このアッセイは、LXR バリアントタンパク質または標的分子に反応性であるが、LXR バリアントタンパク質のその標的分子への結合には干渉しない抗体を用いて行う。かかる抗体は、プレートのウェルに誘導体化すればよく、未結合標的またはLXR バリアントタンパク質が抗体結合によってウェルにトラップされる。かかる複合体の検出方法、さらに上記のGST-固定化複合体の検出方法としては、LXR バリアントタンパク質または標的分子に反応性の抗体を用いる複合体の免疫検出、およびLXR バリアントタンパク質または標的分子に関する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

40

【0244】

あるいは、細胞無含有アッセイは液相で行うことも出来る。かかるアッセイにおいて、反応産物は当該技術分野において知られているこれらに限定されないが以下が含まれる多数の技術によって未反応成分から分離できる:分画遠心法(例えば、Rivas and Minton, (1993) Trends Biochem Sci 18:284-7);クロマトグラフィー(ゲルろ過クロマトグラフ

50

ィー、イオン交換クロマトグラフィー); 電気泳動 (例えば、Ausubel et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology* 1999, J. Wiley: New York.); および免疫沈降 (例えば、Ausubel et al., eds. (1999) *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley: New York)。かかる樹脂およびクロマトグラフィー技術は当業者に知られている (例えば、Heegaard, (1998) *J. Mol. Recognit.* 11:141-8; Hage and Tweed, (1997) *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 699:499-525)。さらに、蛍光エネルギー移動も本明細書に記載するように、溶液からの複合体のさらなる精製をすることなく結合の検出に用いることが出来る。

#### 【0245】

ある場合において、アッセイはLXR バリアントタンパク質またはその生物学的に活性の部分とLXR バリアント (例えば、LXR 、LXR バリアントまたはその他のステロイド受容体スーパーファミリーのメンバー) に結合する既知の化合物を接触させてアッセイ混合物を形成させること、アッセイ混合物と被験化合物とを接触させること、およびLXR バリアントタンパク質と相互作用する被験化合物の能力を測定することを含み、ここで、LXR バリアントタンパク質と相互作用する被験化合物の能力の測定には、LXR バリアントまたはその生物学的に活性の部分に優先的に結合する被験化合物の能力の測定、LXR バリアントと既知の化合物との相互作用を破壊する被験化合物の能力の測定、または既知の化合物と比較しての被験化合物の標的分子の活性を調節する能力の測定 (例えば、LXR バリアントのドミナントネガティブ活性をモニターすることによる) が含まれる。

10

#### 【0246】

本発明の標的遺伝子産物は、1以上の細胞内または細胞外巨大分子、例えば、タンパク質とインピボで相互作用することができる。この目的のため、かかる細胞内および細胞外巨大分子を本明細書において「結合パートナー」と称する。かかる相互作用を破壊する化合物は標的遺伝子産物の活性の調節に有用であり得る。かかる化合物にはこれらに限定されないが分子、例えば、抗体、ペプチドおよび低分子が含まれ得る。この態様に使用する標的遺伝子/産物は一般的に本明細書において同定されるLXR バリアント遺伝子である。別の態様において、本発明は、LXR バリアント標的分子の下流エフェクターの活性の調節を介してLXR バリアントタンパク質の活性を調節する被験化合物の能力を測定する方法を提供する。例えば、適当な標的に対するエフェクター分子の活性を測定してもよいし、エフェクターの適当な標的への結合を先に記載のようにして測定してもよい。

20

30

#### 【0247】

標的遺伝子産物とその細胞内または細胞外結合パートナーとの相互作用を干渉する化合物を同定するために、2つの産物が複合体を形成するのに十分な条件下で十分な時間で、標的遺伝子産物と結合パートナーとを含む反応混合物を調製する。阻害剤を試験するために、反応混合物を被験化合物の存在下および非存在下に提供する。被験化合物は最初に反応混合物に含めていてもよいし、標的遺伝子とその細胞内または細胞外結合パートナーの添加の後に添加してもよい。対照反応混合物は、被験化合物なしで、またはプラセボとともにインキュベートする。標的遺伝子産物と細胞内または細胞外結合パートナーとの複合体形成を次いで検出する。対照反応において複合体が形成し、被験化合物を含む反応混合物では複合体が形成しない場合、それは被験化合物が標的遺伝子産物と相互作用結合パートナーとの相互作用を干渉することを示す。さらに、被験化合物と正常標的遺伝子産物を含む反応混合物における複合体形成を、被験化合物と突然変異標的遺伝子産物とを含む反応混合物における複合体形成と比較してもよい。この比較は突然変異標的遺伝子産物の相互作用を破壊するが正常標的遺伝子産物の相互作用は破壊しない化合物を同定するのが望ましい場合に重要でありうる。

40

#### 【0248】

これらアッセイは異種または同種のいずれの型式でおこなってもよい。異種アッセイでは、標的遺伝子産物または結合パートナーの固相へのアンカーが伴い、反応の最後に固相にアンカーされた複合体が検出される。同種アッセイでは、全反応は液相で行われる。いずれのアプローチにおいても、反応体の添加の順序を変えて、被験化合物に関する異なる

50



情報を得てもよい。例えば、競合により、標的遺伝子産物と結合パートナーとの相互作用を干渉する被験化合物は被験物質の存在下で反応を行うことによって同定することが出来る。あるいは、既存の複合体を破壊する被験化合物、例えば、複合体からの成分の一方を置換する高い結合定数を有する化合物は、複合体が形成された後で被験化合物を反応混合物に添加することにより試験できる。様々な型式を以下に簡単に説明する。

#### 【0249】

異種アッセイ系においては、標的遺伝子産物または相互作用細胞内または細胞外結合パートナーのいずれかが固体表面(例えば、マイクロタイタープレート)にアンカーされており、アンカーされていない成分が直接的または間接的に標識されている。アンカーされた成分は非共有結合または共有結合のいずれによって固定化されていてもよい。あるいは、アンカーされる成分に特異的な固定化抗体を用いて固体表面にその成分をアンカーしてもよい。

10

#### 【0250】

アッセイを行うために、固定化された成分のパートナーは被験化合物とともに、または被験化合物無しでコーティングされた表面に曝される。反応完了後、未反応成分は(例えば、洗浄により)除かれ、形成した複合体は固体表面に固定化されたままである。固定化されていない成分がプレ標識されている場合、表面に固定化された標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。固定化されていない成分がプレ標識されていない場合、間接的標識を用いて表面にアンカーされた複合体を検出することが出来る; 例えば、元は固定化されていない成分に特異的な標識化抗体を用いればよい(その抗体もまた、直接標識されていてもよいし、標識化抗-Ig 抗体などにより間接的に標識されていてもよい)。反応成分の添加の順序に応じて、複合体形成を阻害する被験化合物または既存の複合体を破壊する被験化合物が検出できる。

20

#### 【0251】

あるいは、反応は被験化合物の存在下または非存在下で液相で行ってもよく、反応産物を未反応成分から分離し、複合体を検出する; 例えば、溶液中に形成された複合体をアンカーするための結合性成分の一方に特異的な固定化抗体、および、アンカーされた複合体を検出するための他方のパートナーに特異的な標識化抗体を用いる。この場合も、反応体の液相への添加の順序に応じて、複合体形成を阻害する被験化合物または既存の複合体を破壊する被験化合物を同定することができる。

30

#### 【0252】

いくつかの方法においては、同種アッセイを利用できる。例えば、標的遺伝子産物と相互作用細胞内または細胞外結合パートナー産物とのあらかじめ形成した複合体を、標的遺伝子産物またはその結合パートナーのいずれかが標識されているが、標識によって生じるシグナルが複合体形成によってクエンチされるように調製する(例えば、米国特許第4109496号では、免疫アッセイのためにこのアプローチを用いている)。既存の複合体からの成分の一方と競合し、それを置換する被験物質の添加により、バックグラウンドを超えるシグナルが生じる。このようにして、標的遺伝子産物-結合パートナー相互作用を破壊する被験物質を同定することが出来る。

#### 【0253】

さらなる側面において、LXR バリエーションタンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおける「ベイトタンパク質」として利用して(例えば、米国特許第5283317号; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechnologys 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696; および Brent W094/10300参照)、LXR バリエーションと結合または相互作用する別のタンパク質であってLXR バリエーション活性に関わるもの(「LXR バリエーション結合性タンパク質」または「LXR バリエーション-bp」)を同定することが出来る。かかるLXR バリエーション-bpはLXR バリエーションタンパク質またはLXR バリエーション標的、例えば、LXR バリエーション-媒介シグナル伝達経路の下流要素によるシグナル(例えばリガンド)の活性化剤または阻害剤でありうる。かかるアッセイを行う

40

50

ためのキットは市販されている(例えば、Stratagene、La Jolla、CA; BD Biosciences Clontech、Palo Alto、CA)。

【0254】

別の態様において、LXR バリアント発現の調節因子が同定される。例えば、細胞または細胞無含有混合物を候補化合物と接触させ、LXR バリアント mRNAまたはタンパク質の発現を、LXR バリアント mRNAまたはタンパク質の候補化合物の非存在下での発現レベルと比較して評価する。LXR バリアント mRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の非存在下よりも存在下の方が高い場合、その候補化合物はLXR バリアント mRNAまたはタンパク質発現の刺激因子として同定される。あるいは、LXR バリアント mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下よりも存在下の方が低い場合(統計的に有意に低い場合)、その候補化合物はLXR バリアント mRNAまたはタンパク質発現の阻害剤として同定される。LXR バリアント mRNAまたはタンパク質発現レベルは、LXR バリアント mRNAまたはタンパク質の検出のための本明細書に記載する方法によって測定することが出来る。

10

【0255】

別の側面において、本発明は本明細書に記載する2以上のアッセイの組み合わせに関する。例えば、調節剤は細胞に基づくアッセイまたは細胞無含有アッセイを用いて同定することができ、その薬剤のLXR バリアントタンパク質活性を調節する能力はインピボで、例えば動物を用いて確認でき、例えば、高コレステロール血症またはその他の脂肪酸代謝に関連する障害の動物モデルを用いるとよい。

20

【0256】

本発明はさらに、上記スクリーニングアッセイによって同定される新規薬剤に関する。したがって、本明細書に記載するように同定した薬剤(例えば、LXR バリアント調節剤、アンチセンス LXR バリアント核酸分子、LXR バリアント特異的抗体、またはLXR バリアント-結合パートナー)を、かかる薬剤での治療の、有効性、毒性、副作用または作用機構を判定する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にさらに含まれる。さらに、上記スクリーニングアッセイによって同定される新規薬剤は本明細書に記載するように治療のために利用できる。

【0257】

トランスジェニック動物

本発明はまた、非ヒトトランスジェニック動物に関する。かかる動物はLXR バリアントタンパク質の機能および/または活性の研究およびLXR バリアント発現または活性調節因子の同定および/または評価に有用である。本明細書において用いられる、「トランスジェニック動物」は非ヒト動物であり、例えば、哺乳類、例えばげっ歯類、例えば、ラットまたはマウスであり、1以上のその動物の細胞が導入遺伝子を含むものをいう。その他のトランスジェニック動物の例には、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類等が挙げられる。導入遺伝子は外来性 DNAまたは内在性染色体DNAの欠失などの再編成であって一般的にトランスジェニック動物の細胞のゲノムに組み込まれるか現れるものである。導入遺伝子はトランスジェニック動物の1以上の細胞タイプまたは組織においてコードされる遺伝子産物の発現を駆動することが出来、導入遺伝子のなかには、例えば、発現をノックアウトまたは減少させるものもある。したがって、トランスジェニック動物は、その内在性 LXR バリアント遺伝子が、動物細胞、例えば、動物胚細胞に、動物の発達前に導入された外来性 DNA分子と内在遺伝子との相同組換えによって変化されたものをいう。ある場合において、LXR バリアントのオルソログが動物において同定され、オルソログ配列はトランスジェニック動物の作成に用いられる。既知の遺伝子(例えば、ヒト)および目的のLXR バリアント遺伝子との間の相同性が十分であれば、ヒト配列を用いることができる。

30

40

【0258】

イントロン配列およびポリアデニル化シグナルも導入遺伝子に含めてよく、それによって導入遺伝子の発現効率が上昇する。組織特異的調節配列を本発明の導入遺伝子と作動可

50

能に連結して特定の細胞にLXR バリアントタンパク質を発現させることができる。トランスジェニック創始動物は、そのゲノムにおけるLXR バリアント導入遺伝子の存在および/またはLXR バリアント mRNAの動物の組織または細胞における発現に基づいて同定することが出来る。トランスジェニック動物は導入遺伝子に関連する別の特性によって同定することも出来る。例えば、LXR<sup>-64</sup> 導入遺伝子を発現するトランスジェニック動物では、SREBP-1C 発現量が低下し、対照動物と比較してLXR アゴニストの存在下で具体的に注目される。トランスジェニック創始動物を用いて、導入遺伝子を有するさらなる動物を育種することも出来る。さらに、LXR バリアントタンパク質をコードする導入遺伝子を担持するトランスジェニック動物をさらに育種して別の導入遺伝子を担持する別のトランスジェニック動物を得ることもできる。

10

#### 【0259】

LXR バリアントタンパク質またはポリペプチドをトランスジェニック動物で発現させることが出来、例えば、タンパク質またはポリペプチドをコードする核酸を動物のゲノムに導入すればよい。一般に、核酸を組織特異的プロモーター、例えば、乳汁または卵特異的プロモーターの制御下に置き、動物によって生産された乳汁または卵から回収すればよい。本出願に好適な動物としては、マウス、ブタ、ウシ、ヤギ、およびヒツジが挙げられる。

#### 【0260】

本発明はまた、トランスジェニック動物からの細胞集団も含む。かかる細胞を単離および増殖させる方法は当該技術分野において知られており、一次、二次、および不死化細胞の発達および増殖も含まれる。

20

#### 【実施例】

#### 【0261】

本発明をさらに以下の実施例により説明するが、特に断りのない限り、すべての部、パーセンテージは重量によるものであり、度は摂氏温度である。これら実施例は、本発明の態様の例示を示すが、単に例示の目的に過ぎないことを理解されたい。上記記載および以下の実施例から、当業者は本発明の必須の特徴を理解することが出来、本発明の精神と枠内から逸脱することなく、本発明に様々な用途と条件の様々な変更および修飾をなすことができる。実施例は本発明の精神と内容を決して限定するものではないことを理解されたい。

30

#### 【0262】

#### 実施例 1

#### ヒトLXRバリエーションのクローニング

トータルRNAをQIAGEN キット (QIAGEN, Valencia, CA)を用いてTHP-1細胞 (ヒト単球-マクロファージ細胞株) から単離した。第一鎖 cDNAを、20  $\mu$ L 反応混合物 (4  $\mu$ Lの5XRT 反応バッファー、10 ユニットの Rnasin、200  $\mu$ M dNTP、20 pM ランダムプライマー、および20 ユニットの 逆転写酵素を含有) 中の0.1  $\mu$ gのトータル THP-1 RNAから合成した。混合物を42 °Cで1時間、次いで53 °Cで30 分間インキュベートした。ハイブリダイズしなかった RNAを10 ユニットの RNase Hで37 °Cで10 分間消化した。2  $\mu$ Lの逆転写酵素産物をヒト LXR<sup>-64</sup> 特異的プライマーを用いたPCR 増幅に供した。プライマー配列は: LXR<sup>-64</sup> -For: 5'-CGGTCGACATGTCCTTGTGGCTGGGG (配列番号9); およびLXR<sup>-64</sup> -Rev: 5'-CAGCGGCCGCTTCG TGCACATCCCAGATCTC (配列番号10) (制限部位に下線を引いた)であった。サーマルサイクラーでの35サイクルの増幅を行った: 1サイクルは94 °C (30 秒)、58 °C (30 秒)、72 °C (2 分間)。RT-PCR 産物を1.2% アガロースゲルで分析した。同じ量のトータルRNAをPCRにおけるテンプレートとして用いてcDNAからバンドが増幅されているかを確認した。RT-PCR 産物を配列決定用pCMV 発現ベクターのSal I/Nit I 部位にサブクローニングした。サブクローニングの配列決定の結果により、多数の新規配列が同定され、本明細書においてLXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>、およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>と称するものが含まれていた。

40

#### 【0263】

#### 実施例 2

50

### クローンの配列決定および予備的分析

実施例 1のLXR<sup>-64</sup>およびLXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>プライマー(前掲)を用いて、ヒトLXR<sup>-64</sup>の3つの選択的バリエーションをヒト単球/マクロファージ THP-1細胞から同定し、クローニングした。バリエーションは、ネイティブな(野生型)LXR<sup>-64</sup>より64アミノ酸長いLXR<sup>-64</sup>;ネイティブなLXR<sup>-64</sup>と異なる42アミノ酸を有するLXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>;およびネイティブなLXR<sup>-64</sup>と異なる42アミノ酸を有し、ネイティブなLXR<sup>-64</sup>のエキソン6に対応する配列が欠失しているLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>であった。新規LXR<sup>-64</sup>バリエーションと野生型ヒトLXR<sup>-64</sup>とのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列の比較を図1B、2B、および3Bに示す。

#### 【0264】

図1Aは、野生型LXR<sup>-64</sup>には存在せずLXR<sup>-64</sup>に存在する新規ヌクレオチド配列を示す(ヌクレオチド1121-1154)。図1Bは、野生型LXR<sup>-64</sup>に存在しないがLXR<sup>-64</sup>に存在する新規アミノ酸配列を示す(アミノ酸368-409)。 10

#### 【0265】

図2Aは、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>に存在する新規ヌクレオチド配列を示す。野生型LXR<sup>-64</sup>には存在するがLXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>にはない欠失配列(ヌクレオチド1121-1154)によりフレームシフトが導入されている。この結果、LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>新規アミノ酸配列が生じる(LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>のアミノ酸368-409)。LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>は野生型LXR<sup>-64</sup>のアミノ酸368-447に対応するアミノ酸配列を欠いている。

#### 【0266】

図3Aは、ヌクレオチド651-1220からのLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>の完全長配列を示す。この図は対応する領域(ヌクレオチド651-1166)からの野生型LXR<sup>-64</sup>の全配列を示すものではない。野生型LXR<sup>-64</sup>のヌクレオチド708-887に対応する配列はLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>には存在しない。LXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>のヌクレオチド1101-1134に対応する配列は野生型LXR<sup>-64</sup>には存在しない。図3Bは、野生型LXR<sup>-64</sup>には存在するが、LXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>には存在しない配列(野生型LXR<sup>-64</sup>のアミノ酸237-296および368-447)およびLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>にのみ存在する配列(LXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>のアミノ酸308-349)を示す。 20

#### 【0267】

新規バリエーションの全cDNAコード領域および推定アミノ酸配列を以下の配列番号に示す: 配列番号3(LXR<sup>-64</sup>をコードするヌクレオチド配列)、配列番号4(LXR<sup>-64</sup>の推定アミノ酸配列)、配列番号5(LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>cDNAをコードするヌクレオチド配列)、配列番号6(LXR<sup>-42e<sup>+</sup></sup>の推定アミノ酸配列)、配列番号7(LXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>をコードするヌクレオチド配列)、配列番号8(LXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>の推定アミノ酸配列)、配列番号16(野生型LXR<sup>-64</sup>のエキソン6と7とを連結するイントロン6由来であってより長いエキソン6を作るLXR<sup>-64</sup>の特有のヌクレオチド配列)、配列番号17(配列番号16によってコードされるLXR<sup>-64</sup>の特有のアミノ酸配列)、配列番号18(野生型LXR<sup>-64</sup>のエキソン8には存在しないLXR<sup>-42e<sup>-</sup></sup>mRNAのエキソン8の新規部分)、および配列番号19(LXR<sup>-42</sup>cDNAにおいて同定される付加的配列によってコードされる推定アミノ酸配列)。 30

#### 【0268】

### 実施例 3

#### 遺伝子特徴付け

本発明の新規バリエーションである、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42<sup>+</sup></sup>およびLXR<sup>-42<sup>-</sup></sup>のゲノム構成を決定した。野生型LXR<sup>-64</sup>と比較した、LXR<sup>-64</sup>、LXR<sup>-42<sup>+</sup></sup>およびLXR<sup>-42<sup>-</sup></sup>の転写開始部位、ゲノム構造、選択的スプライシング、および機能性ドメインをそれぞれ図4、5、および6に示す。 40

#### 【0269】

図4はLXR<sup>-64</sup>mRNAの構造図であり、野生型LXR<sup>-64</sup>のエキソン6に対応する配列に新規配列が挿入されていることを示す。それゆえ、新規配列を有するプローブは、例えば、LXR<sup>-64</sup>の発現の同定またはLXR<sup>-64</sup>バリエーションの同定に有用である。新規配列によってコードされるアミノ酸配列を抗原として利用して、LXR<sup>-64</sup>バリエーションに特異的に結合する抗体を作成することができる。LXR<sup>-64</sup>バリエーションは、そのmRNAが新規配列核酸配列を含むことおよび新規アミノ酸配列をコードする点が特徴である。かかるバリエーションは保 50

存的置換を含みうる。

【0270】

図5はLXR<sup>-42e+</sup> mRNAの構造図であり、野生型LXR<sup>-42e+</sup>のエキソン8に対応する配列に新規配列が導入されていること、その配列がエキソン9の前の配列に終止シグナルを導入することを示す。新規LXR<sup>-42e+</sup>配列はまた野生型LXR<sup>-42e+</sup>のエキソン10も欠いている。新規配列を有するプローブは、例えば、LXR<sup>-42e+</sup>の発現の同定またはLXR<sup>-42e+</sup>バリエーションの同定に有用である。そのmRNAが新規核酸配列を含むこと、新規アミノ酸配列をコードすることがLXR<sup>-42e+</sup>バリエーションの特徴である。かかるバリエーションは保存的置換を含みうる。いくつかのLXR<sup>-42e+</sup>バリエーションはエキソン10を欠いている。ある場合において、LXR<sup>-42e+</sup>バリエーションは新規配列を含み、かつ、エキソン10を欠いている。

10

【0271】

図6はLXR<sup>-42e-</sup> mRNAの構造図であり、LXR<sup>-42e-</sup>に存在しない野生型LXR<sup>-42e-</sup>のエキソン6を示す。(文献の中には野生型LXR<sup>-42e-</sup>のエキソン1をエキソン1Aとよび、エキソン2をエキソン1Bとよぶものもある。この番号付けでは、野生型LXR<sup>-42e-</sup>のエキソン5は欠失したエキソン6配列に対応する)。LXR<sup>-42e-</sup>の連続するエキソン5およびエキソン7配列を含むプローブはそれゆえ、例えば、この配列の発現の特異的検出またはLXR<sup>-42e-</sup>の新規バリエーションの同定に有用である。したがって、LXR<sup>-42e-</sup>バリエーションの特徴は野生型エキソン6を欠くことである。エキソン5と7を架橋する配列によってコードされるアミノ酸配列はまた、LXR<sup>-42e-</sup>に特異的に結合する抗体の作成にも有用である。

20

【0272】

実施例 4

組織分布

組織分布研究を、BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA)からのリアルタイム PCR およびMultiple Tissue cDNA panels (MTC、Human cDNA)を用いて行った。リアルタイム量的 PCR アッセイは、Applied Biosystems 7700 配列検出器 (Foster City, CA)を用いたパネルの上で行った。各増幅混合物 (50 μL)は、50 ngのcDNA、400 nM フォワードプライマー (配列番号11)、400 nM リバースプライマー (配列番号12)、200 nM 二重標識蛍光発生プローブ (配列番号13) (Applied Biosystems)、5.5 mM MgCl<sub>2</sub>、および 1.25 ユニット Gold Taq (Applied Biosystems)を含んでいた。該プライマーは長さ約 80 ヌクレオチドのLXR<sup>-42e+</sup>配列の一部を増幅する。PCR サーマルサイクリングパラメーターは、95 °C、10 分間、そして40サイクルの、95 °C 15 秒、60 °C 1分であった。サンプルと非テンプレート対照をとともに、段階希釈したcDNA 標準を並行して分析した。すべてのサンプルはヒトグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 発現と並行して同じ泳動で、GAPDH (Applied Biosystems)のためにあらかじめ開発されたアッセイからのプローブとプライマーを用いて分析した。すべての標的遺伝子発現はGAPDHの発現に対して正規化した。定量分析は製造業者のプロトコールにしたがい(Perkin-Elmer)、閾値手法を用いて行い、相対量を標準曲線から算出した。

30

【0273】

これらの研究においてLXR<sup>-64</sup>バリエーション LXR<sup>-64</sup>の検出に用いたプライマーおよびプローブは以下の通り:L64-For (5'-TGGAAGCAGGGATGAGG-3'; 配列番号11)、L64-Rev (5'-GAGGGCTGGTCTTGGAGCA-3'; 配列番号12)、およびL64 TaqMan プローブ (FAM-TCGGCCTCCCTGGAA GAGGCC-TAMRA;配列番号13)。L64 プライマーおよびプローブはLXR<sup>-64</sup> cDNAにみられる64 ヌクレオチドに局在化される。

40

【0274】

LXR<sup>-64</sup> mRNAは肝臓においてもっとも高く発現していることが判明した(図7)。転写産物は小腸、胎盤、膵臓、卵巣、および結腸においても比較的高いレベルで検出された。その他の被験組織で観察されたのは非常に低い発現であった。これらの研究に用いたLXR<sup>-64</sup>バリエーション LXR<sup>-64</sup>の検出のためのプライマーおよびプローブは以下の通りである:L42-For (5'-GGTGGAGGCATTTGCTGTGT-3'; 配列番号21)、L42-Rev (5'-CCCAAATTGCAACCAAAATATAGA-3'; 配列番号22)およびL42 プローブ (FAM-TTAGGATGAGAGAGCTTGGCTGGAGCAT-TAMRA;

50

配列番号23)。FAM/TAMRA 蛍光発生プローブはBioSearch Technologies (Novato, CA)から入手できる。

【0275】

LXR<sup>-42</sup>の発現はLXR<sup>-64</sup>と比較して異なるパターンを示した。最高の発現は肝臓で観察されたが、LXR<sup>-42</sup>配列はその他の被験組織では非常に低いレベルで検出されたか、検出されなかった。

【0276】

野生型LXR およびLXR バリエーションは肝臓において高度に発現している。肝臓に次いで、野生型LXR は膵臓に高く発現しており、次いで精巣、小腸および脾臓であり、これらのmRNAレベルは同等であった。前立腺、胸腺、腎臓、卵巣、胎盤、肺および結腸は精巣より低い発現であり、白血球、心臓、脳および骨格筋では野生型LXR mRNAの含有量は無視できる程度であった。LXR<sup>-64</sup>の発現レベルも肝臓で最高であり、次いで小腸であった。胎盤、膵臓、卵巣、結腸、および肺のLXR<sup>-64</sup>発現は小腸より低かった。発現は腎臓と白血球でさらに低く、心臓、脳、骨格筋、脾臓、胸腺、前立腺、および精巣での発現量は無視できるほどであった。肺におけるLXR<sup>-42</sup>発現 (LXR<sup>-42e-</sup> + LXR<sup>-42e+</sup>)は肝臓より低かった。その他の組織 (前掲)での発現レベルは肝臓と比べて有意に低かった。

【0277】

実施例 5

dTHP-1細胞におけるLXR アゴニストによるLXR<sup>-L64</sup>の上方制御

野生型LXR のアゴニストがLXR バリエーションの発現を調節できるかを判定するための実験を行った。これらの実験において、THP-1細胞は American Type Culture Collection (ATCC)から得て、10% 胎児ウシ血清 (FBS)を含有するRPMI培地で培養した。分化したTHP-1細胞における遺伝子発現分析のために、THP1細胞を10% リポタンパク質-欠失血清 (LPDS) (Intracel Corp, Rockville, MD)を追加したRPMI培地でインキュベートし、150 nM ホルボールエステルで3日間処理した後、LXR、RXR、またはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR )アゴニスト化合物で処理し、具体的には媒体のみ(対照)、10 μM T0901317、10 μM GW 3965、10 μM シグリタゾン、または1 μM 9RAで処理した。リアルタイム RT-PCR用のプライマーおよびTaqMan プローブは実施例4に記載の通りである。データはLXR<sup>-64</sup> およびLXR<sup>-42</sup> mRNAの発現は、2つの合成 LXR アゴニストであるT0901317 ([N-(2,2,2,-トリフルオロ-エチル)-N-[4-(2,2,2,-トリフルオロ-1-ヒドロキシ1-トリフルオロメチル-エチル)-フェニル]-ベンゼンスルホンアミド]) (Repa et al., Science 2000 289(5484):1524-9、およびSchultz et al., Gene Dev. 2000 14(22):2831-8)、GW3965 [3-(3-(2-クロロ-3-トリフルオロメチルベンジル)-2,2-ジフェニルエチルアミノ)プロポキシフェニル酢酸] (Collins et al., J. Med. Chem., 2002 45: 1963-1966およびLaffitte et al., Mol. Cell. Biol. 2001, 21: 7558-7568)、PPAR リガンド (10 μMのシグリタゾン (citglitazone))、および RXR リガンド (9-シスレチノイン酸) のいずれもインキュベートしたTHP-1細胞においても上昇していることが示された(図8A および8B)。

【0278】

これらのデータは、LXR バリエーションの発現が公知のLXR アゴニストを用いて誘導できることを示す。

【0279】

実施例 6

LXR バリエーションの機能的特徴付け

ヒト LXR プロモーター (配列番号14)を公表されたLXR ゲノム 構造および配列 (GenBank 登録番号AC090589)からの情報を用いてPCRによって増幅した。LXR のLXR 応答要素(5'-TGACCAgcagTAACCT-3'、配列番号20)を含むLXR プロモーターの -2660から -2363にわたる断片(エキソン 1からの転写開始部位からの相対位置) (Laffitte et al. 2001, Mol. Cell. Biol. 21, 7558-7568 およびWhitney et al., 2001, J. Biol. Chem. 276, 43509-43515)をpGL3ベシックプラスミドにサブクローニングしてpGL-3-LXR<sup>-Luc</sup>を作成した。本明細書において開示する実験と分析のための参照として使用するLXR の「ネイ

10

20

30

40

50

タイプな」配列のGenBank登録番号は、ヒト LXRaについてはGenbank登録番号BC008819である。ヒト LXR、およびRXRのコード領域(GenBank登録番号BC007925)をGenBankの配列によってRT-PCRで増幅し、pCMV/myc/nuc発現ベクター(Invitrogen、Carlsbad、CA)にサブクローニングした。新規LXR-L64コード領域をpCMV/myc/nuc発現ベクターにサブクローニングした。

#### 【0280】

HEK293細胞を10% FBSを含有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で培養した。トランスフェクションはLipofectamine 2000(Invitrogen)を用いて24ウェルプレートで3連で行った。各ウェルは400 ngのレポータープラスミド、100 ngの受容体発現ベクター、および200 ngのpCMV-gal参照プラスミド(細菌-galラクトシダーゼ遺伝子を含む)でトランスフェクトした。各ウェルへの添加は、DNAとpCMV(Invitrogen、Carlsbad、CA)発現ベクターの含量が一定になるように調整した。トランスフェクションの6~8時間後、細胞をリン酸緩衝食塩水(PBS)で1回洗浄し、10%リポタンパク質-欠失血清(LPDS)(Int racel Corp、Rockville、MD)およびLXRアゴニスト、RXRアゴニスト、または媒体対照を含む新しい培地で24時間インキュベートした。細胞を回収し、分析し、抽出液を、マイクロプレートルミノメーター/フォトメーターリーダー(Lucy-1; Anthos、Salzburg、Austria)にてルシフェラーゼとgalラクトシダーゼ活性についてアッセイした。ルシフェラーゼ活性をgalラクトシダーゼ活性に対して正規化した。

10

#### 【0281】

より詳細には、HEK293細胞を対照pGL3-ベシックベクター(Promega Madison、WI 53711)またはpGL3-LXR-Luc(LXRプロモーターの部分であってLXRプロモーターのLXRE配列(TGACCAgcagTAACCT;配列番号20)を含み、pGL3-ベシックベクターのKpn I/Xho I部位にサブクローニングしたもの)レポーターおよびpCMV-hLXR/pCMV-hRXR、pCMV-LXR-64/pCMV-hRXR、pCMV-LXR-42e<sup>+</sup>/pCMV-hRXR、pCMV-LXR-42e<sup>-</sup>/pCMV-hRXRとで共トランスフェクトした。トランスフェクションの後、細胞を、10%リポタンパク質-欠失血清(LPDS)および10 μM T0901317または媒体対照を追加したDMEMで24時間インキュベートし、ルシフェラーゼ活性をアッセイして正規化した。

20

#### 【0282】

図9に示すように、新規LXRバリエーションをレポーター遺伝子と共トランスフェクトした場合、LXRリガンド-依存的活性化が、共トランスフェクトされたネイティブなLXRと比較して鋭く低下していた。さらに、図10に示すように、バリエーションおよびLXRをレポーター遺伝子と同時に共トランスフェクトした場合、外来性LXRの活性化は共トランスフェクトされたLXRと比較して阻害されていた。これらのデータは、新規にクローニングしたLXRバリエーションはネイティブなLXR発現に対してドミナントネガティブな調節因子として機能することを示す。

30

#### 【0283】

##### 実施例 7

##### LXRバリエーションによるLXR標的遺伝子の調節

LXRの重要な特徴は多数の生理的効果を含むことであり、かかる効果の中には生物に有益なものもあるが、少なくとも一定の場合には、生物に有害なものもある。したがって、本明細書に記載する新規LXRバリエーションの発見は細胞における様々なLXR活性の側面を様々な調節することを可能にする標的を提供する。バリエーションの機能の判定のために、発現したLXRバリエーションの存在下でのLXR標的遺伝子の発現を調べた。

40

#### 【0284】

これらの実験において、ヒトLXR、RXR、およびLXRバリエーション(LXR-64)コード領域をRT-PCRで増幅した。PCR産物はpCMV/myc/nuc発現ベクター(Invitrogen、Carlsbad、CA)にサブクローニングし、以下に記載の実験に用いた。

#### 【0285】

発現実験は10% FBSを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で培養したHEK293細胞に行った。培養細胞をLXR(野生型)をコードする配列を含む発現ベクターまたはLXR-

50

64をコードする配列を含む発現ベクターでトランスフェクトした。すべてのサンプルはRXR 配列をコードする発現ベクターと共トランスフェクトした。トランスフェクションはLipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて24 ウェルプレートで3連で行った。各ウェルは、200 ngのLXR 発現ベクター (LXR )、LXR -64 発現ベクター (L64 )、または対照 プラスミド (pCMV)と、200 ngのヒト RXR 発現ベクター (RXR )とでトランスフェクトした。各ウェルへの添加は、DNAとpCMV 発現ベクターとの量が一定になるよう調整した。トランスフェクションの6-8時間後、細胞をリン酸緩衝食塩水 (PBS)で一回洗浄し、10% リポタンパク質欠失血清 (LPDS) (Intracel Corp, Rockville, MD)および合成 LXR アゴニスト (T0901317) および/または RXR アゴニスト (9-シスレチノイン酸、9RA)、または媒体のみ (対照)を含む新しい培地で48 時間インキュベートした。細胞を回収し、トータルRNAを細胞からQIAGEN キットを用いて単離した。遺伝子発現レベルはApplied Biosystems 7700 配列検出器を用いてリアルタイム定量PCR アッセイで測定した。

#### 【0286】

新規バリエーション、LXR -64をコードする配列を、ヒト RXR -コード配列と共トランスフェクトし、HEK293細胞で発現させた場合、SREBP-c1 (LXR 標的遺伝子) 発現の基底の、LXR リガンド-依存的、およびLXR+RXR リガンド-依存的誘導が、野生型LXR とRXR 、または空の発現ベクターとRXR のいずれかでトランスフェクトされた細胞におけるSREBP-c1発現と比較して鋭く低下した(図11)。別のLXR 標的遺伝子である、ABCA1の、基底の発現は、バリエーション L64とRXR との細胞への導入によって影響を受けなかった。しかし、ABCA1 発現のLXRおよびLXR + RXR-リガンド依存的誘導は、LXR -64 およびRXR を発現する細胞においてネガティブな LXRaとRXRaまたは空の発現ベクターとRXRaとをトランスフェクトした細胞における発現と比べて低かった (図12)。

#### 【0287】

これらのデータは、LXR バリエーションがLXR -誘導遺伝子発現のドミナントネガティブな調節因子として作用し、HEK293細胞におけるLXR 標的遺伝子の発現を示差的に制御することが出来ることを示す。したがって、LXR バリエーションの発現または活性の制御は、細胞におけるLXR に関連する効果を示差的に調節する方法を提供する。

#### 【0288】

これらのデータはまた、LXR バリエーションの過剰発現により、SREBP-C1 発現を阻害することができることも示している。また、SREBP-1C発現のLXR アゴニストによる誘導はLXR バリエーション(例えば、LXR -64) 発現細胞において有意に低下する。それゆえ、LXR バリエーション (例えば、LXR -64)の発現または活性を上昇させることは、SREBP-1C発現に関連する障害の治療に有用である。例えば、LXR 活性を例えば、LXR -64過剰発現または細胞に発現するLXR -64の活性の上昇により破壊することで(例えば、野生型LXR と比べてLXR -64に示差的に結合する化合物の投与による)、SREBP-1Cのインスリン誘導を阻害する方法が提供され得、それゆえインスリンによる脂肪酸合成の望ましくない誘導を阻害する方法が提供され得る。別の例において、LXR バリエーション(例えば、LXR -64)の過剰発現またはLXR バリエーションの選択的活性化(例えば、LXR バリエーションに示差的に結合する化合物による)の結果、SREBP-1Cが阻害され得、それゆえ心臓疾患の強い前兆である症状である、高トリグリセリド血症の治療方法が提供される。別の例において、SREBP-1C 発現を低下させること(LXR バリエーション、例えば、LXR -64の発現または活性の上昇による)によって、特定の障害、例えば、糖尿病および特定のタイプの高リポタンパク血症における望ましい効果であるVLDL-TG (超低密度リポタンパク質トリグリセリド)の発現を低下させることが出来る。

#### 【0289】

LXR アゴニスト存在下での野生型LXR 発現はコレステロール逆輸送に關与するABCA1を上方制御する効果を有する。LXR バリエーション (例えば、LXR -64)の発現は細胞工程に対して明らかな効果はあまり有さない。それゆえ、LXR バリエーションの過剰発現は、特定のLXR 標的遺伝子(例えば、SREBP-1C)の発現を低下させる一方で別のその発現が望ましいLXR 標的遺伝子(例えば、ABCA1)には影響を与えないという点で有益であり得る。



## 【 0 2 9 0 】

RXR とヘテロ二量体化し、これらヘテロ二量体を活性化する核内受容体により、特定の遺伝子の発現が上昇する。1以上のかかる遺伝子の発現が望ましくない場合(例えば、SREBP1cのLXR-媒介 上方制御)、発現したLXR バリエントがRXRに結合し、それによってヘテロ二量体化のために利用可能なRXRが減少し、それゆえ望ましくない遺伝子発現の誘導が低減されるとすれば、LXR -64の過剰発現は対象にとって有益なものであり得る。

## 【 0 2 9 1 】

配列

## 【表 1 - 1】

## 配列番号1

野生型LXR $\alpha$ の全長コード領域のcDNA

1 atgtccttgt ggctgggggc ccctgtgcct gacattcctc ctgactctgc  
 51 ggtggagctg tggaagccag gcgcacagga tgcaagcagc caggcccagg  
 101 gaggcagcag ctgcatcctc agagaggaag ccaggatgcc ccactctgct  
 151 gggggtactg caggggtggg gctggaggct gcagagccca cagccctgct  
 201 caccagggca gagccccctt cagaaccac agagatccgt ccacaaaagc  
 251 ggaaaaaggg gccagcccc aaaatgctgg ggaacgagct atgcagcgtg  
 301 tgtggggaca aggcctcggg cttccactac aatgtttctga gctgcgaggg  
 351 ctgcaaggga ttcttcgcc gcagcgtcat caagggagcg cactacatct  
 401 gccacagtgg cggccactgc cccatggaca cctacatgcy tcgcaagtgc  
 451 caggagtgtc ggcttcgcaa atgccgtcag gctggcatgc gggaggagtg  
 501 tgtcctgtca gaagaacaga tccgcctgaa gaaactgaag cggcaagagg  
 551 aggaacagge tcatgccaca tcttgcccc ccaggcgttc ctcaccccc  
 601 caaatcctgc ccagctcag cccggaacaa ctgggcatga tcgagaagct  
 651 cgtcgctgcc cagcaacagt gtaaccggcg ctcttttct gaccggcttc  
 701 gagtcacgcc ttggcccactg gcaccagatc cccatagccg ggaggcccgt  
 751 cagcagcgtt ttgcccactt cactgagctg gccatcgtct ctgtgcagga  
 801 gatagttgac tttgctaaac agctaccggg cttcctgcag ctcagccggg  
 851 aggaccagat tgccctgctg aagacctctg cgatcgaggt gatgcttctg  
 901 gagacatctc ggaggtacaa ccctgggagt gagagtatca ccttcctcaa  
 951 ggatttcagt tataaccggg aagactttgc caaagcaggg ctgcaagtgg

10

20

30

40

## 【表 1 - 2】

1001 aattcatcaa ccccatcttc gagttctcca gggccatgaa tgagctgcaa  
 1051 ctcaatgatg ccgagtttgc cttgctcatt gctatcagca ttttctctgc  
 1101 agaccggccc aacgtgcagg accagctcca ggtggagagg ctgcagcaca  
 1151 catatgtgga agccctgcat gcctaogtct ccatccacca tccccatgac  
 1201 cgactgatgt tcccacggat gctaataaaa ctggtgagcc tccggaccct 10  
 1251 gagcagcgtc cactcagagc aagtgtttgc actgcgtctg caggacaaaa  
 1301 agtcccacc gctgctctct gagatctggg atgtgcacga atga

## 【 0 2 9 2 】

## 【表 2】

## 配列番号2

野生型LXR $\alpha$ の推定アミノ酸配列

20

1 MSLWLGPVP DIPDPAVEL WKPGAQDASS QAQGGSSCIL REEARMPHSA  
 51 GGTAGVBLEA AEPTALLTRA EPPSEPTAIR PQRKKGPPAP KMLGNELCSV  
 101 CGDKASGFHY NVLSCEGCKG FFRRSVIKGA HYICHSGGHC PMDTYMRKRC  
 151 QECRLRKRQ AGMREECVLS EEQIRLKKLK RQEEQAHAT SLPPRRSSPP  
 201 QILPQLSPEQ LGMIEKLVAQ QQQCNRRSFS DRLRVTPWPM APDPSREAR 30  
 251 QQRFAHFTEL AIVSVQEIVD FAKQLPGFLQ LSREDQIALL KTSVIEVMLL  
 301 ETSRRYNPGS ESITFLKDFS YNREDFAKAG LQVEFINPIF EFSRAMNELQ  
 351 LNDAEFALLI AISIFSADRP NVQDQLQVER LQHTYVEALH AYVSIHHPHD  
 401 RLMFPRMLMK LVSLRTLSSV HSEQVFALRL QDKKLPLLK EIWDVHE\*

30

40

## 【 0 2 9 3 】

## 【表 3 - 1】

## 配列番号3

LXR $\alpha$ -64をコードするcDNA 配列

1 atgtccttgt ggctgggggc cctgtgcct gacattcctc ctgactctgc  
 51 ggtggagctg tggaagccag gcgcacagga tgcaagcagc caggcccagg  
 101 gaggcagcag ctgcattcctc agagaggaag ccaggatgcc ccactctgct  
 151 gggggacttg caggggtggg gctggaggct gcagagccca cagccctgct  
 201 caccagggca gagccccctt cagaaccac agagatccgt ccacaaaagc  
 251 ggaaaaaggg gccagcccc aaaatgctgg ggaacgagct atgcagcgtg  
 301 tgtggggaca aggcctcggg cttccaactac aatgttctga gctgcgaggg  
 351 ctgcaaggga ttcttccgcc gcagcgtcat caaggagcgc cactacatct  
 401 gccacagtgg cggccactgc cccatggaca cctacatgcg tcgcaagtgc  
 451 caggagtgtc ggcttcgcaa atgccgtcag gctggcatgc gggaggagtg  
 501 tgtcctgtca gaagaacaga tccgcctgaa gaaactgaag cggcaagagg  
 551 aggaacagge tcatgccaca tccttgcccc ccaggcgttc ctcaccccc  
 601 caaatcctgc ccagctcag cccggaacaa ctgggcatga tcgagaagct  
 651 cgtcgtgccc cagcaacagt gtaaccggcg ctcttttct gaccggcttc  
 701 gagtcacgcc ttggcccatg gcaccagatc cccatagccg ggaggcccgt  
 751 cagcagcgtt ttgcccactt cactgagctg gccatcgtct ctgtgcagga  
 801 gatagttgac tttgctaaac agctaccggg ctctctgcag ctcagccggg  
 851 aggaccagat tgccctgctg aagacctctg cgatcgaggt ggctggagaa  
 901 gggcaaggga tgaagggaga agcagagtgg gattatctgt gggaggggccc  
 951 tccagacatc gagctgggag agccaaatct gctgggaagc agggatgagg

10

20

30

40

【 0 2 9 4 】

## 【表 3 - 2】

1001 agaatcggcc tccctggaag aggccatgct ccaagaccag cctcctagt  
1051 ccccgtttga ggtttgctgc ttgtgtgcag gtgatgcttc tggagacatc  
1101 tcggaggtac aaccctggga gtgagagtat caccttcctc aaggatttca  
1151 gttataaccg ggaagacttt gccaaagcag ggctgcaagt ggaattcatc  
1201 aaccccatct tcgagttctc cagggccatg aatgagctgc aactcaatga 10  
1251 tgccgagttt gccttgctca ttgctatcag catcttctct gcagaccggc  
1301 ccaacgtgca ggaccagctc caggtggaga ggctgcagca cacatatgtg  
1351 gaagccctgc atgcctacgt ctccatccac catccccatg accgactgat  
1401 gttcccacgg atgctaatga aactggtgag cctccggacc ctgagcagcg  
1451 tccactcaga gcaagtgttt gcaactgcgtc tgcaggacaa aaagctccca 20  
1501 ccgctgctct ctgagatctg ggatgtgcac gaatga

## 【 0 2 9 5 】

【表4】  
配列番号4

LXR $\alpha$ -64の推定アミノ酸配列

1 MSLWLGAPVP DIPDSAVEL WKPGAQDASS QAQGGSSCIL REEARMPHSA  
51 GGTAGVGLEA AEPTALLTRA EPPSEPTAIR PQKRKKGAP KMLGNELCSV  
101 CGDKASGFHY NVLSCEGCKG FFRRSVIKGA HYICHSGGHC PMDTYMRKRC 10  
151 QECRLRKRQ AGMREECVLS EEQIRLKKLK RQEEQAHAT SLPPRRSSPP  
201 QILPQLSPEQ LGMIEKLVAQ QQCNRRSFS DRLRVTPWPM APDPSREAR  
251 QQRFAHFTL AIVSVQEIVD FAKQLPGFLQ LSREDQIALL K TSAIEVAGE  
301 GQGMKGEAEW DYLVGPPDI ELGEPNLLGS RDEENRPPWK RPCSKTSPPS  
351 PRLRFAACVQ VMLLETSRRY NPGSESITFL KDFSYNREDF AKAGLQVEFI 20  
401 NPIFEFSRAM NELQLNDAEF ALLIAISIFS ADRENVQDQL QVERLQHTYV  
451 EALHAYVSIH HPHDRLMFPR MLMKLVSLRT LSSVHSEQVF ALRLQDKKLP  
501 PLLSEIWDVH E\*

【0296】

【表5】  
配列番号5

LXR $\alpha$ -42e<sup>+</sup>のコード領域のcDNA 配列

```

1 atgtccttgt ggctgggggc cctgtgcct gacattcctc ctgactctgc
51 ggtggagctg tggagccag gcgcacagga tgcaagcagc caggcccagg
101 gaggcagcag ctgcatcctc agagaggaag ccaggatgcc ccactctgct
151 gggggtactg caggggtggg gctggaggct gcagagccca cagccctgct
201 caccagggca gagccccctt cagaaccac agagatccgt ccacaaaagc
251 ggaaaaaggg gccagcccc aaaatgetgg ggaacgagct atgcagcgtg
301 tgtggggaca aggctcggg cttccactac aatgttctga gctgcgaggg
351 ctgcaaggga ttcttcgcc gcagcgtcat caagggagcg cactacatct
401 gccacagtgg cggcactgc cccatggaca cctacatgcg tcgcaagtgc
451 caggagtgtc ggcttcgcaa atgccgtcag gctggcatgc gggaggagtg
501 tgtcctgtca gaagaacaga tccgcctgaa gaaactgaag cggcaagagg
551 agaacaggg tcatgccaca tcttgcccc ccaggcgctc ctcaccccc
601 caaatcctgc ccagctcag cccggaacaa ctgggcatga tcgagaagct
651 cgtcgtgcc cagcaacagt gtaaccggcg ctcttttct gaccggcttc
701 gagtcaegcc ttggccatg gcaccagatc cccatagccg ggaggccctg
751 cagcagcgtc ttgccactt cactgagctg gccatcgtct ctgtgcagga
801 gatagttgac tttgctaaac agctaccggg ctctctgca ctcagccggg
851 aggaccagat tgccctgctg aagacctctg cgatecaggt gatgcttctg
901 gagacatctc ggaggtacaa cctgggagt gagagtatca cttctctcaa
951 ggatttcagt tataaccggg aagactttgc caaagcaggg ctgcaagtgg
1001 aattcatcaa cccatcttc gagttctcca gggccatgaa tgagctgcaa
1051 ctcaatgatg ccgagtttgc cttgctcatt gctatcagca tcttctctgc
1101 aggtgtggag gaggggcaat gggaaacagc aagagactta caccaaggag
1151 ggctgcaggt cccacaggaa tcggtggggg gaggggggtg gtggcttggg
1201 aggttgagg catttgctgt gttattttag

```

【0297】

【表6】  
配列番号6

LXR $\alpha$ -42e<sup>+</sup>の推定アミノ酸配列

```

1 MSLWLGA PVP DIP PDS AVEL WKPGA QDASS QAQGGSSCIL REEARMPHSA
51 GGTAGV GLEA AEPTALLTRA EPPSEPT EIR PQKRKKG PAP KMLGNELCSV
101 CGDKAS GFHY NVLSCEGCKG FFRRSVIKGA HYICHSGGHC PMDTYMRKRC
151 QECRLR KCRQ AGMREECVLS EEQIRLKKLK RQEEQAHAT SLPPRRSSPP
201 QILPQLS PEQ LGMIEKL VAA QQCNRRSFS DRLRVTPWPM APDPHSREAR
251 QQRFAHF TEL AIVSVQEIVD FAKQLPGFLQ LSREDQIAL LK TSAIEVMLL
301 ETSRRYN PGS ESITFLKDFS YNREDFAKAG LQVEFINPIF EFSRAMNELQ
351 LNDAEFALLI AISIFSAGVE EGQWETARDL HQGGLQVPQE SVGGGGWWLG
401 RVEAFV L F*

```

【0298】

【表 7】  
配列番号7

LXR $\alpha$  -42e<sup>-</sup>をコードする cDNA 配列

```

1 atgtccttgt ggctgggggc cctgtgect gacattcctc ctgactctgc
51 ggtggagctg tggaagccag gcgcacagga tgcaagcagc caggcccagg
101 gaggcagcag ctgcatcctc agagaggaag ccaggatgcc ccaactctgt
151 gggggtactg caggggtggg gctggaggct gcagagccca cagccctgtc
201 caccagggca gagccccctt cagaaccac agagatcctg ccacaaaagc
251 ggaaaaaggg gccagcccc aaaatgctgg ggaacgagct atgcagcgtg
301 tgtggggaca aggctcggg cttccactac aatgttctga gctgcgaggg
351 ctgcaaggga ttcttcgcc gcagcgtcat caagggagcg cactacatct
401 gccacagtgg cggccactgc cccatggaca cctacatgcg tcgcaagtgc
451 caggagtgtc ggcttcgcaa atgccgtcag gctggcatgc gggaggagtg
501 tgtcctgtca gaagaacaga tccgcctgaa gaaactgaag cggcaagagg
551 agaacagggc tcatgccaca tcttgcccc ccaggcgttc ctcaccccc
601 caaatcctgc ccagctcag cccggaacaa ctgggcatga tcgagaagct
651 cgtcgtgcc cagcaacagt gtaaccggcg ctcttttct gaccggcttc
701 gagtcacggg gatgcttctg gagacatctc ggaggtaaaa ccttgggagt
751 gagagtatca ccttctcaa ggatttcagt tataaccggg aagactttgc
801 caaagcaggg ctgcaagtgg aattcatcaa ccccatcttc gagttctcca
851 gggccatgaa tgagctgcaa ctcaatgatg ccgagtttgc cttgctcatt
901 gctatcagca tcttctctgc aggtgtggag gaggggcaat gggaaacagc
951 aagagactta caccaaggag ggctgcaggt cccacaggaa tcgggtggggg
1001 gaggggggtg gtggcttggg agggtggagg catttctgtg gttattttag

```

10

20

【 0 2 9 9 】

【表 8】  
配列番号8

LXR $\alpha$  -42e<sup>-</sup>の推定アミノ酸配列

```

1 MSLWLGPVP DIPPDSAVEL WKPGAQDASS QAQGGSSCIL REEARMPHSA
51 GGTAGVBLEA AEPTALLTRA EPPSEPTEIR PQKRKKG PAP KMLGNELCSV
101 CGDKASGFHY NVLSCEGCKG FFRRSVIKGA HYICHSGGHC PMDTYMRRKC
151 QECRLRKCRQ AGMREECVLS EEQIRLKKLK RQEEQAHAT SLPPRRSSPP
201 QILPQLSPEQ LGMIEKLVAQ QQCNRRSFS DRLRVTVMML ETSRRYNPGS
251 ESITFLKDFS YNREDFAKAG LQVEFINPIF EFSRAMNELQ LNDAEFALLI
301 AISIFSAGVE EGQWETARDL HQGGLQVPQE SVGGGGWWLG RVEAFVFLF*

```

30

40

【 0 3 0 0 】



## 【表 9】

## 配列番号9

フォワードプライマー、LXR $\alpha$ -Forのヌクレオチド配列

5'-CGGTCGACATGTCCTTGTGGCTGGGG

## 【0301】

## 【表 10】

## 配列番号10

10

リバースプライマー、LXR $\alpha$ -Revのヌクレオチド配列

5'-CAGCGGCCGCTTCGTGCACATCCCAGATCTC

## 【0302】

## 【表 11】

## 配列番号11

20

フォワードプライマー、L64-Forのヌクレオチド配列

5'-TGGGAAGCAGGGATGAGG-3'

## 【0303】

## 【表 12】

## 配列番号12

30

リバースプライマー、L64-Revのヌクレオチド配列

5'-GAGGGCTGGTCTTGGAGCA-3'

## 【0304】

## 【表 13】

## 配列番号13

L64 TaqMan プローブのヌクレオチド配列

40

FAM-TCGGCCTCCCTGGAAGAGGCC-TAMRA

## 【0305】

【表 1 4】  
配列番号14

実施例6に記載のルシフェラーゼアッセイ用のLXR $\alpha$  プロモーター配列の部分

1 tgggaactgg agttcatagc aaaacagga gagccgggtga gcaggaaact  
51 gggaatgggg caggggggtga atgaccagca gtaacctcag cagcttgccct  
101 cccacatctg gactggagca tetgcagggt tctcagcctc tccccgttag  
151 cccaccagcc ctggctgctt ccattacagc acttcaactgg cccaagacgc  
201 aacaagacaa gattgtcctg gactctgaca cagcaaaggg actggagtgga  
251 ggacatctgg gttctgatcc cagcccagcc actaactgtg tggctcttgg

10

【0 3 0 6】

【表 1 5】  
配列番号15

LXR 応答要素 (LXRE) のヌクレオチド配列

5' -AGGTCAAnnnnAGGTCA-3'

20

【0 3 0 7】

【表 1 6】  
配列番号16

野生型LXR $\alpha$ のエキソン6および7を連結するより長い新規エキソン6を形成するLXR $\alpha$ -64バリエーション特有のヌクレオチド配列

GCTGGAGAAG GGCAAGGGAT GAAGGGAGAA GCAGAGTGGG ATTATCTGTG GGAGGGGCCT  
CCAGACATCG AGCTGGGAGA GCCAAATCTG CTGGGAAGCA GGGATGAGGA GAATCGGCCT  
CCCTGGAAGA GGCCATGCTC CAAGACCAGC CCTCCTAGTC CCCGTTTGAG GTTTGCTGCT  
TGTGTGCAGG TG

30

【0 3 0 8】

【表 1 7】  
配列番号17

配列番号16にコードされる推定アミノ酸配列

VAGEGQGMKGEAEWDYLWEGPPDIELGEPNLLGS RDEENRPPWKRPCSKTSPSPRLRFAACVQ

40

【0 3 0 9】

## 【表 1 8】

配列番号18

野生型LXR $\alpha$ のエキソン8を含みより長いエキソン8 LXR $\alpha$ -42 バリアントを作る新規エキソン8を形成するLXR $\alpha$ -42e特有のヌクレオチド配列

GTGTGGAGGA GGGGCAATGG GAAACAGCAA GAGACTTACA CCAAGGAGGG CTGCAGGTCC  
CACAGGAATC GGTGGGGGGA GGGGGGTGGT GGCTTGGGAG GGTGGAGGCA TTTGCTGTGT  
TATTTTAGGA TGAGAGAGCT TGGCTGGAGC ATGTCTCTAT ATTTTGGTTG CAATTTGGGG  
TATGGAAGCTG GACCCTGGCC AGACCTGCTC CTCAACTCTC TTGGTGACCT ATAG

10

## 【 0 3 1 0 】

## 【表 1 9】

配列番号19

配列番号18にコードされる推定アミノ酸配列

GVEEGQWETARDLHQGGLQVPQESVGGGGWWLGRVEAFVLF

## 【 0 3 1 1 】

20

## 【表 2 0】

配列番号20

LXR $\alpha$  プロモーターにおけるLXR 応答要素 (LXRE)のヌクレオチド配列

5'-TGACCAgcaGTAACCT-3'

## 【 0 3 1 2 】

## 【表 2 1】

30

配列番号21

L42-Forのヌクレオチド配列

5'-GGTGGAGGCATTTGCTGTGT-3'

## 【 0 3 1 3 】

## 【表 2 2】

40

配列番号22

L42-Revのヌクレオチド配列

5'-CCCAAATTGCAACCAAATATAGA-3'

## 【 0 3 1 4 】

【表 2 3】  
配列番号23

L42 プローブのヌクレオチド配列

FAM-TTTAGGATGAGAGAGCTTGGCTGGAGCAT-TAMRA

【0315】

その他の態様

本発明をその詳細な説明と結びつけて記載したが、上記記載は例示のためのものであり、添付の特許請求の範囲に記載の本発明の範囲を限定するものではないことを理解されたい。その他の側面、利点、および修飾は添付の特許請求の範囲の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【0316】

【図 1】図 1A は、野生型 LXR (ネイティブ) cDNA とバリエーション LXR<sup>-64</sup> cDNA の一部との配列比較を示す。図 1B は、ヒト LXR (ネイティブ) の推定アミノ酸配列と図 1A における配列に対応する LXR<sup>-64</sup> との配列比較を示す。

【図 2】図 2A は、野生型 LXR cDNA の一部と新規バリエーション LXR<sup>-42e+</sup> cDNA の一部との配列比較を示す。図 2B はヒト LXR (野生型) と LXR<sup>-42e+</sup> の推定アミノ酸配列の配列比較を示す。

【図 3】図 3A は、野生型 LXR cDNA の一部と新規バリエーション LXR<sup>-42e-</sup> cDNA の一部との配列比較を示す。図 3B は野生型 ヒト LXR と LXR<sup>-42e-</sup> の推定アミノ酸配列の配列比較を示す。

【図 4】図 4 は LXR<sup>-64</sup> mRNA の模式図である。

【図 5】図 5 は LXR<sup>-42e+</sup> mRNA の模式図である。

【図 6】図 6 は LXR<sup>-42e-</sup> mRNA の模式図である。

【図 7】図 7A は様々な組織における LXR<sup>-64</sup> の RNA 相対発現をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。図 7B は様々な組織における LXR<sup>-42</sup> (LXR<sup>-42e+</sup> および LXR<sup>-42e-</sup> を組み合わせた) の RNA 相対発現をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。

【図 8】図 8A は THP-1 細胞における LXR<sup>-64</sup> の RNA 発現の遺伝子調節をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。図 8B は THP-1 細胞における LXR<sup>-42</sup> の RNA 発現の遺伝子調節をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。

【図 9】図 9 はレポーター遺伝子の LXR リガンド-依存的活性化の LXR<sup>-64</sup> および LXR<sup>-42</sup> による阻害をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。

【図 10】図 10 は LXR<sup>-64</sup> および LXR<sup>-42</sup> によるレポーター遺伝子の LXR リガンド-依存的活性化の阻害をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。

【図 11】図 11 は RXR (RXRa)、野生型 LXR (LXRa) および RXR、または LXR<sup>-64</sup> (L64) および RXR をコードする発現ベクターでトランスフェクトされた HEK293 細胞における、LXR アゴニスト (T0901317)、RXR アゴニスト (9RA)、または両アゴニストの存在下または非存在下における SREBP-1C 発現をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。

【図 12】図 12 は、RXR (RXRa)、野生型 LXR (LXRa) および RXR、または LXR<sup>-64</sup> (L64) および LXR をコードする発現ベクターでトランスフェクトした HEK293 細胞における LXR アゴニスト (T0901317)、RXR アゴニスト (9RA)、または両アゴニストの存在下または非存在下での ABCA1 発現をアッセイした実験結果を示す棒グラフである。

10

20

30

40

【 図 1 A 】

801 gatagttgacttctaaacagctaccocgggttccctcagcctcagccggg 850  
 |||||  
 801 gatagttgacttctaaacagctaccocgggttccctcagcctcagccggg 850  
 |||||  
 851 aggaccagattgcccctgctgaagacctctggatcg..... 886  
 |||||  
 951 aggaccagattgcccctgctgaagacctctggatcgagggtgctggagaa 900 (配列番号: 25)

887 .....aggtagctctctggagacatc 908  
 |||||  
 1051 ccccgttgggttctgctgtgagcgggtgctctctggagacatc 1100

909 tcggaggctacaacocctgggagtgagatcacctctccaaggattcca 958 (配列番号: 24)  
 |||||  
 1101 tcggaggctacaacocctgggagtgagatcacctctccaaggattcca 1150 (配列番号: 26)

FIG. 1A

【 図 1 B 】

251  
 CQRFAHFTEL AIIVSQRIVD FAKQLGFELQ ILSREDTALL KTSRAIR... 300  
 CQRFAHFTEL AIIVSQRIVD FAKQLGFELQ ILSREDTALL KTSRAIRVAGE

301  
 .....  
 GCGMKGEAW DYLMWGFPI ELGHEFNLIQS ROENRPPWK RPCSKTSPPS

351  
 ..... VMLETSRRY NFGSBSITFL KDFSNAREDF AKAGLQVEFI 400  
 PELEFRACIQ VMLETSRRY NFGSBSITFL KDFSNAREDF AKAGLQVEFI

401  
 NPIFESRAM NELQINDAEF ALLIAISIFS ADRENVDOL OVERLQHYIV (配列番号: 27)  
 NPIFESRAM NELQINDAEF ALLIAISIFS ADRENVDOL OVERLQHYIV (配列番号: 28)

FIG. 1B

【 図 2 A 】

1001 aattcatcaaccccatcttcgggttctccaggcccatgaaatgagctgcaa 1050  
 |||||  
 821 aattcatcaaccccatcttcgggttctccaggcccatgaaatgagctgcaa 870  
 |||||  
 1051 ctcaatgatccgggttgcctctgctcaatctgctatcagcattctctctgc 1100  
 |||||  
 871 ctcaatgatccgggttgcctctgctcaatctgctatcagcattctctctgc 920 (配列番号: 30)

1101 .....agacggcccaacgctg 1116  
 |||||  
 1121 ccagacctgctcctcaactctcttggtagcctatagacggcccaacgctg 1170

1117 caggaccgctccaggctggaggctgcagcacacatattggagaccct 1166 (配列番号: 29)  
 |||||  
 1171 caggaccgctccaggctggaggctgcagcacacatattggagaccct 1220 (配列番号: 31)

FIG. 2A

【 図 2 B 】

301 ETSRYNFGSBSITFLKDFSNAREDFAKAGLQVEFINPIFESRAMNELQ 350  
 |||||

301 ETSRYNFGSBSITFLKDFSNAREDFAKAGLQVEFINPIFESRAMNELQ 350  
 |||||

351 LINDAEFALLIAISIFSA..... 367  
 |||||

351 LINDAEFALLIAISIFSAVEGQWEIARDLHOGGLOVFOESYGGGGWILG 400  
 .....DRENVQDLQVERLQHTVVEALHAYVSIHHPDRLMFFRM 407

401 RVERFAMLF\*..... 409 (配列番号: 33)

408 LMKLVSLRTLSSVHSQVFAFLQDKLPLFLSEIWDVHE 447 (配列番号: 32)  
 .....

FIG. 2B

【 図 3 A 】

```

651 cgtcctccaccagcaagctgtaaccggcggtctcttttctgaccggcttc 700
|||||
651 cgtcctccaccagcaagctgtaaccggcggtctcttttctgaccggcttc 700
701 gagtcacccttggcccatggcaccagatcccacatgcccggaggccgt 750 (配列番号: 34)
|||||
701 gagtcac..... 707

851 aggcaccagattgccctgctgaagacctgctgcatgagctcatctcttg 900 (配列番号: 41)
|||||
708 .....ggtagctcttcg 720 (配列番号: 35)

1051 ctcaatgatgagttgtcttctgctcattgctcaccagatctctctcgc 1100
|||||
871 ctcaatgatgagttgtcttctgctcattgctcaccagatctctctcgc 920 (配列番号: 36)

1101 .....agaccggcccaactg 1116
|||||
1121 ccagacctgctcctcaactctcttgggtgacctatagaccggcccaactg 1170

1117 cagaccgctcagctgagcggctgagcagcagcagcagcagcagcagcct 1166 (配列番号: 37)
|||||
1171 caggaccgctcagcggctgagcagcagcagcagcagcagcagcagcct 1220 (配列番号: 38)

```

FIG. 3A

【 図 3 B 】

```

151 QERLEKQWREBCHVSEBQIRLAKLRQEBEQWATSLFPRSSPP 200
|||||
151 QERLEKQWREBCHVSEBQIRLAKLRQEBEQWATSLFPRSSPP 200
201 QILFQISEFQYQWLEKLVAAQQQRNSRSLRVTFWVAFDPSREAR 250
|||||
201 QILFQISEFQYQWLEKLVAAQQQRNSRSLRVTFWVAFDPSREAR 250
251 QPERAFTEALVSVQEVVDVWVQLPGLQSRDQVALLKLSAEVWLL 300
|||||
237 .....VLL 240

301 ETSRVNPSSESTLFLKQPSVNEEDPAKGLQVEFVNEFESRANNEIQ 350
|||||
241 ETSRVNPSSESTLFLKQPSVNEEDPAKGLQVEFVNEFESRANNEIQ 290

351 INDAGEALLAISIFSA..... 367
|||||
291 INDAGEALLAISIFSAQVSESGVNEHARDVGGELQVPSVGGSGWLLG 340
|||||
368 .....DRENVQDLQVERLQHYVVEALHAYVSLHEDHRLVFRFM 407
341 KVERAFVLE*..... 349 (配列番号: 40)
408 IMLVSLKILSVHSVRFALRQDKKLPILSEIWDVHE 447 (配列番号: 39)
.....

```

FIG. 3B

【 図 4 】

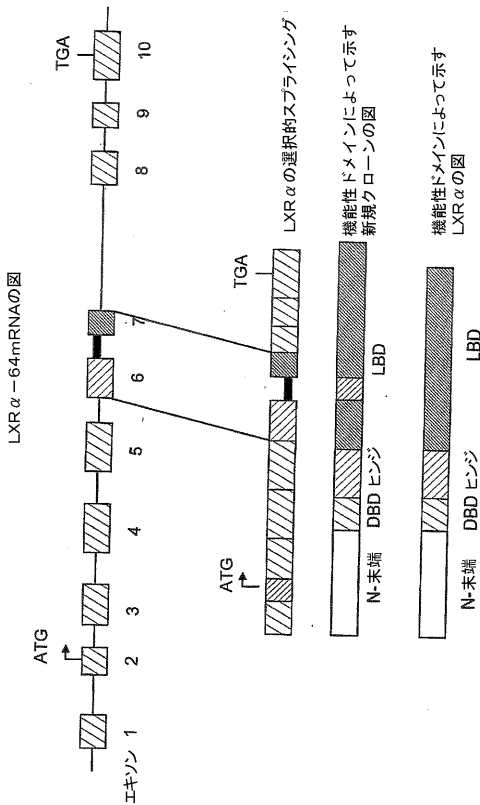


FIG. 4

【 図 5 】

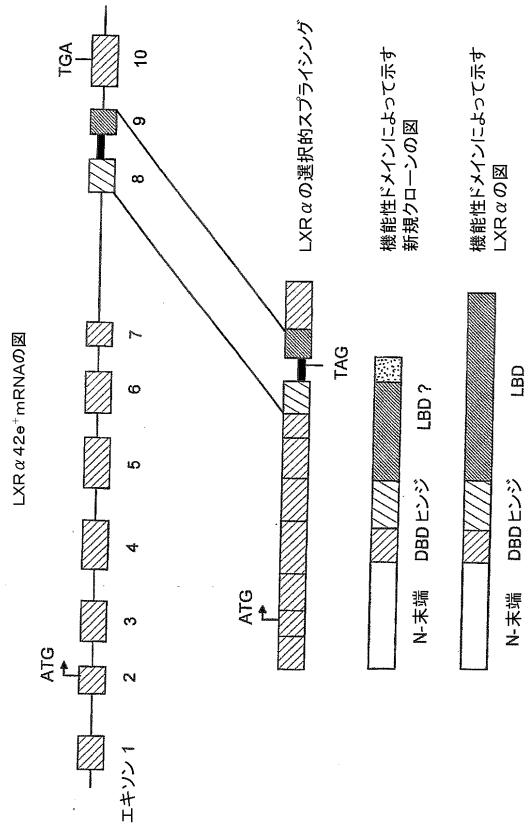


FIG. 5



【 図 9 】

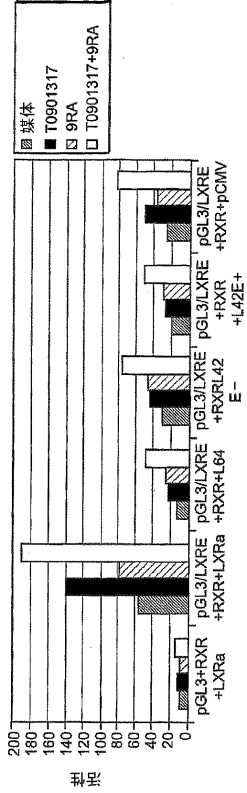


FIG.9

【 図 10 】

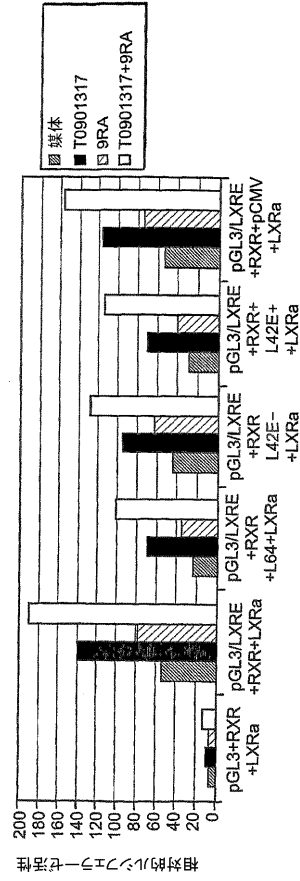


FIG.10

【 図 11 】

LXRaおよびL64/リアントによりトランスフェクトされた293細胞におけるSREBP-1c発現

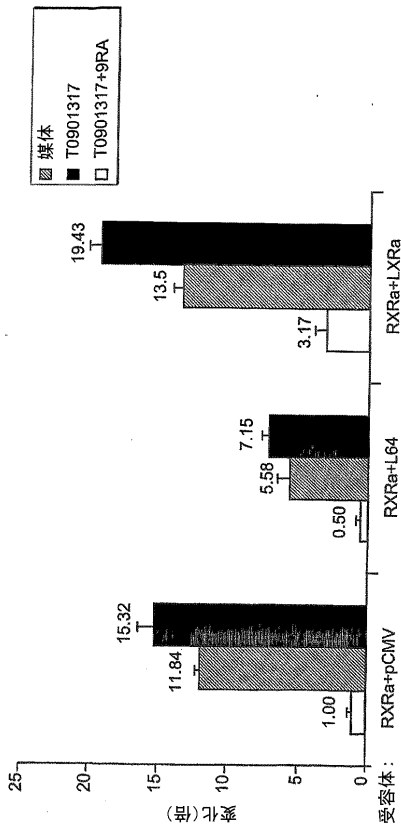


FIG. 11

【 図 12 】

LXRaおよびL64/リアントによりトランスフェクトされた293細胞におけるABCA1発現

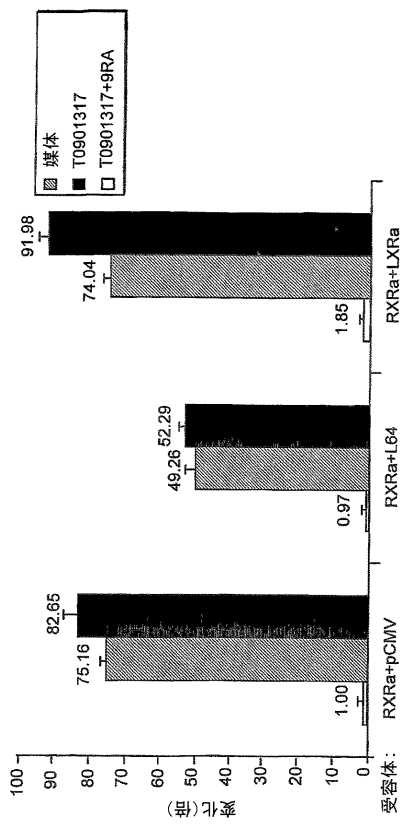


FIG. 12



【手続補正書】

【提出日】平成18年6月27日(2006.6.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2007531502000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N	1/19	
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N	1/21	
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N	5/00	A
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	D
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	M
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K	37/02	
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P	43/00	1 1 1
	A 6 1 K	48/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 リュー・キアン - ユアン

アメリカ合衆国 1 9 3 8 2 ペンシルベニア州ウエスト・チェスター、フォー・イン・ハンド・コート 2 0 8 番

(72) 発明者 ポナル・ナンビ

アメリカ合衆国 1 9 3 1 2 ペンシルベニア州バーウィン、ラッドビル・サークル 1 4 3 0 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA63 CA02 DA01 DA02 DA05 DA11 DA12  
 EA04 GA11 GA13 HA08 HA12  
 4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR42 QR50  
 QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS28 QS34 QS39 QX02  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA01X AA57X AA77X AA90X AA90Y  
 4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 NA14 ZC022  
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 CA40 EA20 EA50 FA72 FA74