

(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2006-502697

(P2006-502697A)

(43) 公表日 平成18年1月26日(2006.1.26)

|                                   |                       |             |
|-----------------------------------|-----------------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                      | F I                   | テーマコード (参考) |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>    | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 2 G O 4 5   |
| <b>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</b>  | A 6 1 K 31/7088       | 4 B O 2 4   |
| <b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>    | A 6 1 K 45/00         | 4 B O 6 3   |
| <b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>    | A 6 1 K 48/00         | 4 B O 6 4   |
| <b>A 6 1 P 3/04 (2006.01)</b>     | A 6 1 P 3/04          | 4 B O 6 5   |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 72 頁) 最終頁に続く |                       |             |

|               |                              |          |                         |
|---------------|------------------------------|----------|-------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2003-573025 (P2003-573025) | (71) 出願人 | 501487003               |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年3月3日 (2003.3.3)         |          | プロテミックス コーポレイション リミ     |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成16年11月1日 (2004.11.1)       |          | ティド                     |
| (86) 国際出願番号   | PCT/NZ2003/000039            |          | ニュージーランド国, オークランド, クイ   |
| (87) 国際公開番号   | W02003/074559                |          | ーン ストリート 1 5 1, レベル 2 8 |
| (87) 国際公開日    | 平成15年9月12日 (2003.9.12)       | (74) 代理人 | 100099759               |
| (31) 優先権主張番号  | 60/361, 152                  |          | 弁理士 青木 篤                |
| (32) 優先日      | 平成14年3月1日 (2002.3.1)         | (74) 代理人 | 100077517               |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 石田 敬                |
|               |                              | (74) 代理人 | 100087413               |
|               |                              |          | 弁理士 古賀 哲次               |
|               |                              | (74) 代理人 | 100082898               |
|               |                              |          | 弁理士 西山 雅也               |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F A L P タンパク質

(57) 【要約】

インスリンへの応答を示す新規の脂肪組織の低分子量タンパク質 (FALPs) が、記載されている。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

肥満、肥満関連症状、そしてGLUT4の転移及びホルモンの分泌を含む脂肪細胞の細胞内の輸送経路に関する症状、インスリン耐性、タイプII型糖尿病、高血圧、異状脂肪血症、並びに/或いはインスリン耐性及び/又は症候群Xに対するその他の症状を、FALPの発現又は活性の下限調節により治療する方法。

## 【請求項 2】

薬剤と組成物とを接触させることを含む、FALPの調節に有効な薬剤(agents)をスクリーニングし、そしてその薬剤(agent)に応答したFALPの活性又は発現の変化を検出する方法。

10

## 【請求項 3】

FALPポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド又はFALPポリペプチドをコードする配列に相補的な単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 4】

細胞中のポリヌクレオチドの発現を高めるプロモータや他の配列に作用可能に結合された請求項 3 記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

FALPポリペプチド又はその断片を発現できる組み換え型ベクター。

## 【請求項 6】

組み換え型FALPポリヌクレオチドを含み、バクテリア、真核細胞、哺乳動物又はヒトの細胞を含むがそれに限定されない細胞。

20

## 【請求項 7】

ポリペプチドを発現する条件下で、組み換え型FALPポリヌクレオチドを含む細胞を培養し、FALPたんぱく質、ペプチド、又は融合たんぱく質を生成する方法。

## 【請求項 8】

単離された実質的に純粋な合成の、又は組み換え型のFALPポリペプチド、又はその免疫原又は機能的な断片又はバリエーション。

## 【請求項 9】

配列番号11、配列番号14、配列番号17、及び配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項8記載のポリペプチド。

30

## 【請求項 10】

配列番号11、配列番号14、配列番号17、及び配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸から、保存的変異により相違するアミノ酸配列を有し、それが基準配列と少なくとも60%同一で、そして/又はそれが、天然に存在する全長のFALPポリペプチドと免疫的に交差反応する単離されたポリペプチド。

## 【請求項 11】

配列番号11、配列番号14、配列番号17、及び配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸から、保存的変異により相違するアミノ酸配列を有し、それが基準配列と少なくとも80%同一で、そして/又はそれが、天然に存在する全長のFALPポリペプチドと免疫的な交差反応による単離されたポリペプチド。

40

## 【請求項 12】

配列番号11、配列番号14、配列番号17、及び配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸から、保存的変異により相違するアミノ酸配列を有し、それが基準配列と少なくとも90%同一であり、そして/又はそれが、天然に存在する全長のFALPポリペプチドと免疫的に交差反応する単離されたポリペプチド。

## 【請求項 13】

融合タンパク質であるFALPポリペプチド又はその免疫原の又は機能としての断片。

## 【請求項 14】

本発明のFALPポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体又は抗体の断片。

## 【請求項 15】

50

モノクローナルである請求項14記載の抗体。

【請求項16】

少なくとも約 $10^8 \text{ M}^{-1}$ の親和性で結合される請求項14又は15記載の抗体。

【請求項17】

ヒト又はヒト様に生成された請求項14記載の抗体。

【請求項18】

請求項14記載の抗体を分泌できる単離された細胞又はハイブリドーマ。

【請求項19】

試料中のFALP遺伝子産生物を検出する方法において、

(a)遺伝子産生物を特異的に結合するプローブ又はプライマーとその試料とを接触させ、そこではプローブ又はプライマー、及び遺伝子産生物が複合体を形成し、そしてその複合体の生成物を検出する工程、あるいは(b)ここでは前記遺伝子産生物がポリヌクレオチドである生物試料中の遺伝子産生物を特異的に増幅させ、そして増幅した産生物を検出する工程、すなわちここで生成する複合体又は存在する増幅産生物が、存在する生物的試料のFALP遺伝子産生物と相関関連がある、  
ことを特徴とする検出する方法。

【請求項20】

遺伝子産生物がポリペプチドで、そしてプローブが抗体である請求項19記載の方法。

【請求項21】

遺伝子産生物がRNAで、そしてプローブ又はプライマーがポリヌクレオチドである請求項19記載の方法。

【請求項22】

FALPを含む組成物と試験化合物を接触させ、そして試験化合物の存在時に生ずるが、存在しない時に生じないという生物的影響を評価することにより、FALP活性の調節剤を同定する方法であって、ここで生物的影響を誘発する試験化合物が、FALP活性の調節剤として同定されることを特長とする方法。

【請求項23】

FALPを含む組成物が、FALPポリペプチドを発現する細胞である請求項22記載の方法。

【請求項24】

FALPを含む組成物が、組み換え型FALPポリペプチドを発現する細胞である請求項22記載の方法。

【請求項25】

FALPを含む組成物が、FALPポリペプチドを発現する細胞であり、そして生物的影響は、インスリンにより惹起されるFALPポリペプチドの再分配である請求項22記載の方法。

【請求項26】

FALPを含む組成物が、FALPポリペプチドを発現する3T3 L1の脂肪細胞であり、そして生物的影響が、インスリンにより惹起されるFALPポリペプチドの再分配である請求項25記載の方法。

【請求項27】

医薬として使用するためのFALP活性の調節剤を生成することにより医薬的組成物を作成する方法。

【請求項28】

医薬として使用するためのFALP活性の調節剤を生成することにより医薬組成物を作成するための方法において、ここで前記調節剤が、請求項22記載の方法により同定されることを特徴とする方法。

【請求項29】

FALP介在の疾患及び症状を治療するため有効な化合物を、その化合物がFALP遺伝子産生物と相互作用するかどうかを決定することにより、同定するための方法。

【請求項30】

FALP遺伝子産生物がポリペプチドで、そして相互作用が、生化学的又は物理的手段によ

り決定されることを特徴とする請求項29記載の方法。

【請求項31】

哺乳動物の細胞又は組織中で、FALPの活性又は発現を減少又は増大させることにより、或いは哺乳動物へFALP活性の調節剤を投与することにより、哺乳動物における肥満、肥満に関連した症状、及びGLUT4の転移及びホルモン分泌などの脂肪細胞の細胞内の輸送経路に関連した症状、インスリン耐性、II型糖尿病、高血圧、異常脂質血症、並びに/あるいはインスリン耐性及び/又はシンドロームXに関連した他の症状などを含むがそれに限定されないFALP介在の症状を治療する方法。

【請求項32】

肥満、肥満関連症状、及びGLUT4の転移及びホルモン分泌などの脂肪細胞の細胞内の輸送経路に関連した症状、インスリン耐性、II型糖尿病、高血圧、異常脂質血症、並びに/或いはインスリン耐性、及び/又はシンドロームXに関連した他の症状などの治療への適した薬物の調製における何らかの医薬的に受け入れ可能な賦形剤、希釈剤、担体、補活性剤などと共にFALP遺伝子産生物の使用。 10

【請求項33】

FALP遺伝子産生物が、FALPポリペプチド又はその免疫原としての又は機能的断片又はバリエーションである請求項32記載の使用。

【請求項34】

FALPポリペプチドが、ここに記載された1つと同一性を有するアミノ酸配列を有する請求項33記載の使用。 20

【請求項35】

肥満、肥満関連症状、及びGLUT4の転移及びホルモン分泌などの脂肪細胞の細胞内の輸送経路に関連した症状、インスリン耐性、II型糖尿病、高血圧、異常脂質血症、並びに/或いはインスリン耐性及び/又はシンドロームXに関連した他の症状などの治療への適した医薬物の調製における何らかの医薬的に受け入れ可能な賦形剤、希釈剤、担体、補活性剤などと共にFALPポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、或いはコード配列に相補的な単離されたポリヌクレオチドの使用。

【請求項36】

FALPポリヌクレオチドをターゲッティング又はハイブリットできる、抗センス、トリプレックス、リボザイム、又はRNA-iポリヌクレオチドから成る群から選択されるポリヌクレオチド。 30

【請求項37】

ポリヌクレオチドが、抗センス、トリプレックス、リボザイム、又はRNA-iポリヌクレオチドである請求項35記載の使用。

【請求項38】

肥満、肥満関連症状、及びGLUT4の転移及びホルモン分泌などの脂肪細胞の細胞内の輸送経路に関連した症状、インスリン耐性、II型糖尿病、高血圧、異常脂質血症、並びに/あるいはインスリン耐性及び/又はシンドロームXに関連した他の症状などの治療への適切な医薬物の調製において、医薬的に受け入れ可能な賦形剤、希釈剤、担体、補活性剤などと共に2のFALPポリペプチドをターゲッティング又はハイブリッドできる抗センス、トリプレックス、リボザイム又はRNA-iポリヌクレオチドから成る群から選択される抑制的ポリヌクレオチドの使用。 40

【請求項39】

ポリヌクレオチドが、抗センス又はトリプレックスのポリヌクレオチドである請求項38記載の使用。

【請求項40】

肥満、肥満関連症状、及びGLUT4の転移及びホルモン分泌などの脂肪細胞の細胞内の輸送経路に関連した症状、インスリン耐性、II型糖尿病、高血圧、異常脂質血症、並びに/或いはインスリン耐性及び/又はシンドロームXに関連した他の症状などの治療への適切な医薬物の調製において、何か医薬的に受け入れ可能な賦形剤、希釈剤、担体、補活性剤な 50

どと共にFALPに特異的に結合可能な抗体又は抗体の断片又は結合断片の使用。

【請求項 4 1】

肥満、肥満関連症状、及びGLUT4の転移及びホルモン分泌などの脂肪細胞の細胞内の輸送経路に関連した症状、インスリン耐性、II型糖尿病、高血圧、異常脂質血症、並びに/或いはインスリン耐性及び/又はシンドロームXに関連した他の症状などの治療への適切な医薬物の調製に、医薬的に受け入れ可能ないずれかの賦形剤、希釈剤、担体、補活性剤などと共にFALP活性の調節剤の使用。

【請求項 4 2】

肥満、肥満関連症状、及びGLUT4の転移及びホルモン分泌などの脂肪細胞の細胞内の輸送経路に関連した症状、インスリン耐性、II型糖尿病、高血圧、異常脂質血症、並びに/或いはインスリン耐性及び/又はシンドロームXに関連した他の症状などの治療での使用において、その他の有効な投与単位の方法又は材料群(賦形剤、補活性剤、希釈剤のいずれか、及び/又は投与量単位にて定義された容器)を伴う製造における、FALP遺伝子産物の有効量の使用。

10

【請求項 4 3】

FALP遺伝子産物が、FALPポリペプチド又は免疫原、又は機能的な断片、或いはそのバリエーションである請求項40記載の使用。

【請求項 4 4】

肥満、肥満関連症状、及びGLUT4の転移及びホルモン分泌などの脂肪細胞の細胞内の輸送経路に関連した症状、インスリン耐性、II型糖尿病、高血圧、異常脂質血症、並びに/或いはインスリン耐性及び/又はシンドロームXに関連した他の症状への治療における使用のため有効な投与の単位量として、他の材料又は材料群(賦形剤、補活性剤、希釈剤のいずれか、及び/又は投与量の単位で定義された容器)を伴う製造における、FALP活性調節剤の有効量の使用。

20

【請求項 4 5】

FALP遺伝子産物、そして/又はFALP活性の調節剤を含む容器；FALP活性の調節剤を使用する指示、及び/又は肥満、肥満関連症状、及びGLUT4の転移及びホルモン分泌などの脂肪細胞の細胞内の輸送経路に関連した症状、インスリン耐性、II型糖尿病、高血圧、異常脂質血症、並びに/或いはインスリン耐性及び/又はシンドロームXに関連した他の症状などの治療における使用のための有効なFALP活性の調節剤を含む製造物。

30

【請求項 4 6】

肥満、肥満関連症状、及びGLUT4の転移、及びホルモン分泌などの脂肪細胞の細胞内の輸送経路に関連した症状、インスリン耐性、II型糖尿病、高血圧、異常脂質血症、並びに/或いはインスリン耐性、及び/又はシンドロームXに関連した他の症状などの治療における有効な投与量単位であり、前記投与量単位が、任意の適切な医薬的に受け入れ可能な賦形剤、希釈剤、担体、補活性剤と共にFALP遺伝子産物及び/又はFALP活性の調節剤の有効量、そして/又は前記有効量のための何れか適切な容器であることを特徴とする投与量単位。

【請求項 4 7】

FALPを調節する請求項22記載の方法の生成物。

40

【請求項 4 8】

FALP免疫アッセイ。

【請求項 4 9】

FALPプローブ。

【請求項 5 0】

FALPプライマー。

【請求項 5 1】

FALPクローニング・ベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

## 【0001】

本発明は、特定の脂肪細胞関連タンパク質、その断片、バリエーション、及び誘導体に関する。さらに本発明は、こうしたタンパク質を含む組成物、タンパク質及び組成物を作成する方法、及びこうしたタンパク質及び組成物を使用する方法、たとえば活性を調節する化合物を同定し、そしてそれを評価するための方法に関する。

## 【0002】

技術的背景

## 【背景技術】

## 【0003】

以下の記載は、本発明の理解に有益な情報を含む。本明細書に提供される任意の情報が、現段階の記載され又は要求される発明に対し先行技術又は関連技術であり、又は特定の又は示唆的に引用される任意の刊行物又は文献が、先行技術であることは、認められない。

10

## 【0004】

最近の記載によれば脂肪組織では、エネルギー代謝の調節に重要な役割を果たしていることが示され、そしてその機能障害により、インスリン耐性、及びタイプ2の糖尿病及び種々の心臓血管症など、その関連罹病率の有意な要因であると言われている。Bergman, R.N., *ら*, *Journal of Investigative Medicine* 49, 119-26 (2001); Hotamisligil, G.S., *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorder* 24, S23-7 (2000)を参照。脂肪の質量の変化とインスリンの感受性との間に存在する密接な関係が記載されている。Kahn, B.B. and Flier, J.S., *Journal of Clinical Investigation* 106, 473-81 (2000)を参照、そしてインスリン耐性及び高インスリン血症が、肥満個体及び脂肪異常栄養症の個体に存在すると記載されている。Reue, K. and Peterfy, M. *Current Atherosclerosis Reports* 2, 390-6 (2000); Hegele, R.A., *Current Atherosclerosis Reports* 2, 397-404 (2000)を参照。インスリン感受性の調節への脂肪細胞の中核的役割は、重篤なインスリン耐性及び高血糖症の脂肪を削除されたマウスの最近における2種類の独立した遺伝子研究で裏付けられていると報告されている。Moitra, J., *ら*, *Genes & Development* 12, 3168-81 (1998); Shimomura, I., *ら*, *Genes & Development* 12, 3182-94 (1998)を参照。さらに脂質細胞の転写による調節を標的とするインスリン感受性薬剤が、脂質細胞の機能にインスリン感受性を結合すると言われている。Spiegelman, B.M., *Diabetes* 47, 507-14 (1998)を参照。

20

30

## 【0005】

*in vitro*において白色の脂肪細胞に分化する不死の細胞株の利用性に伴い、脂質細胞の研究が広がる範囲となった。Cornelius, P., *ら*, *Annual Review of Nutrition* 14, 99-129 (1994)を参照。定義されている培地に培養すると、前駆脂肪細胞、3T3 L1が、細胞質の脂質小滴にトリグリセリドを貯蔵し、さらに*in vivo*において脂質細胞に発現される遺伝子を発現する。多様な遺伝子を基にした方法が導かれ、脂肪変換中に活性化されるといわれる複合体の転写カスケードにおける種々の転写因子を同定することが、記載されている。Rosen, E.D. and Spiegelman, B.M., *Annual Review of Cell & Developmental Biology* 16, 145-71 (2000); Wu, Z., *ら*, *Current Opinion in Cell Biology* 11, 689-94 (1999)を参照。こうした因子には、ペルオキシソム・増殖因子・活性化受容体  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ )、CCAAT/エンハンサー結合タンパク質 (C/EBP)、及び脂肪細胞の分化及び決定因子1 (ADD1)-ステロール調節要素の結合タンパク質1c (SREBPc)があげられる。これらの転写因子の逐次的活性 (sequential activation) が、酵素、構造タンパク質、ホルモン受容体、及びパラクリン及びエンドクリンに関与される種々の分泌因子を含む脂肪細胞特異的遺伝子の発現を誘発すると、記載されている。Soisky, A., *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 36, 1-34 (1999); Takahashi, M., *Nippon Rinsho-Japanese Journal of Clinical Medicine* 59, 504-8 (2001)を参照。

40

## 【0006】

脂肪細胞特異的遺伝子の分子の特徴付けが、デファレンシャル・ハイブリット形性法 (differential hybridization)、サブトラクション・クローニング法、ショットガン技法、

50

及びマイクロアレイ分析などの遺伝子による方法を基盤とし、Baulande,S.ら、Journal of Biological Chemistry 276,33336-44(2001);Scherer,P.E.,ら、Journal of Biological Chemistry 270,26746-26749(1995);Soukas,A.,ら、Journal of Biological Chemistry 276,34167-74(2001)を参照、そして最近脂肪組織が、最近レプチン、アジポネクチン、アジプシン、TNF $\alpha$ 及びレススチンなどの種々のタンパク質を分泌するエンドクリン組織として論じられている。Fruhbeck,G.ら、American Journal of Physiology-Endocrinology & Metabolism 280,E827-47(2000);Steppan,C.M. and Lazar,M.A.,Trend in Endocrinology & Metabolism 13,18-23(2002)を参照。in vivoとin vitroの両方の研究により報告的に示してあるが、脂肪性の細胞から脂肪性サイトカインの分泌には、2種の区分、構成及び調節を有している。Bradley,R.L.ら、Recent Progress in Hormone Research 56,329-58を参照。レプチン(Barr,V.A.ら、Endocrinology 138,4463-72(1997))、アジポネクチン(Bogan,J.S. and Lodish,H.F.(1999)Journal of Cell Biology 146,609-20及びアジピシン(Kitagawa,K.,Rosen,B.S.,Spiegelman,B.M.,Lienhard,G.E.and Tanner,L.I.(1989)Biochimica et Biophysica Acta 1014,83-9)などの脂肪サイトカインの分泌が、インスリンにより促進される。

10

#### 【0007】

膜小器官(membrane organelles)のインスリン依存の細胞内の転送が、脂肪性組織の多くの代謝機能において示唆されてきた。Simpson,F.,ら、Traffic 2,2-11(2001)を参照。最近の研究では、この組織において少なくとも3種の異なるインスリンで調節される小胞転送経路の存在が、提示された。Holman,G.D.and Sandoval,I.V.,Trends in Cell Biology 11,173-9(2001)を参照。たとえば、インスリンが、GLUT4の細胞内への転送を誘発すると言われ、そのGLUT4が、脂肪性組織及び横紋筋において高く発現され、容易性のある哺乳動物のグルコース転送物質である。Simpson,F.,Whitehed,J.P.and James,D.E.(2001)Traffic 2,2-11を参照。基底状態において、GLUT4が、核の周辺領域に細胞内の貯蔵区分に対し標的にされると見られる。インスリンが、PI 3 キナーゼ/Akt/PKC  $\xi$ / $\lambda$ 経路及びCbl/CAP経路を含む、少なくとも2つの並行したシグナル経路の活性化を介してGLUT4の形質膜の転送を誘発する。Simpson,F.ら、Traffic 2,2-11(2001)を参照。さらにインスリンで調節される転送過程が、多くの細胞内小器官(organelles)及び種々のタンパク質成分を含む。Holman,G.D.and Sandoval,I.V.,Trend in Cell Biology 11,173-9(2001)を参照。しかしながら、上記脂肪性サイトカインの細胞内貯蔵区分、及びこれらの小胞転送経路が、GLUT4のものと区別されていると言われている。Millar,C.A.ら、Traffic 1,141-51(2000)を参照。最近の文献から、医薬物の標的として $\beta$ 3アドレナリン受容体、非結合タンパク質、及びPPAR  $\gamma$ などの、脂肪細胞による特異的タンパク質の発生に、関連していると言われる。Olefsky,J.M.and Saltiel,A.R.,Trends in Endocrinology & Metabolism 11,362-8(2000);Wieland,H.A.and Hamilton,B.S.,International Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics 39,406-14(2001)を参照。

20

30

#### 【0008】

脂肪細胞及び組織、並びにこれらの細胞内成分、及び構造とその機能に対する研究に関して、多大な努力が払われてきたと見なされる。本発明は、新たな脂肪に関連したタンパク質の発見に基づいている。

40

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

本発明の目的は、有益な組成物、及び新規な脂肪関連タンパク質に基づく方法を提供することである。

#### 【0010】

従って、1の観点において、本発明は、単離されたか、又は実質的に純粋なヒト、及び他の哺乳動物のFALPタンパク質を提供する。こうしたタンパク質には、ヒトのFALP-a(配列番号17)、ヒトのFALP- $\beta$  (配列番号20)、ネズミのFALP-a(配列番号11)、ネズミのFALP- $\beta$  (配列番号14)、及びその他の哺乳動物のFALPタンパク質があげられる。

50

## 【0011】

別の観点において、本発明は、FALPタンパク質及びその断片又はその変異体をコードするか、又はそれをコードする配列に対して相補的である、単離されたポリヌクレオチド、又は合成のポリヌクレオチドを提供し、そしてFALPをコードするポリヌクレオチドを特に含む。本発明のポリヌクレオチドは、細胞におけるポリヌクレオチドの発現を高めるプロモータ又は他の配列に操作により結合することができる。こうした配列には、マウスのFALP- $\alpha$  (配列番号9)、マウスのFALP- $\beta$  (配列番号12)、ヒトのFALP- $\alpha$  (配列番号15)、及びヒトのFALP- $\beta$  (配列番号18)、並びにその他の哺乳動物のFALP cDNAsがあげられる。さらにこうした配列には、成熟したマウスのFALP- $\alpha$  (配列番号10)、成熟したマウスのFALP- $\beta$  (配列番号13)、成熟したヒトのFALP- $\alpha$  (配列番号16)、及び成熟したヒトのFALP- $\beta$  (配列番号19)に対するコードする配列、並びに哺乳動物のFALPをコードするポリヌクレオチドの配列があげられる。 10

## 【0012】

それでさらに別の観点において、本発明は、FALPタンパク質、断片、バリエント、などの複製するため、及び／又は発現するための組み換え型ベクター(たとえば、クローニング・ベクター又は発現ベクター)を提供する。

## 【0013】

さらに本発明は、本発明の組み換え型FALPポリヌクレオチドを含む宿主細胞(たとえば、哺乳動物及びヒトの細胞を含むバクテリア細胞又は真核細胞)を提供し、そしてクローニング・ベクターからベクターの複製、又は発現ベクターからタンパク質の発現できる条件下で、組み換え型FALPポリヌクレオチドを含む細胞を培養することにより、FALPタンパク質、断片、バリエント、又は上記いずれかの融合タンパク質を生成するための方法を提供する。 20

## 【0014】

別の観点において、本発明は、免疫原の断片を含む単離され、実質的に純粋で、合成又は組み換え体のFALPタンパク質、そのバリエント又はその断片を提供し、その全てが標識化又は非標識化でよい。1の観点において、ポリペプチドが、本明細書に開示されたものに同一性を有するアミノ酸配列を有する。別の観点においてポリペプチドが、欠失、保存的置換により本明細書に開示されたものと異なるアミノ酸配列を有し、それが、標準配列に少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%以上の同一性を有し、そして/又は天然に生成する全長のFALPタンパク質と、免疫的に交差反応(cross-reactive)をする。別の観点において、本発明のタンパク質が、FALPタンパク質、バリエント、又は断片を、別のタンパク質又はポリペプチドに直接的に、又は間接的に結合する融合タンパク質である。 30

## 【0015】

別の観点において、本発明は、抗体、又は抗体断片(たとえば、Fab断片又は1本鎖抗体又は1本鎖Fv)、又はFALPタンパク質又は本発明の関連ポリペプチドに特異的に結合する他の結合断片(たとえば、ファージの表示により作成される)を提供する。抗体はモノクローナルでよく、そしてたとえば少なくとも $10^8 \text{ M}^{-1}$ の親和性により結合可能である。さらに本発明は、抗体、抗体の断片又は結合分子を分泌できる単離された細胞又はハイブリドーマを提供する。抗体、断片又は結合分子が、ヒト、又はヒトに類似した、又はキメラでもよく、そして標識されたもの、又は標識されないものでも可能である。 40

## 【0016】

別の観点において、本発明は、(a)遺伝子又はポリヌクレオチドに特異的に結合するプローブと試料を接触させ、ここでプローブ及び遺伝子又はポリヌクレオチドが複合体を形成し、そしてその複合体を検出する；(b)生体試料における遺伝子又はポリヌクレオチドを特異的に増幅させ、ここで複合体の形成又は増幅した生成物の存在が、生体試料におけるFALP遺伝子又はポリヌクレオチドの存在と相互の関連性がある、試料中のFALP遺伝子又はポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。1の例において、遺伝子がDNA及びプローブが抗体である。異なる例において、ポリヌクレオチドがRNAで、そしてプローブがポリ 50



ヌクレオチドである。別の例において、本発明は、FALP遺伝子生成物、又は他のFALP関連ポリペプチドを検出するための方法を提供し、たとえばその試料中のFALPの断片又はバリエーションが、FALP遺伝子生成物又はFALP関連ポリペプチドに特異的に結合するプローブと、その試料を接触させたもので、ここでプローブ、及びFALP遺伝子生成物、又はFALP関連ポリペプチドが、複合体を形成しそしてその複合体の生成を検出することができ、ここでその複合体の生成は、生物学的試料におけるFALP遺伝子生成物、又はFALP関連ポリペプチドの存在、又はその量との相関性がある。1の例において遺伝子生成物が、FALP又はFALP関連ポリペプチドであり、そしてプローブは、抗体、抗体断片などである。

#### 【0017】

他の観点において、本発明は、FALPを含む組成物(たとえば組み換え型FALPポリペプチドを発現する細胞)と試験化合物とを接触させることにより、そして試験化合物が存在して生じるが、非存在して生じない生物学的効果を評価することにより、FALP活性の調節物質を同定する方法を提供し、ここで生物学的効力を誘発する試験化合物は、FALP活性の調節物質として同定される。さらに本発明は、標的FALPとその化合物との相互作用を評価することにより、FALPを媒体とした疾患又はFALP関連の疾患、及び症状の治療、防止又は改良に有益な化合物を同定するための方法を提供する。他の観点において、本発明は哺乳動物の細胞又は組織におけるFALPの活性又は発現を減少又は増大することにより、哺乳動物のFALP媒体による症状(たとえば、肥満、及び肥満に関連した症状)を治療する方法、又は哺乳動物に対しFALP機能を調節する物質を投与方法を提供する。他の関連する観点において、本発明は、医薬的な用途としてFALPの活性(たとえば、結合)の調節物質を処方することにより医薬的組成物を作成するための方法を提供する。

10

20

#### 【0018】

さらに本発明は、単離されそして合成のFALP対立遺伝子、対立遺伝子配列、及びその中間体；単離され、そして合成されたFALPアミノ酸配列、及びその中間体；単離された配列及びその中間体を含む1又は複数の保存性置換体を伴う単離されそして合成のFALPアミノ酸配列；単離された配列及びその中間体を含む、1又は複数の欠失、挿入、又は追加を伴う単離されそして合成のFALPアミノ酸配列又はヌクレオチド配列；単離され、そして合成のその中間体を含む、FALPタンパク質、バリエーション又は断片の単離されそして合成の誘導体；単離されたアンチセンス配列及びその中間体を含む、合成のFALPアンチセンス配列；単離されたベクター及びその中間体を含む、FALPクロニングベクター；単離された発現ベクター及びその中間体を含む、何れか所望によるコントロール要素及び／又は調節配列(たとえば、エンハンサー、プロモータ、転写ターミネータ、複製開始点、染色体組み込み配列、5'及び3'の未翻訳領域など)を含むFALP発現ベクター；FALPベクターにより細胞を形質転換する方法；FALPリボザイム(FALP ribozymes)；FALPの3重分子及びその合成3重分子の中間体；FALPのRNAiのポリヌクレオチド、及び合成RNAiのポリヌクレオチド、及びその中間体；FALP遺伝子の治療；合成ペプチド擬似、及びその中間体を含むFALPのペプチド擬似；FALPの細胞を基盤とするアッセイ；合成プローブ及びその中間体を含むFALPプローブ；実質的に純粋で、単離され、合成そして組み換え型FALPタンパク質、及びその中間体を含むFALPタンパク質；FALP組み換え型宿主細胞；FALP免疫アッセイ；合成タンパク質及びその中間体を含むFALPタンパク質と実質的に同一であるタンパク質；合成ポリヌクレオチド及びその中間体を含むFALPポリヌクレオチドに実質的に同一であるポリヌクレオチド；少なくとも1にFALPを過剰発現する遺伝子導入動物；FALP遺伝子「ノックアウト」動物；FALP遺伝子導入の植物；FALPのイントロン及びエクソン；FALPのリーダ配列；合成相同体及びその中間体を含むFALPの相同体；本明細書にて同定される配列の1つの適切な部位から誘導され、少なくとも約25から約50の配列、少なくとも連続したヌクレオチドを用い、1本鎖又はその相補鎖にストリジェントなハイブリット化の条件下で、ハイブリダイズする哺乳動物のFALPのヌクレオチド配列；配列番号1乃至8に相当する分子；配列番号9乃至20に相当する分子；並びに上記の何れか、又は記載又は参照される内容の他を含むキットなどを提供する。

30

40

#### 【0019】

50

記載する前に、本発明は、一般的に、そして特定の例に対して、本発明に記載される開示の内容において使用される用語を含んでいる。それ以外に明示されることがなければ、本明細にそして添付された請求項に用いられる場合、以下の用語が以下の意味を有する。これらの用語が、本明細書の以下に、そして何れかに明示されていない場合、これは、技術的に認められた意味を有する。

#### 【0020】

用語「アゴニスト」FALPに結合し、その活性を調節する分子を指している。それは、絶対的なFALP活性を増大、又は減少させてよく、或いは選択肢として、FALP活性の正又は負の幾つか他のパラメータ、たとえば、pH、温度又は補因子依存に影響をアタエル。「負のアゴニスト」は、タンパク質の活性を減少させる化合物で、一方「正のアゴニスト」が、タンパク質の活性を増大させる化合物である。「アンタゴニスト」は、タンパク質の機能部位と相互作用するための別の化合物と競合する化合物である。アゴニスト、及びアンタゴニストには、抗体、小分子、タンパク質、脂質、炭化水素、及び他の分子があげられる。

10

#### 【0021】

本明細書に明示されているように、用語「対立遺伝子」、「対立遺伝子配列」が、FALPポリペプチドをコードする遺伝子の天然に形成する別の形状を指している(すなわち、FALPポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)。変異体から(すなわち、核酸配列の変化)、そして時には生成物の変化、そして/又は違って調節されるmRNAs、又はペプチド構造及び/又は機能が変化してもよく、又は変化しなくてよいポリペプチドにより、しばしば対立遺伝子を形成する。対立遺伝子に形成する通常の変異化による変化は、コードされたアミノ酸に影響するか、影響しないヌクレオチドを、天然に欠失、付加、又は置換に対し一般的に記載されている。こうしたそれぞれの型の変化が、所定の遺伝子、染色体、又は他の細胞ポリヌクレオチド内で、単独、他のものと組み合わせ、又は1又は複数回形性させることができる。所定の任意の遺伝子が、1又は多くの対立電子形態を有していない。本明細書に使用されるように、用語「対立遺伝子」は、遺伝子か、その遺伝子から転写されるmRNAかのいずれか、又は両方を指している。

20

#### 【0022】

「アミノ酸」は、中心の炭素原子(「アルファ( $\alpha$ )炭素原子」を、水素原子、カルボン酸基、(「カルボニル炭素原子」として言及される炭素原子)、アミノ基(「アミノ窒素原子」として言及される窒素原子)、及び側鎖基、Rに結合した構造を有する分子である。タンパク質に組み入れる方法において、アミノ酸が、そのアミノ酸及び一方のアミノ酸を別のアミノ酸結合する脱水化反応において、そのアミノ基、及びカルボキシル基の1又は複数の原子を喪失する。結果として、タンパク質に組み入れられる時、しばしばアミノ酸が、「アミノ酸の残基」として言及される。アミノ酸は、タンパク質に組み入れられる前後(たとえば、2の非近接のシステイン・アミノ酸残基のチオール側鎖を酸化することにより、シスチンを形成し、ジスルフィドにて共有結合し、折り畳まれた形状のタンパク質、などを安定化する際重要な役割しばしば果している)に誘導、修飾化が可能である。アミノ酸は、天然のタンパク質に形成するアミノ酸でよく、又はそれは、非天然に形成されたものでも良い(すなわち、固体状態などの合成方法により、及びその他の自動による合成法により生成される)。アミノ酸を非天然に形成する例は、 $\beta$ 及び $\gamma$ アミノ酸、デザイナー・アミノ酸(たとえば、 $\beta$ -メチルアミノ酸、 $\alpha$ -メチルアミノ酸、N $\alpha$ -メチルアミノ酸)、及び一般的なアミノ酸類似物を含む、 $\alpha$ -アミノイソブチル酸、4-アミノブチル酸、L-アミノブチル酸、6-アミノヘキササン酸、2-アミノイソブチリック酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ネオロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シタリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニールリシン、シクロヘキシルアラニン、 $\beta$ -アラニン、フルオロアミノ酸が、あげられる。アミノ酸類似物は、天然に形成するアミノ酸と化学構造が基本的同一である化合物を指し、すなわちたとえば水素、カルボキシル基、アミノ基、及びR基に結合する $\alpha$ 炭素であるが、修飾されたR基(たとえば、ノルロイシン)、又は修飾されたペプチド骨格を有しているが、天然に形成す

30

40

50

るアミノ酸と同一の基本的化学構造を保持する化合物を言及する。アミノ酸偽物は、アミノ酸の一般的な化学構造と違っているが、一般的な機能が天然に形成されるアミノ酸と類似した方法を有す構造の化学的化合物を指している。

#### 【0023】

その置換基に加え、各アミノ酸の2種の異なる鏡像異性体の形状で、D体とL体に指定される。本発明が、1又は複数のD-及びL-アミノ酸を組み入れたタンパク質、及びD-又はL体だけの残基から成るタンパク質と示唆されるが、哺乳動物においては、L-アミノ酸だけが、天然の形成するタンパク質に組み入れられる。

#### 【0024】

本明細書において、以下の略語が、以下のアミノ酸(及びその残基)に対して使用することができる。すなわち、アラニン(Ala,A)、アルギニン(Arg,R)、アスパラギン(Asn,N)、アスパラギン酸(Asp,D)、システイン(Cys,C)、グリシン(Gly,G)、グルタミン酸(Glu,E)、グルタミン(Gln,Q)、ヒスチジン(His,H)、イソロイシン(Ile,I)、ロイシン(Lys,K)、メチオニン(Met,M)、フェニルアラニン(Phe,F)、プロリン(Pro,P)、セリン(Ser,S)、トレオニン(Thr,T)、トリプトファン(Trp,W)、チロシン(Tyr,Y)、及びバリン(Val,V)として使用される。 10

#### 【0025】

用語「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質の配列、これらのいずれかの断片を言及し、そして天然に生成する分子又は合成の分子、並びにたとえばコンピュータと結びついた用途として適切な上記電子的、又は他の代表的な物質に対し言及している。 20

#### 【0026】

適切なものとして、本発明の例は、シリコ(in silico)において行なうことができる。こうした例において、実際の生理的に存在するアミノ酸、ペプチド断片などが用いられず、その代わりこれらの分子を表す電子的又は他の機械的操作によるデータ形式が用いられた。こうした例において、上記の用語は好ましいが使用する必要がないことが理解されよう。その代わり、こうしたデータの形式対する何か適切な用語を用いることが可能である。

#### 【0027】

用語「抗体」は、無傷な分子及びその断片、Fab,F(ab')<sub>2</sub>,及びFv断片などを言及し、それが、抗原決定基に結合することができる(すなわち、特定抗体又は他の結合分子と接触させる1部の分子(すなわちエピトープ)。抗体は、たとえば、ポリクロナール、モノクロナール、キメラ、及び1本鎖抗体、1本鎖Fvs,Fab断片、及びFab発現ライブラリーにより作成される断片を含む。 30

#### 【0028】

用語「抗センス配列」は、RNA配列に対し相補的な配列を有するポリヌクレオチドを指している。これらの用語は、リボソームによりmRNAの転写を停止させるため、mRNAに結合する核酸配列又はその断片を含む。抗センス法は、技術において一般的に良く知られている(たとえば、PCT publication WO 94/12633,and Nielsenら、1991,Science 254:1497;OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES,A Practical Approach,edited by F.Eckstein,IRL Press at oxford University Press(1991);ANTISENSE RESEARCH AND APPLICATIONS(1993,CRC Press)を参照)。 40

#### 【0029】

一般的に、用語「生物活性」は、機能として例えば天然に生成する分子のうち構造的、調節として、又は生物活性を有するタンパク質を言及する。FALPに関して用語「生物活性」は、測定可能なFALPの活性を含む1又は複数のFALPの特性を有する何れかの資源から誘導される、全長のタンパク質又はその断片を指している。さらにこうした全長タンパク質又はその断片は、天然に形成するFALPのアミノ酸配列を有するFALPに対し上昇し、そしてそれと反応する抗体(ポリクロナール又はモノクロナール)との免疫交差反応性を呈している。

#### 【0030】

タンパク質の「生物的活性」は、タンパク質により介在されるか、又はタンパク質を含む化学的相互作用、又は反応を言及する。本明細書による「生物的活性」は、一般的なFALP活性又は特定種のFALP活性と同調している。

#### 【0031】

「細胞」は、所望の用途として適切ないずれかの生きた細胞を意味する。細胞は、真核細胞と原核細胞を含む。好ましい真核細胞としては、哺乳動物の細胞など（たとえば、ヒト、ネズミ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌ及びネコの細胞）、鳥の細胞、魚の細胞などの脊椎動物の細胞、及び昆虫の細胞、及び酵母細胞などの非脊椎動物の細胞があげられる。

#### 【0032】

用語「相補的」は、可能な塩及び温度条件下で、塩基対を形成ポリヌクレオチドの天然の結合を指している。たとえば「A-G-T」の配列が、相補となる配列「T-C-A」に結合する。2つの1本鎖分子間の相補性は、幾つかの核酸だけ結合する「1部分」でよく、或いは1本鎖分子間にて全相補性が存在する「完全な」ものでも良い。核酸分子間の相補性の程度は、その間のハイブリット化の効率及び強度に有意な影響を及ぼす。本明細書に用いられている用語「組成物」は、特定の又は他の量における1又は複数の特定の成分を含む生成物、及びこうした特定の、又は他の量における特定成分の組み合わせから、直接的又は間接的に得られる何らかの生成物を包含すると考えられる。

10

#### 【0033】

「化合物」は分子であり、そして小分子、タンパク質、炭水化物、及び脂質を含む。

#### 【0034】

20

タンパク質と「相互作用する周知の化合物」は、タンパク質又は他の標的と相互作用するように前もって同定されている化合物の意味である。

#### 【0035】

ポリペプチドを記載する時の用語「同類置換」は、ポリペプチドの活性が実質的に変化しないポリペプチドのアミノ酸組成物における変化を、即ち類似の特性を有する他のアミノ酸とアミノ酸を置換することを言及している。機能的に類似するアミノ酸を提示する同類置換表は、技術的に周知である。以下6種の群のそれぞれが、互いに同類置換を示すことが一般的に理解されるアミノ酸を含み、即ち1) アラニン(A), セリン(S), トレオニン(T); 2) アスパラギン酸(D), グルタミン酸(E); 3) アスパラギン(N), グルタミン(Q); 4) アルギニン(R), リシン(K); 5) イソロイシン(I), ロイシン(L), メチオニン(M), バリン(V); 及び6) フェニルアラニン(F), チロシン(Y), トリプトファン(W)があげられる。

30

#### 【0036】

上記の定義された同類置換に加えて、さらにアミノ酸残基を別の修飾により、「同類的に修飾されたバリエーション」になり得る可能性がある。たとえば、これらポジティブであろうとネガティブであろうと、荷電されたアミノ酸の全てを互いに置換したとみなす。加えて、さらに単一のアミノ酸又はたとえコードされた配列において、しばしば5%より低い、僅かな%のアミノ酸を変更、追加、又は欠失する個体の置換体、欠失物又は付加物により、同類的に修飾されたバリエーションとなる可能性がある。さらに、保存的に修飾されたバリエーションが、同じアミノ酸に対して異なるコドンにて、天然又は野生型遺伝子により用いられるアミノ酸としてのコドンを置換することによる組み換え型ポリペプチドから生成される。

40

#### 【0037】

用語「コントロール要素」又は「調節配列」には、エンハンサー、プロモータ、転写ターミネータ、複製開始点、染色体組み込み配列、5'及び3'の未翻訳領域が含まれ、ポリペプチド又は生体分子がそれらと相互作用して転写及び翻訳を行なう。真核細胞には、一般にコントロール配列は、たとえば免疫グロブリン遺伝子、SV40、サイトメガロウイルスから誘導されるプロモータ、そして好ましくはエンハンサー、及びポリアデニール化配列を含み、そしてスプライス・ドーナ及び受容体配列を含むことができる。使用されるベクター系及び宿主に依存し、構成的にそして誘発可能なプロモータを含む、多くの適切な転写及び翻訳要素を、使用することができる。FALPに言及すると、FALPコード配列と天然に関

50

連するものの以外のプロモータが、「異種性」のプロモータとして明示することができる。

#### 【0038】

「欠失」は、1又は複数のアミノ酸残基、又はヌクレオチドの非存在によるアミノ酸又はヌクレオチド配列の変化を指している。用語「挿入」又は「付加」は、基準配列にたとえば天然に生ずる分子に見出される配列と比較されるように、分子又はその代表例に1又は複数の各アミノ酸残基又はヌクレオチドが付加で生ずるアミノ酸又はヌクレオチド配列の変化を言及する。「置換」は、異なるアミノ酸又はヌクレオチドのそれぞれにより1又は複数のアミノ酸又はヌクレオチドの置き換えを指している。

#### 【0039】

用語「誘導体」は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド又は他の分子の化学的修飾を言及している。本発明の内容において、「誘導性ポリペプチド」が、たとえばグリコシル化、ペジレーション、又は類似した任意の方法により修飾されたものが、FALPの活性を保持する。たとえば、用語としてFALPの「誘導体」は、FALPタンパク質、バリエーション、又は化学的に修飾された断片を言及し、たとえば、1又は複数のポリエチレン・グリコール分子、糖、りん酸、そして/又は分子又は分子群が、野生型FALPポリペプチドに天然に結合されない他のこうした分子を付加によることを、言及している。

#### 【0040】

「誘導化された」ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、又は核酸は、一般的に誘導された置換体を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを指している。幾つかの例において、置換体は、相補性ポリヌクレオチドへのハイブリット化に対し実質的に非干渉である。付加された化学置換体を伴い(たとえば、すでに合成されたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの修飾により、又は合成中に修飾された塩基、又は類似の骨格を組み入れることによる)修飾された誘導化されたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドが、代謝的に活性な真核細胞に誘導され、FALP DNA、RNA又はタンパク質とハイブリット化し、これらは、局在的なDNA、RNA又はタンパク質に変更又は化学的修飾を生成する。選択肢として、誘導化されたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドが、FALPポリペプチド、又はFALP DNA又はFALP遺伝子生成物と相互作用し、又はFALP DNA又はRNA又はタンパク質の発現又は機能を変更又は調節するタンパク質と相互作用又は変更することができる。添付された図示的に添付された化学置換体には、ユウロピウム(III)テキサフィリン(texaphyrin)、架橋剤、プソラレン(psoralen)、金属キレート(たとえば、例えば鉄を触媒として分割するための鉄/EDTAキレート)、トポイソメラーゼ、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、リガーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホトダイナミック・ポルフィン、医薬治療剤(たとえばアドリアマイシン、ドキシルビシン)、介在剤(intercalating agents)、塩基性修飾剤、免疫グロブリン鎖及びオリゴヌクレオチドが、あげられる。鉄/EDTAキレートは、化学置換体として、核酸配列の局所切断が所望される場合に、しばしば使用される(Hertzbergら、1982, J. Am. Chem. Soc. 104:313; Hertzberg and Dervan, 1984, Biochemistry 23:3934; Taylorら、1984, Tetrahedron 40:457; Dervan, 1986, Science 232:464を参照)。ストレプトアブジン/ビオチン、及びジゴゲシゲニン/抗ジゴゲシゲニン抗体結合法を、使用することができるが、図式的に添付された化学物質には、たとえば付加反応によるアミノ基を介し直接の結合のものか(Corey and Schultz, 1988, Science 238:1401, これは引用として本明細書に取り入れる)、及び他の直接結合の化学結合を含む。化学置換体を結合するための方法の例は、米国特許5,135,720, 5,093,245, 及び5,055,556に提供され、それが引用として本明細書に取り入れられている。別の結合化学物質は、実施者の判断にて使用することができる。

#### 【0041】

本明細書に使用されるように、「検出可能な標識」は、技術的に通常の意味を有し、原子(たとえば放射性核種)、分子(たとえば、フルオレセイン)、又は複合体などを指しており、それが、検出のため使用されか、又は検出のため使用することができ(たとえば、物理的、化学的、又は光学特性により)、共有結合又は状況が異なれば会合された分子の存在を明示するか、又は別の分子への結合できることを明示する。さらに用語「標識」は、

10

20

30

40

50

気基に作用し検出原子、分子又は複合体を形成する共有結合の、又は状況が異なれば会合された分子(たとえば、酵素などの生化学的な分子)を指している。本発明に使用するため適切な検出可能な標識は、たとえば、スペクトロスコープ、光化学、生物化学、免疫化学、電子、光、化学、又は他の手段によるいずれかの検出可能な組成物を含む。

#### 【0042】

用語「エピトープ」は、通常抗体により認識されるある部位の抗原又は抗原分子の意味を有す。エピトープは、アミノ酸の断片にて可能で、全体のタンパク質又はポリペプチドのうちの代表的小領域を示す断片を含む、エピトープは、立体配座(conformational)(すなわち非連続)でよい。すなわち、これらは、1次配列の非近接部位によりコードされるアミノ酸からより形成され、それがタンパク質の折たたみによる近接されている。

10

#### 【0043】

「FALP」は、配列番号11,14,17,及び20によるアミノ酸配列を有するものを含む、FALP活性を有するタンパク質を、好ましくは実質的に精製されたタンパク質を指している。本発明を行なう場合に使用するためのFALPは、多くの種類からえられ、特に好ましくは、哺乳動物の種から(たとえば、ウシ、イヌ、ウマ、ネコ、ネズミ、ヒツジ、ブタ)から単離されたFALPであり、最も好ましくはヒトの種から単離されたFALPである。加えてFALPは、天然の、合成の、半合成の、又は組み換えによるいずれかの資源から得ることができる。さらに本明細書に明示するように本発明は、FALPの断片、類似物、バリエーション及び誘導体、そして同じものをコードするポリヌクレオチドに関する。バリエーションは、天然に存在する対立遺伝子のバリエーション、又は非天然に生成するバリエーションにて良く、そして欠失したバリエーション、置換バリエーション、及び付加又は挿入バリエーションがあげられる。技術的に周知で、そして本明細書にて記載のように、対立遺伝子バリエーションは、1又は複数のヌクレオチドの置換、欠失、又は付加を有するポリヌクレオチド配列の変化した形状である。さらにバリエーションは、スプライスのバリエーションとして天然に存在するバリエーションを含む。

20

#### 【0044】

用語「融合タンパク質」は、合成ポリペプチドを指しており、すなわち1本のアミノ酸配列において、融合かそうでなければ直接的又は間接的にたがいに結合された、2種(又はそれ以上の)の異なるポリペプチドから構成される、1本の近接したアミノ酸配列である。したがって、たとえば、融合タンパク質は、2の全く異なるアミノ酸配列を含む1本鎖アミノ酸配列を、あるいは1本鎖アミノ酸配列において天然に見出される構造と同じ構造にて、通常まとめて見出されない2の類似した又は同一のポリペプチド配列を含むことができる。一般的に融合タンパク質は、組み換え型核酸法、即ち組み換え型遺伝子融合産生物の転写、そして翻訳の結果として、その融合には本発明のポリペプチドをコードする断片、異種ポリペプチドをコードする断片を含み、あるいは技術的に周知な化学合成法の何れかを用いて調製される。

30

#### 【0045】

タンパク質の「官能部位」は、官能基を有するタンパク質における任意の部位を指している。代表的な例としては、作用部位(触媒タンパク質において触媒が形成する作用部位)を含み、タンパク質とタンパク質との相互作用部位、化学的に修飾するための部位(たとえば、グリコシル化部位、及びりん酸化部位)、及びリガンド結合部位が含まれる。リガンド結合部位には、金属イオン結合部位、補因子結合部位、抗原結合部位、基質チャンネル及びトンネル、そして基質結合部位がふくまれる。酵素において、基質結合部位であるリガンド結合部位が、作用部位にて可能であり、作用部位と重複しても良い。本明細書に使用されているように、官能性部位の「生物的功能」は、相当する機能を有する天然に存在するタンパク質における部位により行われる機能を指している。たとえば、作用部位としての生物的功能は、部位の特定の触媒活性言及し、ここで基質結合部位の生物的功能は、特定基質との結合である。

40

#### 【0046】

用語「遺伝子産生物」は、遺伝子から転写されたRNA分子又は遺伝子によりコードされるか、RNAから翻訳されるポリペプチドを指している。

50

## 【0047】

本明細書に使用されているようにIgGの抗体に対する用語「高親和性」は、少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1}$ 、好ましくは少なくとも約 $10^8 \text{ M}^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも約 $10^9 \text{ M}^{-1}$ 又はそれ以上たとえば最大 $10^{12} \text{ M}^{-1}$ か、それ以上の会合定数(Ka)を指している。しかしながら「親和性」の結合が、他の抗体のイソタイプとして変化させることができる。

## 【0048】

ポリヌクレオチド又は核酸分子の内容における「相同性」は、進化する関係、すなわち共通の先祖からの子孫としての進化による相互の関係を示唆している。

## 【0049】

「ハイブリット化」は、1本鎖の核酸分子、その1部分、又はそうでなければ2本鎖の核酸分子の1本鎖領域が、相補的な1本鎖の核酸分子、その1部分、又はそうでなければ2本鎖の核酸分子の1本鎖領域と塩基対を介して結合する任意の過程を言及している。ハイブリット化は、両方の核酸分子が溶液中であるか、又は1方の核酸分子が溶液中で、もう1方の核酸分子が、固体の担体上に固定化した間に行なうことができる(たとえば、核酸に対し紙、膜、フィルター、チップ、ピン、ガラススライド、又は別の適切な基質を、固定することができる)。

10

## 【0050】

用語「免疫原」及び「免疫原の」は、技術における一般的意味を有し、即ち免疫原は、ポリペプチド又は他の抗原などの分子であり、ヒト又動物への導入による適応免疫応答を惹起することができる。

20

## 【0051】

「細胞に基づくアッセイ」は、関心のあるタンパク質を発現する細胞を用いる方法である。その細胞が、内在的に又は適切な発現ベクターの導入を含む、組み換え型技術の結果として、あるいは所望のタンパク質の発現を指示できる適切な調節要素の誘導(たとえば相同性の組み換えにより)により、タンパク質を発現することができる。発現は、構成的又は誘発可能、並びに一過性又は安定性でも良い。

## 【0052】

「単離された」分子(たとえば、ポリペプチド又はポリヌクレオチド)は、元の環境から取り出された(たとえば、それが天然に存在する場合天然の環境)分子を指している。たとえば、生きた動物に存在する天然により生成されたポリヌクレオチド又はポリペプチドが、単離されないが、同じポリヌクレオチド又はポリペプチドが、天然系(たとえば、タンパク質、脂質、炭水化物、核酸)における共存物質の幾つか、又はその全てから分離された同じポリヌクレオチド又はポリペプチドが、単離される。こうしたポリヌクレオチドが、ベクターの1部と、そして/又はこうしたポリヌクレオチド又はポリペプチドが、組成物の1部で可能であり、さらにそうしたベクター又は組成物が、天然の環境による1部でないという点で単離され得る。

30

## 【0053】

用語「調節」は、生物活性の変化を指している。たとえば、調節は、触媒率の増減、基質結合の特徴付けなどに関与することができる。たとえば調節は、タンパク質と共有的な又は非共有的な相互作用により生じ、そして生物活性の増減に関与する可能性がある。「調節剤」は、変化を起こす化合物を指し、すなわちタンパク質の活性の増減を、そしてたとえば典型的には、リガンドを、ペプチド、ポリペプチド、又は小分子(たとえば、アゴニスト又はアンタゴニスト)のいずれかである。調節剤は、たとえば活性の増大又は減少を起こすよう、タンパク質と相互作用することにより直接に作用することができる。さらに調節剤が、たとえば間接的に、すなわちタンパク質の活性の増大又は減少を引き起こす別の分子の作用を、アンタゴニスト又はブロックの干渉により作用することができる。種々の形状にて本明細書にて用いられているように、用語「調節剤」及びFALP活性の「調節」は、FALPタンパク質又は遺伝子を伴う活性のアンタゴニスト、アゴニスト、一部アンタゴニスト、そして又は1部アゴニストを含むものと考えられる。種々の例において、「調節剤」は、FALPの発現又は活性を抑制又は刺激することができる。こうした調

40

50

節剤には、FALP機能又は発現の小分子アゴニスト及びアンタゴニスト、抗センス分子、リボザイム、トリプレックス分子、及びRNAiポリヌクレオチド、遺伝子治療方法などがあげられる。

#### 【0054】

語句「核酸」「核酸分子」などが、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド又はそのいずれかの断片を指している。さらにこうした語句が、細胞又は合成器官の1本鎖、又は2本鎖DNA及び／又はRNAを言及している。本明細における「断片」は、幾つかの機能特性、たとえば天然に形成するポリペプチドの抗原的に又は構造としての領域を保持するポリペプチドを、翻訳される時に作り出すこれらの核酸分子を指している。特別に限定されないとしても、ポリヌクレオチド配列の開示は、さらに相補的配列を指すと考えられる。本明細書に使用されるように、用語「ポリヌクレオチド」は、オリゴヌクレオチドを含む。

10

#### 【0055】

本明細書に使用されるように、「肥満」は、通常の意味を有する。肥満(obesity)では、アテローム性動脈硬化症、高血圧、糖尿病、発作、肺動脈の閉塞、及びガンなどの多くの強く生命の脅威に曝す疾患(肥満関連症状)に対する危険因子が十分に確立されている。さらに、それは、呼吸疾患、骨関節炎、骨粗しょう症、胆汁膀胱炎、及び異常脂質血症などの多くの慢性症状を悪化させる。この重大な問題は、最も良く反映している事実として、死亡率が、体重の増大につれて上昇している。死亡率の全ての原因の内の50%以上が、1回の3500万人のアメリカ人にて示すように、体重指数(BMI)が30kg/m<sup>2</sup>を越えという、肥満関連症状に起因している。Lee, JAMA 268:2045-2049(1992)を参照。

20

#### 【0056】

用語「オリゴヌクレオチド」は、一般的に少なくとも約6ヌクレオチドから約100ヌクレオチドの、好ましくは約15から約50ヌクレオチド、そして最も好ましくは約20から約40のヌクレオチドの核酸配列を指し、それはたとえばPCRの増幅又はハイブリット化アッセイにプライマー又はプローブとして使用することができる。本明細書に使用されているように、用語「オリゴヌクレオチド」は、技術的に共通に使用されている用語としての「アンプリマー」「プライマー」「オリゴマー」及び「プローブ」を含む。

#### 【0057】

用語「作用可能な会合」及び「作用的に結合された」は、機能的に関連した核酸分子である。たとえばもしプロモータが、適切な宿主又は他の発現系におけるコードされたポリペプチドの転写そして／又は翻訳に制御を支援する場合、プロモータはコード配列と作用的に会合されるか、又は作用的に結合される。作用的に会合され、又は作用的に結合された核酸分子が近接していても良いが、同じリーディング・フレームにおいて特定の遺伝子要素が、発現されるポリペプチドをコードする核酸に連続して結合する必要がない。たとえば、エンハンサーは、転写を増大させるコード配列に極めて隣接して配置する必要がない。

30

#### 【0058】

用語「擬態的ペプチド(peptidomimetic)」及び「擬態(mimetic)」は、FALPの構造及び／又は活性を少なくとも1部、そしてある程度擬態(mimic)する本発明のFALPポリペプチドの構造的及び機能的に同じ特徴付けを実質的に有することのできる合成による化学化合物を指している。ペプチド類似体は、鑄型ペプチドの特性と類似して特性を有する非ペプチド薬剤として医薬産業において一般的に使用される。これらの種の非ペプチド化合物が、「ペプチドの擬態物」又は「ペプチド擬態物」と称される(Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29(1986); Veber and Freidinger TINS p. 392(1985); and Evans ら, J. Med. Chem. 30: 1229(1987)を参照)。治療的に有益なペプチドに構造的に類似するペプチド擬態物が、同等の又は増大した治療又は予防効果を形成するために使用することができる。一般的に、ペプチド擬態物は、FALPなどパラダイムペプチドに構造的に類似(すなわち生物的又は医薬的に活性を有すポリペプチド)しているが、所望により、例えば-CH<sub>2</sub>NH-、-CH<sub>2</sub>S-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、CH=CH-(シス及びトランス)、-COCH<sub>2</sub>-、-CH(OH)CH<sub>2</sub>-、及び-CH<sub>2</sub>SO-から成る群から選択される

40

50



結合基により置換される1又は複数の結合物質を有す。擬態物質は、合成の、非天然の類似のアミノ酸の全体のある化合物、か1部天然ペプチドのアミノ酸と1部非天然のアミノ酸類似物のキメラ分子のいずれにても可能である。さらに擬態物質が、こうした置換物質が、擬態物質の構造及び／又は活性を実質的に変更しないかぎり、天然のアミノ酸の保存性置換体の何れかの量を組み入れることができる。たとえば、擬態組成物が、もしFALPの結合、又はFALPの1又は複数の他の生物活性他の生物活性、たとえば酵素活性を行なうことができる場合、本発明の範囲内である。

#### 【0059】

語句「パーセント(%)の同一性」は、2以上のアミノ酸配列を比較して見出される配列の類似性のパーセントを言及している。さらに、2のポリペプチド(又はこれらの1方又は両方の1又は複数の部分)が、第一のポリペプチドのアミノ酸配列と、第二のポリペプチドのアミノ酸配列とを比較することにより決定される。こうした比較ために有効な何か適切なアルゴリズムが、本発明の内容を適用するために、採用することができる。

#### 【0060】

「医薬的に受け入れ可能」とは、処方物の別の成分と適合性があり、そして一般的にその賦形剤への投与に対し安全であるたとえば、担体、希釈剤、又は賦形剤の意味である。

#### 【0061】

用語「ポリペプチド」は、用語「タンパク質」と本明細書にて互換性のあるように用いられ、そして合成的に、天然に生成するもの、及び非天然に生成するその類似体(アミノ酸、及び結合剤)を含むアミド結合物により結合されるアミノ酸残基から構成された高分子を指している。ペプチドは、ポリペプチドの試料である。

#### 【0062】

「ポリヌクレオチド」は、複数のヌクレオチドの意味である。したがって、用語「ヌクレオチド配列」又は「核酸」又は「オリゴヌクレオチド」が互換して使用され、そしてヌクレオチドの異種重合体又はこれらのヌクレオチド配列を指している。さらにこれらの語句は、1本鎖又は2本鎖でも良い遺伝子又は合成オリジンのDNA又はRNAを指しており、そしてペプチド核酸(PNA)又は任意のDNA様又はRNA様物質に対しセンス又は抗センス鎖を示すことができる。ポリヌクレオチドがRNAである場合、本明細書に提供される配列におけるT(thymine)が、U(ウラシル)にて置き換えられる、と考えられる。FALP、FALP断片、又はFALPバリエーションをコードするポリヌクレオチドが、天然に見出されるFALPの熟成形態；天然に見出されるFALPの熟成形態配列をコードするポリヌクレオチド、及びたとえばリーダ又はシグナル配列、又は前駆タンパク質配列などの付加的にコードする配列；上記のいずれか、そして非コード配列(たとえば、イントロン、又は非コード配列5'及び／又は天然に見出せるポリペプチドの熟成形状に対する3'のコード配列)；天然に見出せるFALPの熟成形状の断片；及び天然に見出される熟成形状のバリエーションをコードするヌクレオチドを言及している。従って、用語「FALPをコードするポリヌクレオチド」などは、所望のFALP、断片、バリエーションのコード配列のみを含むポリヌクレオチド、及び付加的にコードする配列、及び／又は非コード配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

#### 【0063】

用語「FALPをコードするポリヌクレオチド」などは、(a)たとえば配列番号9,10,12,13,15,16,18又は19のいずれかのヌクレオチド配列を有し；(b)少なくとも85パーセント同一であるが、85%より高くても可能である、すなわち、たとえば配列番号1,10,13,16,又は19のいずれかによりコードされたポリペプチドに対し、86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,又は99パーセント同一であるポリペプチドをコードする核酸配列を有す；(c)天然に形成する対立遺伝子バリエーション、又は選択肢としての(a)又は(b)のスプライス・バリエーションである；(d)は、本明細書に提供されるように生成される(a)-(c)の核酸バリエーション；(e)は、(a)-(d)に相補的である配列を有す；(f)が、高いストリンジェンシーの条件下で、(a)-(e)の何れかにハイブリット化する；及び／又は(g)は、1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95又は100までのアミノ酸置換体をコードし、そして/又は天然に形成するFALPのいずれかを欠失する

アミノ酸配列を有す、という核酸分子又はその断片を指している。

【0064】

本明細書に使用されているように、ポリヌクレオチド、及び抗体の構成体(context)に使用される場合、「プローブ」は、別の分子に特異的に結合する分子を指している。プローブの1の例は「核酸プローブ」で、それは、DNA、RNA又は他のポリヌクレオチドにて可能である。核酸プローブとして特定配列が与えられた場合、さらに相補鎖が、同定され含まれることが理解されよう。相補的鎖は、標的が実質的に相補核酸に特異的に結合する(たとえば、アニール又はハイブリット化)2本鎖核酸である状況において、十分に同等に作用することができる。プローブの別の例は、対応する抗原又はエピトープに特異的に結合する「抗体プローブ」である。一般的に用語「タンパク質」は、1のアミノ酸(又はアミノ酸残基)の $\alpha$ -炭素へ結合したカルボン酸基のカルボキシル基の炭素原子が、隣接するアミノ酸の $\alpha$ 炭素へ結合したアミノ基の窒素原子へ共有的に結合するようになる場合に発生するものとして、ペプチド結合を介して結合される2以上の個々のアミノ酸(天然に存在してもしなくとも)の任意の重合体を指している。これらのペプチドを結合する結合体、及びこれらを(すなわち、 $\alpha$ -炭素原子、カルボキシル炭素原子(そして、これらの置換酸素原子)含む原子群、及びアミノ窒素原子(そしてこれらの置換基の水素原子))が、タンパク質の「ポリペプチド骨格」を形成する。加えて、本明細書に使用されているように、用語「タンパク質」は、用語「ポリペプチド」及び「ペプチド」(これらは、本明細書において時に交換して使用することができる)を含むことが、理解される。同様に、タンパク質断片、類似体、誘導体、及びバリエントが、「タンパク質」として本明細書に言及することができ、その他の点にて指示されないかぎり、「タンパク質」とであるとみなすべきである。用語としてのタンパク質の「断片」は、タンパク質の全アミノ基の末端より、有意に少ししか含まれないポリペプチドを指している。理解されるように、タンパク質の「断片」は、アミノ基末端、カルボキシル基末端、及び/又は内部で(天然にスプライスするなど)切断された形状のタンパク質にて可能であり、さらにバリエント、及び/又は誘導体にて可能である。さらにタンパク質の「ドメイン」は断片であり、そして天然に生成したタンパク質に相当する生化学的な活性を与える必要のあるタンパク質のアミノ酸残基を含む。「バリエント」又は「類似体」は、基準タンパク質(たとえば、天然に形成した形状のタンパク質)と比較して1又は複数のアミノ酸にて変更された、たとえば1又は複数の置換、欠失、及び/又は挿入により変更された、タンパク質を指している。バリエントは、「保存性」のある変化を有し、ここで置換されたアミノ酸は、類似した構造、又は化学特性(たとえば、ロイシンをイソロイシンに置換)を有する。選択肢としてバリエントが、1又は複数の「非保存性」の変更(たとえば、グリシンをトリプトファンに置換)を有する。その他のバリエントは、アミノ酸の欠失又は挿入、又はその両方を含む。こうしたバリエントは、相当する核酸分子のバリエントから調製され、それが、核酸配列からにより、たとえば野生型FALPポリペプチドへ変更する核酸配列を有す。それ以外の点にて指示されない限り、タンパク質のアミノ酸配列(すなわち、その「1次構造」又は「一次配列」が、アミノ末端からカルボキシル末端まで書き込まれている。非生物系(たとえばこれらを用いた固形状にての合成)において、タンパク質の1次構造(さらにジスルフィド(システイン)の結合位置を含む)は、使用者により決定することができる。1次構造に加え、さらにタンパク質は、2次、3次構造を有し、そして複数のサブユニットタンパク質にて、4次構造を有する。「2次構造」は、タンパク質のアミノ酸残基を互いに連続したペプチド結合及び $\alpha$ 炭素の結合部を共有的に結合した原子に、タンパク質鎖の部分的な構成を指している。2構造の代表的な例では、 $\alpha$ ヘリックス、並行及び抗並行 $\beta$ 構造、及びヘリックス・ターン・ヘリックス、 $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ 、ロイシン・ジッパー、ジंक・フィンガー、 $\beta$ ・バレル、及び免疫グロブリン・フォールド(fold)などの構造モチーフがあげられる。「3次構造」は、アミノ酸側鎖及び原子の空間的な相互関係、及びタンパク質の異なる領域のゲノムとしての相互関係を含む、タンパク質の3次元構造に関係する。「4次元構造」は、複数のサブユニット・タンパク質における構造的に、そして非共有的に結合した異なるポリペプチドのサブユニットを指している。

## 【0065】

用語「組み換え体」は、合成された、又はその他の方法でvitroにおいて操作されたポリヌクレオチド(たとえば、組み換え型ポリペプチド)、組み換え型ポリヌクレオチドを使用し、細胞又は他の生物系における遺伝子産物を生成する方法、又は組み換え型ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド(「組み換え型タンパク質」)を指している。したがって、「組み換え型」ポリヌクレオチドが、その製造方法又はその構造にのいずれかにより定義される。その製造の方法に対し、その方法は、組み換え型核酸技術、たとえば、ヒトの核酸配列における干渉、典型的に選択又は製造を含む組み換え型の核酸技術の使用を指している。選択肢としてそれは、天然には互いに隣接していない2以上の断片の融合を含む配列を生成することにより作成されるポリヌクレオチドで可能である。したがって、たとえば、非天然に生成された任意のベクターにより細胞を形質転換して作成された生成物が、何らかのオリゴヌクレオチドの合成方法を用い誘導される配列を含むポリヌクレオチドとして包含される。類似した「組み換え型」ポリペプチドは、組み換え型ポリヌクレオチドから発現されるものである。

10

## 【0066】

「組み換え型宿主細胞」は、たとえばクローニング・ベクター又は発現ベクターなどのベクターを含む細胞、又はそれ以外に組み換え技術により操作され関連するタンパク質を発現する細胞である。

## 【0067】

語句「選択的ハイブリット化」は、標的配列が、全細胞のDNA又はRNAの調製に存在する場合、非標的分子と所望のレベルの反応性で、又は非反応性で特定標的にハイブリット化、2本化、又は結合するポリヌクレオチド・プローブを言及している。

20

## 【0068】

「小分子」は、約5000ドルトンより小さい分子量を有する有機分子の意味である。小分子は、天然に存在するもの、又は合成のものでもよい。

## 【0069】

抗体及びタンパク質又はポリペプチドの間の相互作用に言及する場合、語句「特異的な免疫活性」又は「特異的結合」は、たとえば関連するタンパク質に、たとえばDALPに対し比較的高い親和性にて認識し、そして検出できるように結合し、そしてその結合を用い、タンパク質及び/又は他の生物系の異種集団におけるタンパク質の存在又はその量を決定する抗体を言及している。好ましくは、指定され、又は所望の免疫アッセイの条件下にて、特定された抗体が、特定ポリペプチドと結合するが、試料中に存在する他のポリペプチドに対し多くの量又は要望されない量にて結合しない、すなわち非標的抗原及び/又はエピトープと所望されない交差反応をしない。たとえば種々の免疫アッセイの方式を用いて、特定のポリペプチドと免疫反応であり、所望の特異性を有する抗体を選択することができる。たとえば、通常固相ELISA免疫アッセイを使用し、所望の免疫反応性及び特異性を有するモノクローナル抗体を選択する。免疫反応性及び特異性を決定又は評価するために使用できる免疫評価法及び条件を記述するため、Harlow,1988,ANTIBODIES,A LABORATORY MANUAL,Cold Spring Harbor Publications,New Yorkを参照(以後「Harlow」)。従って、たとえば、用語「特異的結合」「特異的に結合」「特異性」などは、タンパク質と雑多でない調節物質(たとえば、アゴニスト又はアンタゴニスト)、抗体などの間の相互作用を言及している。こうした相互作用は、タンパク質の特定構造の存在、たとえば、活性ドメイン、抗原決定基又はエピトープなどであると考えられる。「選択的結合」「選択性」などは、別の分子と比較して1方の分子と優先して相互作用する化合物を指している。好ましくは、化合物、特に調節物質とタンパク質との間の相互作用は、特異性と選択性の両方である。

30

40

## 【0070】

用語「安定して形質転換された」は、宿主細胞に挿入され、そして宿主細胞に存在する1部の宿主細胞のゲノムDNAとして、独立した分子としてのいずれか(たとえば、染色体外の)、そして継続的世代を介し通されるよう、親宿主細胞に保存および複製される核酸分

50

子を指している。

#### 【0071】

相違とは、変化により(p値)生ずる観察される違いの確率が、ある種の所定レベルより低い場合、「統計的に有意」であると典型的に考えられる。本明細書に使用されているように、「統計的に有意な相違」は、少なくとも約5%(<0.05)より低い、好ましくは少なくとも約1%(<0.01)より低い、そして最も好ましくは少なくとも約0.1%(<0.001)より低いp値を言及している。

#### 【0072】

用語「ストリジェントな条件」は、ポリヌクレオチド間のハイブリット化を可能にする条件を指している。ストリジェントな条件を、塩濃度、有機溶媒の濃度(たとえば、ホルムアミド)、温度及び技術的によく知られたその他の条件により定義することができる。特にストリジェンシは、塩濃度の減少、有機溶媒の濃度の増大(たとえば、ホルムアミド)、又はハイブリット化温度の上昇により増大することができる。たとえば、ストリジェントな塩濃度が、通常約750mMのNaCl及び75mMのクエン酸トリナトリウムより少なく、好ましくは約500mMのNaCl及び50mMのクエン酸トリナトリウムより少なく、そして最も好ましくは約250mMのNaCl及び25mMのクエン酸トリナトリウムより少なくなることである。低ストリジェントなハイブリット化は、有機溶媒の、たとえばホルムアミドの非存在の状態であることができるが、高ストリジェントなハイブリット化は、有機溶媒の存在下にて(たとえば、少なくとも約35%のホルムアミド、最も好ましくは少なくとも約50%のホルムアミド)得ることができる。ストリジェントな温度条件は、少なくとも約30℃、より好ましく 20  
少なくとも約37℃、最も好ましく少なくとも約42℃の温度を含む。たとえばハイブリット化時間、洗剤たとえばドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の濃度、そして担体DNAの包含又は排除などの追加パラメータの変更が、技術的に周知である。ストリジェントの種々のレベルは、必要なこれら種々の条件を組み合わせることにより行われ、そして技術的に周知な技術の範囲内である。さらにストリジェントなハイブリット化条件は、標的配列及び標的に対し相補的に存在するか又はほぼ存在するプローブの溶融温度( $T_m$ )より低い約5℃から約20℃又は約25℃の範囲の条件にて定義することができる。本明細書に使用されるように、融点は、2本鎖核酸分子の集団1本鎖が、半解離され1本鎖になる温度である。核酸の $T_m$ の計算方法は、技術的に周知である(たとえば、Berger and Kimmel, 1987, METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 152: Guide To Molecular Cloning Techniques, San Diego: Academic Press, Inc. 30  
and Sambrookら; supra, (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2<sup>nd</sup> Ed., Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratoryを参照)。基準文献により明示されるように、 $T_m$ 値の簡単な推定は、核酸が、1MのNaClの水溶液である時(たとえば、Anderson and Young, 「Quantitative Filter Hybridization」 in NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (1985)を参照)、式  $T_m = 81.5 + 0.41(\%G+C)$  により計算することができる。その他の文献では、 $T_m$ の計算のため、構造及び配列の特徴を考慮に入れてより複雑な計算を含む。ハイブリットの溶融温度(そこでストリジェントなハイブリット化のための条件)が、プローブの長さ、及び性質(DNA, RNA, 塩基組成物)及び標的の性質(溶液中に存在するか又は固定されたDNA, RNA, 塩基組成物など)、及び塩及びその他の成分の濃度(たとえば、ホルムアミド、デキストラン・サルフェイト、ポリエチレン・グリコールの存在、又は非存在)などの諸因子により影響さ 40  
れる。これらの因子の影響が良く知られ、そして技術的に標準的な文献に記載されており、たとえば、Sambrook, supra, and Ausubel, supraを参照。典型的にはストリジェントなハイブリット化の条件が、典型的にpH7.0から8.3の範囲、そして短プローブに対して少なくとも約30℃の温度(たとえば、10乃至50ヌクレオチド)、長プローブに対して少なくとも約60℃の温度(たとえば、50ヌクレオチドより長く)で、約1.0Mのナトリウムイオンより低い塩濃度で、典型的に0.01から1.0Mのナトリウムイオンの塩濃度である。注意すべきこととして、さらにストリジェントな条件は、ホルムアミドなどの非安定化剤の添加により行うことができ、この場合低温を使用することができる。

#### 【0073】

用語「実質的な精製」又は「単離された」は、天然の環境から取り出され、そして単離 50

されるか又は分離され、そしてこれらが天然に会合される他の組成物から少なくとも約50%遊離した、好ましくは約60%遊離した、より好ましくは少なくとも約75%遊離した、そして最も好ましくは少なくとも約90%以上遊離している。従って、タンパク質又はポリペプチドは、タンパク質が、そのタンパク質を含む組成物の50%以上の全タンパク質含量、典型的に60%以上の全タンパク質の含量から構成される場合、実質的に実質的に純粋であると考えられる。より典型的に実質的に純粋な、又は単離されたタンパク質、又はポリペプチドが、全タンパク質のうち少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%より構成される。好ましくは、タンパク質が、組成物中約90%以上の全タンパク質、そしてより好ましくは約95%以上に構成される。ポリヌクレオチドを言及する場合、用語「実質的に純粋」又は「単離された」が、たとえば、脂肪、タンパク質、又は他のポリヌクレオチドに一般的に結合される汚染物質から分離されたポリヌクレオチドを一般的に指している。本発明の実質的に純粋な、又は単離されたポリヌクレオチドが、約50%以上の純度となり得る。典型的にこれらのポリヌクレオチドが、約60%以上の純度、より典型的に約75%乃至約90%の純度、そして好ましくは95%乃至約98%の純度となる。

10

#### 【0074】

本明細書に使用されているように、用語「実質的な配列の同一性」又は「実質的な同一性」(2以上のポリペプチド、又はポリヌクレオチドを比較した内容において)は、以下の配列をアルゴリズム、又は視覚検査による以下の配列比較の1を使用して測定され、最大に相当するよう比較され、そして構成される時、少なくとも60%、好ましくは80%、最も好ましくは90%、95%、98%又は99%のヌクレオチド又はアミノ酸残基の同一性を有する2以上の配列又は亜配列(subsequences)を指している。2の配列(アミノ酸又はヌクレオチド)を、これらの全長にわたって(又はたとえばこれらの長さが異なる場合、2のうちより短い長さ)、又は少なくとも約50、約100、約200、約500又は約1000の連続したヌクレオチド、又は少なくとも約10、約20、約30、約50又は約100の連続したアミノ酸残基にわたり比較することができる。本明細書に用いられているように、実質的に同一性を有するポリヌクレオチドは、好ましくは共通した機能活性(たとえば、生物活性)を有する。配列を比較するために、典型的に1の配列が基準配列として作用させ、それに試験配列を比較する。配列を比較するアルゴリズムを使用する場合、試験配列及び基準配列をコンピュータに入力し、次ぎに配列の配置構造を指定する。そして必要であれば、配列におけるアルゴリズムのプログラム・パラメータを指定する。次に配列比較のアルゴリズムでは、指定プログラム・パラメータに基づく基準配列に試験配列における配列の相同パーセントを計算する。

20

30

#### 【0075】

比較のための配列の最適な構成を、たとえば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の1部相同アルゴリズム、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同配列調整(alignment)アルゴリズム、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の同様な方法による検索で、これらのアルゴリズム(GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr. Madison, WI)もコンピュータ化の手順により、又は肉眼による検査(一般的にAusubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (2001から供給される)を参照)にて行うことができる。

40

#### 【0076】

以下記載のいずれかのアルゴリズムの使用する場合、一般的に「Window」長、隙間ペナルティなどのためのデフォルト・パラメータが使用される。他の例としての配列の相同性及び配列の類似性の割合を決定するための適切なアルゴリズムは、BLASTアルゴリズムで、たとえばそれは、Altschulら J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)に記載されている。BLAST分析を行ためのソフトウェアが、生物技術情報のための国際センター(National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>))を介して公的に利用することができる。このアルゴリズムでは、第一にクエリー配列における長さWの短いワードを同定することによる、高スコアとなる(scoring)配列の塩基対(HSPs)を同定すること

50

を含み、それが、データベース配列と同じ長さのワードと直線的に並べると、ある正の値の閾値のスコアTと照合するか、満足するかのいずれかである。Tは、隣接するワード・スコアの閾値(Altschulらsupra)を指している。これら最初に隣接するワード・ヒットが、検索を開始するための種子として作用し、これらを含む有意に長いHSPsを見出す。次にワード・ヒットは、累積するアライメント・スコアが増大するかぎり、各配列に沿って両方向に伸長される。累積によるアライメント・スコアが、その最大の達成値から量Xだけ減衰する；1又は複数の負に得点(scoring)する残基のアライメントの累積により、その累積スコアが、ゼロ又はそれ以下になる；又は配列のいずれかの端部が到達された時、各方向におけるワード・ヒットの伸長が停止される。BLASTアルゴリズム・パラメータW,T,及びXは、アライメントの感受性及び速度を決定する。BLASTプログラムは、文字列の長さを11、BLOSUM62のスコアリング・マトリックス(Henikof & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915(1989)を参照)、50のアライメント(B)、10の予想値(B)、M=5、N=-4、及び両方の鎖の比較をデフォルトとして使用する。配列の同一のパーセントを計算することに加え、さらにBLASTアルゴリズムにより、2つの配列間における類似性の統計分析を行なう(たとえば、Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787(1993)を参照)。BLASTアルゴリズムにより提供される類似する測定(1)が、最も少数の総和による確率(P(N))で、それが、2のアミノ酸配列におけるヌクレオチド間の同一性が、変化により生ずる確率の指示を提供する。たとえば核酸は、基準核酸に対する試験核酸の比較における最小総数の確率が、約0.1より小さく、より好ましくは約0.01より小さく、そして最も好ましくは約0.001より小さい場合、基準配列に対し類似すると考えられる。2の核酸配列又はポリペプチドが、実質的に同一であるとするさらなる指示が、最初のポリペプチド(たとえば、最初の核酸によりコードされるポリペプチド)が、第二のポリペプチドと免疫的に交差反応する(たとえば、第二の核酸によりコードされるポリペプチド)。従って、ポリペプチドが、典型的に第二のポリペプチドと実質的に同一であり、たとえば、ここで2のペプチドが、保存性置換基みよってのみ相違する。2の核酸が、実質的に同一であるという指示が、2の分子が、ストリジェントな条件下で互いに、又は他の分子の相補鎖に対しハイブリットすることである。一般的に少なくとも約25乃至約30の配列を、又はプローブヌクレオチド配列由来の隣接するヌクレオチドを用いて、鎖又はその相補鎖に対しストリジェントな条件下ハイブリッドする場合、実質的な同一性が存在する。

#### 【0077】

合成である分子(たとえば、核酸、タンパク質、又は小分子)は、化学的合成法により全体に、又は部分的に生成された分子である。

#### 【0078】

「標的タンパク質」発見の方法過程において、そして/又は治療標的に使用されるタンパク質を指している。一般的に標的タンパク質は、タンパク質の活性を調節する化合物を同定するスクリーニング・アッセイに使用される。

#### 【0079】

「試験化合物」は、アッセイにて試験される化合物を指している。

#### 【0080】

用語「治療としての有効量」は、研究者、獣医、医者、又は他の臨床家により求められる組織、系、動物又はヒトのたとえば例えば生物的、医薬応答など、所望の応答を惹起する主要化合物の量の意味である。

#### 【0081】

「形質転換」は、外在性核酸分子が、受容細胞に入る過程を記載している。形質転換は、技術的に周知な種々の方法により、天然の又は人工的な条件下で、生ずることができ、そして原核又は真核の宿主細胞に外在性核酸分子を挿入するためのいずれか知られた方法にて答えることができる。形質転換のための方法は、形質転換される宿主細胞の種類に基づいて選択され、それはウイルスの感染、りん酸カルシウムの沈積、エレクトロポレーション、熱ショック、脂質汚染及び粒子攻撃を含むことができる。「形質転換された」細胞は、自己複製プラスミド、又は1部分の宿主染色体として、及び挿入された核酸分子が、

10

20

30

40

50

複製又は分離できない一過性の形質転換細胞の何れかにて複製できる安定な形質転換細胞を含む。

#### 【0082】

用語「ベクター」は、核酸分子の増幅、複製、そして/又はプラスミド、ファージ、ウイルスの形状の担体の発現を言及し、ここでプラスミド、ファージ、又はウイルスが、細菌、酵母、非脊椎動物、及び/又は哺乳動物の宿主細胞により機能化される。ベクターは、宿主細胞のゲノムDNAと独立して保存し、又はゲノムDNAを全体又は1部で1体化できる。そのベクターは、適応可能な任意な宿主細胞において機能化されるように必要な全て要素を一般的に含むことができるが、それを全て含む必要がない。「発現ベクター」は、内在性ポリヌクレオチド、たとえば適切な条件下で、FALPをコードするポリヌクレオチドの発現を指令できるベクターである。

10

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0083】

##### 本発明を実施するための態様

本発明は新規なタンパク質の分子の同定及びクローニングに関し、そして記載している。このタンパク質は、脂肪の変換中に選択的に発現されることが示されてきた。そのタンパク質が、「FALPs」と称する。これらの機能が確認されていないが、推定として内在性膜タンパク質である。FALPのヒトとマウスとの相同性が、ヒトのFALP $\alpha$ 、ヒトのFALP $\beta$ 、マウスFALP $\alpha$ 、そしてマウスのFALP $\beta$ として、それぞれ2のサプライスされたアイソフォームとしてそれぞれ存在することが、発見された。配列の相同性を検索すると、FALPが、周知の機能を有する任意の遺伝子と同一の配列を共有しないことを示している。特定の脂肪組織の発現とインスリンに対するその応答性が与えられれば、FALPは、脂肪組織介在によるエネルギー代謝の調節に関与する新規種のタンパク質を表している。脂肪組織のFALPの特異的発現、その動的細胞内膜区分での局在化、及びそのインスリンに対するその応答性が与えられれば、FALPの機能が、GLUT4の転移、及びホルモン分泌などの脂肪細胞の細胞内輸送経路に関すると見受けられる。

20

#### 【0084】

さらにFALPは、肥満、肥満関連の症状、及びGLUT4の転移、及びホルモン分泌などの脂肪細胞の細胞内輸送経路に関連する症状の治療において、干渉としての標的であると考えられる。したがって1の観点において、本発明は、FALPの発現又は活性を下限に調節することにより、上記症状を治療する方法を提供する。関連する例において、本発明は、FALP(たとえばFALPを含む細胞)を含む組成物と、作因細胞(agent cell)とを接触させることにより、そしてその作因細胞(agent cell)に応答するFALPの活性又は発現の変化を検出することにより、上記症状を治療するために有益な作因細胞(agent cell)をスクリーニングする方法を提供する。1部、比較的、又は絶対的なFALPの欠陥により特徴付ける症状、不全又は疾患を、適切なFALPタンパク質、断片、バリエーション又は誘導体を投与による又は正のFALPアゴニストによる治療が、さらに考えられる。

30

#### 【0085】

インスリンへの応答を示す新規な脂肪組織の低分子量のタンパク質(FALPs)が、2DE分析により示されるように、脂肪細胞において差分的に発現されるが、前駆脂肪細胞において発現されない。FALP遺伝子が、茶色、及び白色の脂肪組織において著しく発現されるが、試験されたその他のどの組織においても発現されなかったことを、ノーザン・ブロット分析により示している。マウスのFALPのヒトとの相同性により、2の交互にサプライスされたアイソフォームとして存在し、そして同じN-末端を共有するがC-末端を異にすることが、発見された。さらにマウスのFALPsが、2のそれぞれのアイソフォームとして存在することも、発見された。配列決定分析で、ヒトのFALPとマウスのFALPの両方が、通常膜貫通領域を含むと考えられる。3T3 L1脂肪細胞及びCOS 7細胞において、一過性に発現されるFLAGエピトープにてタグ化されたタンパク質による免疫蛍光分析が示していることによれば、FALPが、静止状態において核周辺の領域で緻密な膜の画分に厳密に配置している。インスリンにて3T3 L1の脂肪細胞を処理すると、細胞質全体にわたって構造的に広がる多く

40

50

の個別のスポットにFALPの再分散が、誘発される。この組織特異的発現及びインスリンに対するその応答性により、FALPが、小胞輸送及びタンパク質分泌などの脂質機能に特異的に制限され過程に関与する可能性のあることを、示唆している。

# 【0086】

本発明のポリヌクレオチドは、マウスのFALP  $\alpha$  (配列番号9)、マウスのFALP  $\beta$  (配列番号12)、ヒトのFALP  $\alpha$  (配列番号15)、及びヒトのFALP  $\beta$  (配列番号18)のための以下のcDNAを含む。

# 【0087】

## 【表1】

### マウス FALP $\alpha$ cDNA:

```
GAAAAAAGC CACAGTCATG GCCAACGGGA CCGACGCCTC TGTCCCGCTC ACCAGCTATG AGTATTACCT
GGACTACATA GACCTCATTC CTGTGGACGA GAAGAAGCTG AAAGCCAACA AGCATTCCAT TGTCATCGCC
CTGTGGTTGA GCCTGGCTAC CTTCTGGTGT CTCCTCTTTC TCATCCTGCT CTACATGTCC TGGTCGGGCT
CCCCACAGAT GAGGCACAGT CCCCACCCC AGCCAATATG TTCATGGACT CACAGCTTCA ACCTCCCTCT
GTGCCTCCGG AGGGCCTCCC TGCAGACAAC AGAGGAGCCA GGAAGGAGAG CTGGCACTGA CCAGTGGTTA
ACGCAGCAGA GTCCTTCTGC CTCAGCCCCG GGGCCCCTGG CTCTCCCCTA GGACCAGGTC CAGGATGGAG
GTCCAGGGC ATCAGCTGGC CTCACACTCA AGCAGTGGTG AGCCTGGAGA CAGAGCGTCT CAACTGTAGA
ACGGATGATG CCAGAGAGCC AGTCGGGCTC AAGCAAACGG TGAAGTCCAA CCAACCCGGG CAGCTACGTC
TTTTTTAGGG CCGTTTACAA TGGCCTTGAA TATAGCAGGA AACTGACCGG GACAAAACCA AGTTTACAAA
GAGGACCATC ACACACATTG ATAGTGCAGC TAGGATGCAG GAGCTGCCCT GGACACAGCT GTCTCTGTTG
AGCAAGCTTA GCCTGCTTGC TGCTTACATT TGCTTTGGGG GTACACAGGA AAATAAAATG TGAATTAGGA
TAAAAA AAA [SEQ ID NO:9]
```

10

20

### マウス FALP $\beta$ cDNA:

```
ATGGCCAACG GGACCGACGC CTCTGTCCCG CTCACCAGCT ATGAGTATTA CCTGGACTAC ATAGACCTCA
TTCCTGTGGA CGAGAAGAAG CTGAAAGCCA ACAAGCGTAA GTCGGAACAC AGGAAGGTGA CCAGGCAGAG
GCTGGGGCTG GGGCTGAGCC GGGGGTGAGG CCCTCTTGGC TTGCCCCGTC CCTTACTAAC TCTGGCAGAC
ATGCTCAGCA GGGTTAACAT GGCTGGTGCT CACACAGACA TAAGCGAATC AGGCATGGGA CTCAACTGT
ATCTGTAAGT TTCAGTAGTA AACTTCTCT GAGTTAACTT GCCAAAAAAA AAAAAAAA A [SEQ ID
NO:12]
```

30

# 【0088】



【表 2】

## ヒト FALP α cDNA:

ATGGCCAACG GGACCAACGC CTCTGCCCCA TACTACAGCT ATGAATACTA CCTGGACTAT CTGGACCTCA  
 TTCCCGTGGA CGAGAAGAAG CTGAAAGCCC ACAAACATTC CATCGTGATC GCATTCTGGG TGAGCCTGGC  
 TGCCTTCGTG GTGCTGCTCT TCCTCATCTT GCTCTACATG TCCTGGTCCG CCTCCCCGCA GATGAGGAGG  
 AACAGCCCCA AGCACCACCA AACATGCCCC TGGAGTCACG GCCTCAACCT CCACCTCTGC ATCCAGAAGT  
 GCCTGCCGTG CCACAGGGAA CCCCTGGCAA CCTCACAGGC TCAGGCGAGC TCAGTGGAGC CAGGGAGCAG  
 AACTGGCCCT GACCAGCCGC TACGACAGGA GAGCTCCTCC ACCTTGCCCC TCGGGGGTTT CCAGACCCAC  
 CCCACTCTCC TCTGGGAACT GACCCTCAAT GGGGGTCCCC TCGTCAGGAG CAAGCCCAGC GAGCCTCCCC  
 CTGGAGACAG GACCTCTCAA TTGCAGAGCT GATGTCAGTA AATCGTGGCC ATAGCTGAGT GAACTGGTGA  
 AATCAAGCCA ACCTGGACAC ATACGTTCTT CGTTCTTCTT AGAGGCCATT TGCATGTAGC AGAAAGGGCA  
 CCTAGGTCAA GTGCAACTAG AGCAGGAGCA TCCTATGCCT TTGACAAAGA TTGCAGTGGC CCCTCGAGTG  
 CAGAGGTCAT CCCAGGTGTT GCTGAGTTTA TTGAGCACAC CTAGCCTGCT TGCTTACTGC TTATATTTGC  
 TCAGGGAAGA GTAGGAAAAT AAAATATATG CAAATCAAGA GGAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
 [SEQ ID NO:15]

10

## ヒト FALP β cDNA:

ATGGCCAACG GGACCAACGC CTCTGCCCCA TACTACAGCT ATGAATACTA CCTGGACTAT  
 CTGGACCTCA TTCCCGTGGA CGAGAAGAAG CTGAAAGCCC ACAAACATTC CATCGTGATC  
 GCATTCTGGG TGAGCCTGGC TGCCTTCGTG GTGCTGCTCT TCCTCATCTT GCTCTACATG  
 TCCTGGTCCG CCTCCCCGCA GATGAGCTTT AACACAGATG AATCTCTTCT GCATTCAGAA  
 GTGCTGCCTC AACTCGAGC TATTTCTGTG GATGAGCTCC AAGCCCCTAG AGAGGAAGGG  
 GCGGCCTGAC GAGGCACTGG ATGGGCCTCA TGGCCTAGAA GTCCCCACAT TCCTTGCAAC  
 TCTGATGCTG GGCACCTACA GGCCCGAGTT TATCATTTAC TGGGCAGTTC AATAAAGTCC  
 TCTCAACTTT TCTTGTCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA [SEQ ID NO: 18]

20

30

## 【0089】

さらに本発明のポリヌクレオチドは、成熟したマウスのFALP α (配列番号10)、成熟したマウスのFALP β (配列番号13)、成熟したヒトのFALP α (配列番号16)、及び成熟したヒトのFALP β (配列番号19)のための以下のコード配列を含む。

## 【0090】

【表 3】

## 成熟マウス FALP α:

ATG GCCAACGGGA CCGACGCCTC TGTCCCGCTC ACCAGCTATG AGTATTACCT  
 GGACTACATA GACCTCATTC CTGTGGACGA GAAGAAGCTG AAAGCCAACA AGCATTCAT TGTCATCGCC  
 CTGTGGTTGA GCCTGGCTAC CTTCGTGGTG CTCCTCTTTC TCATCCTGCT CTACATGTCC TGGTCGGGCT  
 CCCCACAGAT GAGGCACAGT CCCCACCCC AGCCAATATG TTCATGGACT CACAGCTTCA ACCTCCCTCT  
 GTGCCTCCGG AGGGCCTCCC TGCAGACAAC AGAGGAGCCA GGAAGGAGAG CTGGCACTGA CCAGTGGTTA  
 ACGCAGCAGA GTCCTTCTGC CTCAGCCCCG GGGCCCCTGG CTCTCCCCTA G [SEQ ID NO:10]

10

## 成熟マウス FALP β:

ATGGCCAACG GGACCGACGC CTCTGTCCCG CTCACCAGCT ATGAGTATTA CCTGGACTAC ATAGACCTCA  
 TTCCTGTGGA CGAGAAGAAG CTGAAAGCCA ACAAGCGTAA GTCGGAACAC AGGAAGGTGA CCAGGCAGAG  
 GCTGGGGCTG GGGCTGAGCC GGGGGTGA [SEQ ID NO:13]

## 成熟ヒト FALP α:

ATGGCCAACG GGACCAACGC CTCTGCCCCA TACTACAGCT ATGAATACTA CCTGGACTAT CTGGACCTCA  
 TTCCCGTGGA CGAGAAGAAG CTGAAAGCCC ACAAACATTC CATCGTGATC GCATTCTGGG TGAGCCTGGC  
 TGCCTTCGTG GTGCTGCTCT TCCTCATCTT GCTCTACATG TCCTGGTCCG CCTCCCCGCA GATGAGGAGG  
 AACAGCCCCA AGCACCACCA AACATGCCCC TGGAGTCACG GCCTCAACCT CCACCTCTGC ATCCAGAAGT  
 GCCTGCCGTG CCACAGGGAA CCCCTGGCAA CCTCACAGGC TCAGGCGAGC TCAGTGGAGC CAGGGAGCAG  
 AACTGGCCCT GACCAGCCGC TACGACAGGA GAGCTCCTCC ACCTTGCCCC TCGGGGGTTT CCAGACCCAC  
 CCCACTCTCC TCTGGGAACT GACCCCTCAAT GGGGGTCCCC TCGTCAGGAG CAAGCCCAGC GAGCCTCCCC  
 CTGGAGACAG GACCTCTCAA TTGCAGAGCT GA [SEQ ID NO: 16]

20

30

## 成熟ヒト FALP β:

ATGGCCAACG GGACCAACGC CTCTGCCCCA TACTACAGCT ATGAATACTA CCTGGACTAT CTGGACCTCA  
 TTCCCGTGGA CGAGAAGAAG CTGAAAGCCC ACAAACATTC CATCGTGATC GCATTCTGGG TGAGCCTGGC  
 TGCCTTCGTG GTGCTGCTCT TCCTCATCTT GCTCTACATG TCCTGGTCCG CCTCCCCGCA GATGAGCTTT  
 AACACAGATG AATCTCTTCT GCATTGAGAA GTGCTGCCTC AAACCTGAGC TATTTCTCTGT GATGAGCTCC  
 AAGCCCCTAG AGAGGAAGGG GCGGCCTGA [SEQ ID NO:19]

40

## 【0091】

本発明のポリヌクレオチドは、以下の成熟したマウスのFALP α (配列番号11)、成熟したマウスのFALP β (配列番号14)、成熟したヒトのFALP α (配列番号17)、及び成熟したヒトのFALP β (配列番号20)のアミノ酸配列を含む。

## 【0092】

【表 4】

マウス FALP  $\alpha$ :

MANGTDASVP LTSYEYYLDY IDLIPVDEKK LKANKHSIVI ALWLSLATFV VLLFLILLYM SWSGSPQMRH  
SPQPQPICSW THSFNLPLCL RRASLQOTTEE PGRAGTDQW LTQQSPSASA PGPLALP [SEQ ID NO:11]

マウス FALP  $\beta$ :

MANGTDASVP LTSYEYYLDY IDLIPVDEKK LKANKRKSEH RKVTRQRLGL GLSRG [SEQ ID NO:14]

10

ヒト FALP  $\alpha$ :

MANGTNASAP YYSYEYYLDY LDLIPVDEKK LKAHKHSIVI AFWVSLAAEV VLLFLILLYM SWSASPQMRH  
NSPKHHQTCP WSHGLNLHLC IQKCLPCHRE PLATSQAQAS SVEPGSRTGP DQPLRQESSS TLPLGGFQTH  
PTLLWELTLN GGPLVRSKPS EPPPGDRTSQ LQS [SEQ ID NO:17]

ヒト FALP  $\beta$ :

MANGTNASAP YYSYEYYLDY LDLIPVDEKK LKAHKHSIVI AFWVSLAAEV VLLFLILLYM SWSASPQMSF  
NTDESLHSE VLPQTRAISC DELQAPREEG AA [SEQ ID NO:20]

20

## 【0093】

本発明のその他のポリペプチドは、たとえば、N-末端にメチオニンを含まない成熟したマウスのFALP、成熟したマウスのFALP  $\beta$ 、成熟したヒトのFALP  $\alpha$ 、及び成熟したヒトのFALP  $\beta$ のアミノ酸配列を含む。本発明のさらなるポリペプチドは、たとえばC末端がアミド化された成熟したマウスのFALP  $\alpha$ 、成熟したマウスのFALP  $\beta$ 、成熟したヒトのFALP  $\alpha$ 、及び成熟したヒトのFALP  $\beta$ のアミノ酸配列を含む。本発明の他のポリペプチドは、  
たとえば、N-末端にメチオニンを含まず、そしてC-末端にアミド化された成熟したマウスのFALP  $\alpha$ 、成熟したマウスのFALP  $\beta$ 、成熟したヒトのFALP  $\alpha$ 、及び成熟したヒトのFALP  $\beta$ のアミノ酸配列を含む。

30

## 【0094】

本発明の実施は、分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学、及び免疫学の種々の従来技術(組み換え技術を含む)を、その他の点で指示されないかぎり使用することができ、それは技術的範囲内である。こうした技術は、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第二版(Sambrook and Russel, 1989) and MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第三版(Sambrook and Russel, 2001), (jointly and individually referred to herein as 「Sambrook」)などの文献に良く記載されている。OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS(M. J. Gait, ed., 1984); ANIMAL CELL CULTURE(R. I. Freshney, ed., 1987); HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY(D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); Gene TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELL(J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F. M. Ausbelら、eds., 1987, including supplements through 2001); IMMUNOLOGY(J. E. Coliganら、eds., 1991); THE IMMUNOASSAY HANDBOOK(D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); BIOCONJUGATE TECHNIQUES(Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); METHODS OF IMMUNOLOGICAL ANALYSIS(R. Masseyeff, W. H. Albert, and N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1993), Harlow and Lane(1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York, and Harlow and Lane(1999) USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY(

40

50

jointly and individually referred to herein as Harlow and Lane),Beaucageら、eds.,CURRENT PROTOCOLS IN NUCLEIC ACID CHEMISTRY John Wiley & Sons,INC.New York,2000);AND Agrawal,ed.,PROTOCOLS FOR OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGS,SYNTHESIS AND PROPERTIES Humana Press INC.,New Jersey,1993)などを参照。

#### 【0095】

1の観点において、本発明は、配列を有するポリペプチド、又は後に生ずる哺乳動物(例えばマウス又はヒト)のFLAP遺伝子又はRNAの配列を有するポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチド(たとえば、RNA,DNA,PNA又はキメラ)は、1本鎖、2本鎖、又は混合されたハイブリットでも良い。1の観点において、ポリヌクレオチドは、本明細書に示されるFALPの配列を又はその副配列(subsequence)(たとえば、本発明の少なくとも15、少なくとも25、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも500のポリヌクレオチドの塩基対及びそのバリエーションを含む)を有する。さらに本発明は、本明細書に記載されたFALPポリヌクレオチドに実質的に同一の配列を有するポリヌクレオチドを提供する。従って、本発明は、本明細書に開示されるFALPポリヌクレオチドのヒトの対立遺伝子のバリエーションなど哺乳動物のFALP遺伝子(たとえば、ヒト)の天然に存在する対立遺伝子を提供する。本明細書に記載されているように、幾つかの観点において、本発明のポリヌクレオチドが、本明細書に開示された配列と実質的に類似する配列を有するポリペプチドをコードするか、又はこうしたポリペプチドの断片(たとえば、融合タンパク質)をコードする。さらに考えられることは、遺伝子コードの変性により、天然に存在する核酸配列と実質的に類似しないが、本明細書に開示されている、ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドである。別の例において、本発明は、FALPポリペプチドをコードする必要がないが、たとえば、プローブ、プライマー、抗センス、トリプレックスRNAi、又はリボゾーム試薬などとして有益であるFALPポリヌクレオチドを提供する。

#### 【0096】

さらに本発明は、FALPポリヌクレオチドを含む、発現ベクター、細胞株、及びトランスジェニック生体を含む。幾つかの例において、本発明のベクター、細胞、及び生体は、コードされたFALPポリペプチドを発現させることができる。

#### 【0097】

この開示の指針を用いて、本発明のFALPポリヌクレオチドが、組み換え型手段により生成することができる。たとえば、Sambrookら、Berger and Kimmel(1987)METHODS IN ENZYMOLOGY,Vol. 152:Guide To Molecular Cloning Techniques,San Diego:Academic Press,INC.;Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,Green Publishing and Wiley-Interscience,New York(2001)を参照。選択肢として、FALPポリヌクレオチド又は断片が、技術的に周知の決められた方法を用いて、化学的に合成することができる(たとえば、Narangら、1979,Meth.Enzymol.68:90;Brown1979,Meth.Enzymol.68:109;Beaucageら、1981,Tetra.Lett.,22:1859を参照)。幾つかの例において、本発明のFALPポリヌクレオチドが、たとえばジオキシイノシン等、非天然に存在する塩基対を含む(たとえば、Batzerら、1991,Nucleic Acid Res.19:5081;Ohtsukaら、1985,J.Biol.Chem.260:2605-2608;Rosso liniら、1994,Mol.Cell.Probes 8:91-98を参照)、又は修飾された骨格の残基又は結合剤を含む。

#### 【0098】

本発明の種々の観点及び例の実施に使用するため、少なくともFALPタンパク質の幾つか、多く、又はこれらの全ての領域を調製及び単離することが好ましい。さらに、その他のヒト以外の種からFALPの相同部を、調製及び単離することが有益であり、そして本明細書教示することが、所望されればその目的に容易に適用することができる。

#### 【0099】

本発明のFALPが、天然に精製された生成物、化学的な合成方法による生成物、又は原核細胞又は真核細胞の宿主細胞(たとえば、細菌、酵母、より高級な植物、昆虫、及び哺乳動物の細胞の培養により)からの組換え技術により生成することができ、その宿主細胞に、1又は複数のFALPs、断片、類似体、バリエーション又は誘導体をコードするポリヌクレオチ

ドを宿している適切なポリヌクレオチドの構成物(たとえば、発現ベクター)が導入された。さらに本発明のポリペプチドが、たとえば最初にメチオニンアミノ酸残基を含むことができる。

#### 【0100】

好ましくはFALPタンパク質が、所望のタンパク質をコードする核酸分子を得て、この核酸分子を適切な発現ベクターに挿入し、そのベクターを適切な宿主細胞に挿入し、そしてFALPタンパク質を精製することにより、調製される。組替え型製造方法に使用される宿主に依存して、本発明のFALPは、翻訳後の修飾することができる(たとえば、グリコシル化、メチレート化)。

#### 【0101】

理解されるように、ポリヌクレオチドが、組替え体の技術にて、FALPの生成に使用される。FALPポリペプチドの生物活性を組替的に発現するために、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を適切な発現ベクターに挿入することができ、すなわちそのベクターが、適切な宿主細胞に挿入されたコード配列を転写及び翻訳を制御するための必要な要素を含むベクターである。これらの要素には、FALPをコードするベクター及びポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成的及び誘発可能なプロモータ、及び5'及び3'の未翻訳領域などの調節配列が含まれる。こうした要素が、これらの強度及び特異性により変えることができる。さらに特定の開始シグナルは、FALPコードの配列をより効果的な翻訳を行なうために使用することができる。こうしたシグナルには、ATG開始コドン、及び隣接する配列、たとえば、Kozak配列が含まれる。FALP及び5'開始コドン、及び上流の調節配列をコードするポリヌクレオチドが、適切な発現ベクターに挿入される場合に、追加としての転写又は翻訳の制御シグナルを全く必要としない。しかしながら、FALPコード配列又はその断片だけが挿入される場合、イン-フレームATG開始コドンを含む外在性翻訳制御シグナルが、ベクターにより提供されるべきである。外在性翻訳要素及び開始コドンが、種々の開始点からで良い。その発現効率は、使用される特定の宿主細胞系として適切なエンハンサーを含めることにより高めることができる。

#### 【0102】

技術的に周知な方法は、FALPをコードする配列、及び適切な転写及び翻訳制御要素を含む発現ベクターを構成するために、使用することができる。これらの方法は、以下に記載のような、*in vitro*における組み換え体のDNA技術、合成技術、及び*in vivo*における遺伝子の組み換えが含まれる。たとえば、Sambrookら、and Ausubelら(1995, and *Periodic supplements*), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. を参照。

#### 【0103】

FALPをコードする核酸分子が、化学的合成、cDNA又はゲノムライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリーのスクリーニング、そして/又はcDNAのPCRによる増幅を含むがそれに限定されることなく種々の方法を容易に得ることができる。こうしたDNAを単離するための有益なこれらの方法及び他の方法が記載されている、たとえば、by Sambrookら、Ausubelら、and by Berger and Kimmel(*Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques*, vol.152, Academic Press, Inc. San Diego, Calif.(1987))を参照。FALPsをコードする好ましい核酸分子は、哺乳動物の配列から得られる。FALPsをコードする最も好ましい核酸分子は、ヒト(又は他の霊長類)、ラット、又はマウスの細胞から単離される。

#### 【0104】

FALPをコードする核酸分子の化学的な合成は、技術的に周知な方法を用いて行なうことができ、こうした周知な文献が、Engelsら(*Angew. Chem. Intl. Ed.* vol.28:716-734(1989)); Caruthersら、*Nucl. Acids. Symp. Ser.* (7):215-223(1980)); and Hornら、*Nucl. Acids Symp. Ser.* (7):225-232(1980))に記載されている。これらの方法は、とりわけ核酸合成のりん酸化トリエステル、ホスホロアミダイト、及びH-ホスホネイト法を含む。典型的に、合成される全長のFALPポリペプチドをコードする核酸分子では、塩基対(bp)又は核酸の長さが数

10

20

30

40

50

百になり得る。長さが約100ヌクレオチドより長い核酸は、幾つかの断片として合成することができ、それぞれの断片は、最大約100ヌクレオチドの長さとなる。次ぎにその断片を、種々の方法でFALPコード遺伝子に構成することができ、たとえば、容易にするための短い1本鎖の5'及び3'領域を有する複数の2本鎖分子を結合し、その後FALPポリペプチドをコードする全長の核酸を形成するために結合させる方法である。選択肢として断片を、5'及び3'領域を含むようにそれぞれ指定し、相補性配列を含む核酸の断片に対しアニールすることができる。適切な条件下で、断片をアニールし、2本鎖及び1本鎖領域の両方を含む核酸分子を作成することができる。次ぎにこの1本鎖領域は、適当なDNAポリメラーゼを用いる反応で、2本鎖を作り出すことができる。たとえば制限部位を導入すること、アミノ酸の挿入、欠失、変化のための基準コドン挿入すること、グリコシル化の形状の変更、スプライシングのバリエーション生成など天然に生ずる配列に対する比較として、導入が変化する場合、核酸分子の化学的合成は特に好ましい。

10

#### 【0105】

選択肢として、FALPポリペプチドをコードする核酸が、適当なcDNAライブラリー(すなわち、ポリペプチドを発現すると知られ、又は考えられている1又は複数の組織の資源から調製されるライブラリー)、又はゲノムライブラリー(即ち全ゲノムDNAから調製されるライブラリー)をスクリーニングすることにより得ることができる。cDNAライブラリーの資源は、典型的に所望のFALPの適切な又は所望の量にて発現すると考えられる何れかの種からの組織である。ゲノムライブラリーの資源は、何れかの組織、又は所望のFALPをコードする遺伝子、又は所望のFALPと相溶性のある遺伝子を宿主すると考えられるいずれかの哺乳動物又は他の種からの組織で良い。そのライブラリーが、ライブラリーに存在するFALP又はFLAPに相同するcDNA又は遺伝子と選択的にハイブリット化する1又は複数の核酸プローブを使用して(クローンされるFALP又はFLAPに相同するcDNA又は遺伝子に同一性を有する配列の受け入れ可能なレベルを有するオリゴヌクレオチド、cDNA、又はゲノムDNA断片)、存在するFALP cDNA/遺伝子をスクリーニングすることができる。こうしたライブラリー・スクリーニングのため使用される典型的なプローブは、ライブラリーが調製された種と同じか、類似する種から小領域のFALPヌクレオチド配列を通常通常コードする。選択肢として、プローブは、明細書記載のように変性して良い。

20

#### 【0106】

CDNAsの全長をスクリーニングする場合、より長いcDNAを含むように、選択されたサイズを有するライブラリーを有することが好ましい。さらに、遺伝子の5'領域を含む配列をしばしば含む優先性を無作為にしたライブラリーが、オリゴd(T)ライブラリーが、全長cDNAを生成しない状況としては好ましい。ゲノムライブラリーが、5'の非転写調節領域に配列を伸長するには有益である。FALPをコードする核酸分子が、プロモータ及び調節配列など、上流の配列を検出するため技術的に知られた1部ヌクレオチド配列を利用し、そしてPCRを基本とした種々の方法を用いて、伸長することができる。PCRを基本とした方法として、プライマーは、何か適当なソフトウェアを使用して指定することができる。典型的にPCRプライマーが、約22から30の長さのヌクレオチドになるよう、GCの含量を約50%以上有し、そして約68°Cから72°Cの間の温度で、鋳型にアニールするよう一般的に指定される。

30

40

#### 【0107】

ライブラリーのスクリーニングは、非特異的な又は所望されない結合を防止するが、プローブ又はプライマーと有意な又は所望のレベルを有するこれらクローンを結合できるストリンジエンシーの条件下で、ライブラリー中のクローンから核酸分子へのプローブをアニーリングすることにより行なうことができる。典型的なハイブリット化、及び洗浄のストリンジエンシーな条件は、サイズ(すなわち、ヌクレオチドの長さの数値)に、そしてプローブが変性しているかどうかにある程度依存する。さらにクローンを得るという確率が、指定するハイブリット化反応条件を(すなわち、CDNAであろうとゲノム・ライブラリーであろうとスクリーニングされ；もしそれがcDNAライブラリーであれば、関連するcDNAが、高レベルで存在するという確率である)指定する場合に考えられる。

50

## 【0108】

長い核酸(cDNAsなど)がプローブとして使用される場合、典型的なハイブリット条件が、たとえば、Ausubelらにより記載された条件である。ハイブリット化の後、ライブラリーを含むプロットが、適当なストリンジェンシーで洗浄され、プローブのサイズ、クローンに対するプローブの期待される相溶性、スクリーニングされるライブラリーの種類、スクリーニングされるクローンの数などの幾つかの因子に依存する。さらにストリンジェンシーな洗浄溶液の例(通常は、イオン強度が低く、そして比較的に高い温度が使用される)は、以下のものである。こうしたストリンジェントな洗浄の1が、0.015MのNaCl, 0.005Mのクエン酸ナトリウム、及び55乃至65℃で0.1%のSDSである。別のこうしたストリンジェントな緩衝液は、約40乃至50℃での1mMのNa<sub>2</sub>EDTA, 40mMのNaHPO<sub>4</sub>, pH 7.2, 及び1%のSDSである。その他のストリンジェントな洗浄が、約50乃至65℃で0.2XSSC及び0.1パーセントのSDSである。オリゴヌクレオチド・プローブが、cDNA又はゲノムライブラリーを選別するために使用される場合、例えば下記のようなストリンジェントな洗浄条件として2種類の方法を使用することができる。第一の方法は、約35と62℃との間の温度で、0.05%のピロリン酸ナトリウムと共に6XSSCを使用する。たとえば、14塩基のプローブが、35乃至40℃にて洗浄され、17塩基のプローブが、45乃至50℃で、20塩基のプローブが、52乃至57℃で、そして23塩基のプローブが、57乃至63℃で洗浄される。非特異的に結合するバックグラウンドが、高いと見られる場合、その温度を2乃至3℃高くすることができる。第二の方法は、洗浄するためにテトラメチル・アンモニウム・クロライド(TMAC)を使用する。こうしたストリンジェントな洗浄溶液の1が、3MのTMAC, 50mMのTris-HCl, pH 8.0, そして2%のSDSである。この溶液を使用する洗浄温度は、プローブの長さの関数である。たとえば、17塩基プローブは、約45乃至50℃で洗浄される。

## 【0109】

FALPポリペプチドをコードする核酸を得るための好ましい方法は、FALPをコードする核酸(すなわち、ポリ(A)+RNA又は全RNA、cRNA、ゲノムDNA)から所望のFALP配列を増幅するために使用される。たとえば、ポリ(A)+RNA又は全RNAが、FALPコード配列の資源である場合、最初cDNAが、酵素として逆転写酵素を使用するRNAから調製することができる。次にFALP cDNAの2の別の領域に典型的に相補な2のプライマー(オリゴヌクレオチド)が、ポリメラーゼ(たとえば、Taqポリメラーゼ)と共にcDNAに付加され、そして適切な反応条件下、ポリメラーゼが2のプライマー間のcDNA領域を増幅する。

## 【0110】

FALPポリペプチドをコードする核酸を調製するための選択方法が、オリゴヌクレオチド・プライマー又はプローブ(たとえば、PCR, cDNA, 又はゲノムライブラリー・スクリーニング)を使用する必要がある場合、プローブ又はプライマーとして選択されるオリゴヌクレオチド配列には、ライブラリー・スクリーニング又はPCR増幅中に生ずる非特異的結合量を最小にするように、十分な長さ及び十分な正確性があるべきである。プローブ又はプライマーの実際の配列は、別の生体と同じか又は類似の遺伝子から保存されるか、又は高い相溶性配列、又は領域に通常は基づいている。所望によりプローブ又はプライマーが、全体又は1部変性させることができる、すなわちプローブ/プライマーの混合物を含み、全てが同じ核酸配列をコードするが、それを行なうために異なるコドンを使用する。変性を調節するためのそれぞれのプローブを、種で変化するこれらの1部又は全てのコドンの位置でイノシンで置き換えることである。オリゴヌクレオチド・プローブ又はプライマーが、化学合成法により調製することができる。

## 【0111】

さらにFALP変異体又はバリエーション配列は、本発明の実施に使用される。本明細書に使用されるような、変異体又はバリエーション配列は、たとえば、野生型アミノ酸配列と比較してアミノ酸配列の変動体となる野生型アミノ酸配列と比較して1又は複数のヌクレオチドの置換、欠失、付加、及び／又は挿入を含む配列である。幾つかの例において、天然に生ずるFALPアミノ酸が、天然の対立遺伝子の変動体(variation)の存在により、存在することができ、さらに使用することができる。

## 【0112】

さらに、遺伝子コードの変性の結果として、特定のFALPをコードする複数のポリヌクレオチド配列で、その幾つかが、いずれか周知のポリヌクレオチド配列に対し、そして天然に生ずる遺伝子に最小に類似したものが、生成できることが、当業者には理解出来よう。したがって、本発明では、可能性のあるコドンの選択に基づいた見合わせを選択することにより、作成することができるポリヌクレオチドの配列のそれぞれ、及びあらゆる可能性のある変動体 (variation) が考えられる。これらの組み合わせは、標準のトリプレット遺伝子コードに従って行なわれ、そしてこうした変動体 (variation) の全ては、特別に開示されたものとして考えるべきである。理解されているように、組み換え型FALPの発現のため選択される宿主細胞の種類において、高レベル(いわゆる「基準コドン」)で発現される天然の遺伝子で過剰に表されるよう、統計的分析により見出されるコドンを含むためのFALPに対する1部又は全てのコード配列が、技術者にとって有益となり得る。コードされたアミノ酸配列を変更することなく、FALPをコードするヌクレオチド配列の実質的な変更のための、他の理由としては、天然に生ずる配列から生成され転写物よりより長い半減期、異なる二次構造など、有意に所望される特性を有するmRNAの転写物の製造が、あげられる。

## 【0113】

FALPポリペプチド(又はたとえば、その断片又はバリエーション)をコードするポリペプチドを生成した後、FALPをコードする核酸のヌクレオチド配列を、意図され又は所望される核酸配列を有する核酸分子が、生成されたことを確認するために決定することが好ましい。核酸の配列決定のための方法は周知で、一般的に利用可能で、そして本発明の例の何れかを行なうために使用することができる。DNAポリメラーゼIなどのKlenow断片、Sequenase R<sup>TM</sup> (US Biochemical Corp., Cleveland, Ohio)、Taqポリメラーゼ (Perkin Elmer)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham, Chicago, Ill.)、又はポリメラーゼと校正したエキソヌクレアーゼの組み合わせとしての酵素を使用することができる。好ましくは、その方法が、Hamilton Micro Lab 2200 (Hamilton, Reno, Nev.), Peltier Thermal Cycler (PTC200; MJ Research, Watertown, Mass.), and the ABI Catalyst and 373 and 377 DNA Sequencers (Perkin Elmer)などの機械により自動化される。

## 【0114】

従って1の観点において、本発明は、本明細書に開示された配列の1つを有するFALPポリペプチド、その断片、そのバリエーション(たとえば、保存性遺伝子又は対立遺伝子のバリエーション)、又はFALP融合ポリペプチドなどのFALPポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。1つの例において、本発明のポリヌクレオチドが、天然に生成するFALPポリペプチド又はその断片を含む。他の例において、ポリヌクレオチドが、天然に生成するFALPポリペプチド又はその断片をコードするが、本明細書に示されるヒト又はマウスの対立と異なる配列を有する。

## 【0115】

本発明のポリヌクレオチドは、FALPポリヌクレオチド(たとえば、センス又は抗センスRNAs)、及びポリペプチドの発現に対し有益である。本明細書に明示されているように、ポリヌクレオチド及びポリペプチドの組み換え型発現の方法は、技術的に周知である。典型的に、本発明のFALPポリヌクレオチドが、FALPポリペプチド及びポリヌクレオチドの調製のための発現ベクターに使用される。従って、1の例において、本発明のFALPポリペプチドをコードするDNAを、細菌(たとえば、E. coli, Bacillus subtilis)、酵母(たとえば、Saccharomyces)、昆虫(たとえば、Spodoptera frugiperda)、又は哺乳動物の細胞培養系などのin vivoにおける宿主細胞に導入でき、そしてそこで発現できるDNA構成物に挿入される。本発明のポリペプチドを発現及び製造するために有益な哺乳動物の細胞培養系の例は、ヒト胚性腎臓株(293; Grahamら、1977, J. Gen. Virol. 36:59); CHO(ATCC CCL 61 and CRL 9618); ヒト頸部ガン細胞(HeLa, ATCC CCL 2); 及び技術的に周知な他の物を含む。有益なヒト、及び非ヒトの細胞株は、たとえば、American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 (<http://www.atcc.org>を参照)から広く入手することができ



る。ポリペプチドを発現するために哺乳動物の組織培養細胞の使用が、一般的にWinnacker, FROM GENES TO CLONES(VCH Publishers, N.Y., 1987) and Ausubelらで記載されている。

#### 【0116】

幾つかの観点において、哺乳動物遺伝子から、又は哺乳動物のウイルスからのプロモータは、たとえば、哺乳動物の細胞株の発現のため使用される。適切なプロモータは、構成的に、細胞種に特異的に、段階(stage)に特異的に、そして/又は調節又は制御(たとえば、グリコルチコイドなどのホルモンにより)することができる。有益なプロモータは、メタロチオネンプロモータ、構成的なアデノウイルス主要後期プロモータ、デキサメタゾン・誘発可能なMMTVプロモータ、SV40プロモータ、及び技術的に周知なプロモータ-エンハンサーの組み合わせを含むがそれに限定されない。

10

#### 【0117】

FALPポリペプチド又は断片が、宿主細胞の染色体内に移送する適切な発現ベクターを使用して、トランスゲニック動物(マウス、ヒツジ、ウシなど)、及び植物(タバコ、シロナズナ(arabidopsis)など)にも発現させることができる。

#### 【0118】

その他の観点において、本発明は、FALPポリヌクレオチドを検出又は増幅するための、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドプローブ、及び/又はプライマーを提供する。種々の例において、ポリヌクレオチド(たとえば、プローブ及びプライマー)は、本明細書に開示されるFALP(天然に生成する)に同一に、又は明確に相補性である少なくとも約10の連続塩基を含み、通常少なくとも約12塩基、典型的に少なくとも約15の塩基、一般的に少なくとも約18の塩基、そして時には少なくとも約25、少なくとも約50、又は少なくとも約100塩基を含む。本発明のFALPポリヌクレオチドは、プローブ又はプライマーとして使用される場合、これらが一般的に長さが約1000塩基より短く；典型的にこれらは、FALP(天然に生成する)に同一に、又は明確に相補性である約12と約500の間の連続したヌクレオチドを含み、より頻繁には約12と約50の連続ヌクレオチドの間で、さらにより頻繁には約15と約25の連続ヌクレオチドの間である。幾つかの観点において、プローブ及びプライマーがたとえばプローブ及びプライマーに制限部位を付加することにより修飾される。別の例において本発明のプライマー又はプローブが、リンカーなどの付加配列を含む。さらに幾つかの他の例において、本発明のプライマー又はプローブが、検知することのできる標識にて修飾される。たとえばプライマー又はプローブが、化学的に修飾され、たとえば誘導され、修飾されたヌクレオチド塩基を組み入れられ、又はたとえば抗リガンド(たとえば、ビオチン)により結合できるリガンドを含む。

20

30

#### 【0119】

本発明のFALPプローブ及びプライマーを、たとえば、本明細書に詳細に記載されているように、生物的な試料におけるFALPポリヌクレオチドを検出又は増幅するための、多くの目的に対し使用することができる。たとえば、本明細書の指針を提供する場合、当業者が、試料中のFALP遺伝子、mRNA、又はcDNAの全て、又は1部を特異的に増幅するプライマーの塩基対を選択できるようになる。

#### 【0120】

さらに本発明では、FALP発現のためのベクターの調製が考えられる。クローニング後又はFALPポリペプチド、又はその断片をコードするcDNA又は遺伝子が単離された後、遺伝子のコピー数を増大させるため、及び/又は適切な宿主細胞中ポリペプチドに発現させるための増幅及び/又は発現ベクターに、それが典型的に挿入される。そのベクターは、しばしば商業的に入手でき、「カスタム・メイド」によるがベクターは十分に使用することができる。

40

#### 【0121】

そのベクターが、使用される特定の宿主細胞に機能的となるように選択される(すなわち、ベクターは、FLATをコードするポリヌクレオチドの増幅、及びFALPの発現が形成できるように宿主細胞の機構と適合性がある)。好ましい例において、FALPを発現できる発現ベクターが、種々の作用要素を含む。これらの「作用要素」が、少なくとも1のプロモ-

50

タ、配列に結合又は配列に入る少なくとも1のリボソーム、及び少なくとも1の末端コドンを含む。さらにこうした「作用要素」オペレータとして、シグナル配列、及び細胞内の空間から細胞外へ輸出するためのタンパク質、及びFALP-コードポリヌクレオチドの適切な転写及びその後の翻訳の必要な、又は好ましいその他の何れかの配列が、あげられる。

#### 【0122】

本発明のさらなる例が、明細書記載の1又は複数の作用要素を含む他に知られた、又は現段階で発見されていない発言ベクターを使用するものとして想定される。特にこれらのベクターが、以下の特徴の幾つか、又はその全てを有することが好ましい、すなわち：

(1)宿主の生体配列の最小数を所有すること；(2)所望の宿主細胞において安定であること；(3)所望の組織内で高いコピー数にて存在できること；(4)調節可能なプロモータを所有すること；(5)FALP-コードするポリヌクレオチドが挿入される所から離れたベクター部分を存在する選択可能な特性をコードする少なくとも1のDNA配列を有すること、そして(6)ベクター内に一体化されることがあげられる。

#### 【0123】

もし原核細胞、酵母、昆虫、(バクテリオファージ系)及び／又は真核細胞を基盤とする発現系、又は細胞のない発現系であるとしても、FALPポリペプチド又はその断片が、何か適切なクローニングそして／又は発現系において、増幅／発現することができる。言い換えると、何か適切な発現ベクター／宿主系が、FALPをコードする配列を含み、そして発現するために利用することができる。これらは、組み換え型バクテリオファージ、プラスミド、又はコスミドDNA発現ベクターにて形質転換された細菌、酵母発現ベクターにより形質転換された酵母；ウイルス発現ベクターに感染した昆虫細胞系(たとえば、カリフラワー・モザイク・ウイルス(CaMV)又はタバコ・モザイク・ウイルス(TMV)又は細菌発現ベクター(たとえば、Ti又はpBR322プラスミド)；又は動物細胞系などの微生物を含む。本発明は、使用される宿主細胞により限定されない。

#### 【0124】

細胞を基盤とする発現系に関し、宿主細胞の選択は、FALPポリペプチド又はその断片が、グリコシル化されるかリン酸化されるかどうか、少なくともある程度依存している。そのように、真核宿主細胞を基盤とした発現系(たとえば、酵母、昆虫、又は哺乳動物の宿主細胞)が好ましい場合、酵母細胞が、ポリペプチドをグリコシル化し、そして昆虫及び哺乳動物の細胞が、FALPポリペプチドが生成される細胞において(すなわち「天然の」グリコシル化、及び／又はリン酸化)天然に生成するポリペプチドをグリコシル化及び／又はリン酸化することができる。さらにFALPポリペプチドの産生のための宿主細胞の選択は、生体的に活性なタンパク質が調製されるように、宿主細胞がその天然の三次構造体(たとえば、適切な配置によるジスルフィドによるブリッジなど)に「折り畳み」できるような方法に、ある程度基づいて決定することができる。FALPポリペプチドが、本明細書に記載されているような、適切な化学条件を使用して合成の後「折り畳み」することができる。さらに宿主細胞株は、挿入される配列の発現を調節し、又は発現されたタンパク質を他の所望の方法で処理できよう選択することができる。さらにこうしたポリペプチドの修飾は、アセチル化、カルボキシル化、脂質化、及びアシル化を含むがそれに限定されない。

#### 【0125】

タンパク質の「プレプロ」形状を切断する翻訳後のプロセッシングは、特定タンパク質のターゲッティング、折り畳み、及び／又は活性に使用することができる。翻訳後の活性のための特定の細胞機構及び特徴的な機構を有する異なる宿主細胞(たとえば、CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and WI38)が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC, Bethesda, Md.)から入手でき、そして正しい修飾を、そして外来タンパク質のプロセッシングを保証するために選択することができる。

#### 【0126】

使用される宿主細胞が、グラム陰性細胞又はグラム陽性細胞、たとえば組み換え型発現のため使用されるE.coli, Bacillus, Streptomyces, Salmonella菌などの菌株などの原核細胞でよく、あるいは酵母細胞、昆虫細胞、又は脊椎動物の細胞などの真核細胞の宿主細胞

10

20

30

40

50

で可能である。CHO(チャイナー・ハムスターの卵巣)、ヒトの腎臓293細胞、COS-7細胞、Sf4,Sf5,Sf5,Sf9,及びSf21などの昆虫細胞、及びHigh5(Invitrogen Company, San Diego, Calif.からの全て); 及びSaccharomyces(たとえば、S.cerevisiae)、及びPichia species(たとえば、P.pastoris)などの種々の酵母菌が好ましい。

#### 【0127】

細菌系が、得ることのできる発現レベル、及び広範囲の容易に入手できるベクター及び作用要素を含む種々の利用のため使用することができる。細菌系において多くのクローニング及び発現ベクターが、特定FALPをコードする配列のポリヌクレオチドを意図しての使用により選択することができる。たとえばFALPをコードするポリヌクレオチド配列の一定のクローニング、サブクローニング、及び増殖(propagation)が、Bluescript<sup>TM</sup> (Stratagene)又はpSport1<sup>TM</sup>プラスミド(GIBCO BRL)などの多機能なE.coliベクターを使用して行なうことができる。さらに技術的に利用できるこれら及び他のベクターが、in vitroにおける転写、ジデオキシ・シーケンシング、ヘルパー・ファージによる単一鎖レスキュー、及び巣とされた欠失の発生に対しても有益である。大量のFALPが、たとえば、高性能のスクリーニングを必要とする場合、所望のFALPの高レベルを指令するベクターを使用することができる。たとえば、強い、誘発可能なT5又はT7バクテリオファージ・プロモータを含むベクターを使用することができる。従って細菌系において、多くのクローニング及び発現ベクターが、特定FALPをコードするポリヌクレオチド配列と考えられる使用により、選択することができる。たとえば、一定のクローニング、サブクローニング、及びFALPをコードするポリヌクレオチドの配列の増殖が、Bluescript<sup>TM</sup> (Stratagene)又はpSport1<sup>TM</sup>プラスミド(GIBCOBRL)などの多機能E.coliベクターを用いて行なうことができる。技術的に利用できる。さらにこれら及び他のベクターが、in vitro転写、ジデオキシ配列決定、ヘルパー・ファージによる1本鎖レスキュー、及びクローン配列における巣とされた欠失の生成に対し有益である。大量のFALPが必要な場合、たとえば、高速スクリーニングに対し、所望のFALPの高レベル発現を指令するベクターを使用することができる。たとえば、強く、誘発可能なT5又はT7のバクテリオファージ・プロモータを使用することができる。

#### 【0128】

さらに酵母発現系が、FALPsを生成するために使用することができる。アルファ因子、アルコール・オキシダーゼ、及びPGDなどの構成的又は誘発可能なプロモータを含む多くのベクターが、Saccharomyces cerevisiae、又はPichia pastorisに使用することができる。さらに、こうしたベクターが、発現タンパク質の分泌か細胞内の保持のいずれかを指令でき、そして安定な増殖のための宿主ゲノムに外来配列の組み込みを可能にする。

#### 【0129】

酵母内に導入された外来のDNAの保守は、幾つかの方法において影響を与えることができる(Botstein and Davis,the Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces,Cold Spring Harbor Laboratory,Strathern,Jones and Broach,eds.,pp.607-636(1982)を参照)。たとえば、属、Saccharomycesの宿主生体を伴い使用するための発現系では、2μのプラスミドに抗-コラゲナーゼ遺伝子を存在させる。2ミクロンの円形状である利点としては、特定の酵母株に導入される場合、比較的高いコピー数及び安定性が含まれる。これらのベクターは、細菌(たとえば、E.coli)の複製及び選択できる、細菌の複製開始点、及び少なくとも1つの抗生物質耐性の標識を組み入れることが、好ましい。さらに、プラスミドが、2μの配列、及び酵母の選択可能なマーカー遺伝子(たとえば、LEU2遺伝子)有することが好ましい。

#### 【0130】

さらに植物系は、FALPsの発現のため使用することができる。所望のFALPをコードする配列の転写により、ウイルス・プロモータ、たとえば、TMVからオメガ・リーダ配列単独、又はその組み合わせで使用されるCaMVの35S及び19Sのプロモータが誘導される。Takamatsu,N.,EMBO J.vol 6:307-311(1987)を参照。選択肢として、RUBISCOの小サブユニット又は熱ショックプロモータなどの植物プロモータを、使用してもよい。これらの構成物が、DNA形質転換又は病原体介在トランスフェクトの指令により、植物細胞に導入することが

できる。

#### 【0131】

哺乳動物系における組換え型タンパク質の長期の製造のためには、細胞株の特定FALPの安定な発現が好ましい。たとえばウイルス複製の開始点、そして/又は内在性発現要素及び同じベクター又は離れたベクターの選択可能な標識遺伝子を含むことができる発現ベクターを使用して、所望のFALPをコードするポリヌクレオチドを、細胞株に形質転換することができる。ベクターを導入した後、細胞を、選択性培地に切り替えられる前に、豊富な培地中に約1乃至2日間増殖させることができる。選択マーカーの目的は、選択剤に対し耐性を与えることで、そしてその存在が、導入される配列を継続して発現する細胞を増殖尾及び回復させることができる。安定に形質転換された細胞の耐性クローンを、細胞の型に適切な組織培養技術を使用して増殖させることができる。

10

#### 【0132】

本明細書に明示されるように、いずれかの真核宿主細胞に使用されるベクターが、5'側鎖(flanking)配列、及びエンハンサーなどの同様の他の調節要素、複製開始点の要素、転写末端要素、ドーナ及びアクセプター・スライス部位を含む完全なイントロン配列、シグナル・ペプチド配列、リボソーム結合部位要素、ポリアデニール化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、及び選択可能なマーカー要素を含むことができる。原核生物の発現系におけるFALPsの発現のための有益なベクターでは、外在性配列を配列を発現すべきわずかな要素が必要であり、たとえば、プロモータ、複製の開始点(複数の宿主細胞の分割を介して複製及び増殖されると考えられるベクターに対し)、及び転写末端要素を含む。FALPをコードするポリヌクレオチドの発現を調節するため関与する選択可能なマーカー要素及び他の調節要素がさらに含まれる。所望により、ベクターは、「タグ(tag)」配列、すなわちpolyHis(hexaHisなど)又はその他の小さい免疫原配列をコードするFALPコーディング配列の5'又は3'末端に配置されたオリゴヌクレオチド配列を含む。好ましくは、このタグが、タンパク質と共に発現され、そして後のFALPポリペプチドの精製のための親和性タグ(tag)として働くことができる。所望により、タグは、たとえば選択されたペプチドを使用するなど種々の手段により、後で精製されたFALPポリペプチドから取り出すことができる。

20

#### 【0133】

実際に、これらを容易に単離され、構成され、そして相互交換ができるようなベクターを構成することが、必要である。これは、これらの要素の組み合わせ、およびFALPポリペプチド、断片、又はバリエーションのためのコード領域から多くの機能遺伝子の構成を容易にする。さらに、これらの要素の多くは、2つ以上の宿主に適応し得る。

30

#### 【0134】

本明細書に記載されているように、発現ベクターにおけるFALPをコードするポリヌクレオチドが、mRNAを合成を指令するための適切な発現制御配列(たとえば、プロモータ)に作用的に結合される。プロモータが、RNAポリメラーゼの結合を促進し、そして転写を開始させる配列であり、そしてFALPをコードするポリヌクレオチドの発現を調節するために、プロモータは、いずれかの発現ベクターに含まれるべきである。こうしたプロモータの代表的例としては、本発明に従い使用のため特定FALPの発現のため選択される原核又は真核宿主細胞における遺伝子の発現を制御するために知られた、上記のもの及びレトロウイルスLTRs又はSV40の早期又は後期プロモータ、CMV極初期プロモータ、HSVチミジン・キナーゼ・プロモータ、E.coli lacI, lacZ, 又はtrpプロモータ、ファージ・ラムダP<sub>L</sub>又はP<sub>R</sub>プロモータ、T3又はT7ファージ・プロモータ、及び他のプロモータが含まれる。転写を制御する他の要素たとえばオペレータが、所望により機能的に協調されたプロモータとこうした協調的な要素機能を所望により提供することができる。良く知られたオペレータの例は、lacオペレータであり、それは、化学誘発剤イソプロピルチオ-β-d-ガラクトシド(IPTG)の存在に、関連するプロモータからの転写を活性にするための働きをする。IPTGのない場合に転写が現れる。発現を誘発できるこれら、そして他の例が、所望の組み換え遺伝子(たとえば、FALPをコードするポリヌクレオチド)の発現を容易にすることができる。たと

40

50

えば、lacオペレーターが存在する場合、ベクターを含む形質転換された宿主細胞が、コードされたFALPの発現を開始する前に、所望の密度に増殖することができる。所望の密度が達成されると、IPTGを付加しlac関連のプロモータの抑圧を軽減し、これによりFALPを発現可能にする。

#### 【0135】

本明細書に記載されるように、さらに天然に存在するFALPプロモータを含むFALPフランキンク(flanking)配列を、調製することができる。5'フランキンク配列が、種々の転写因子結合部位を有し、さらにTATAボックス及びCCAATボックスを有する。こうした5'フランキンク(flanking)配列が、単独、又はこうしたエンハンサー要素、レプレッサーなどの(極めて遠位に配置される何れか、又は全て)他の因子との組み合わせのいずれかにて、in vivoにおける天然に調節する転写として特徴付けられる。好ましい5'フランキンク配列が、哺乳動物のFALP5'のフランキンク配列である。最も好ましい5'フランキンク配列が、ヒトのFALP5'のフランキンク配列である。

10

#### 【0136】

5'フランキンク配列が、好ましくは所望のFALP遺伝子の5'部分にハイブリダイズするcDNAを有するライブラリーをスクリーニングすることによるゲノムライブラリー又はゲノムFALP断片から得ることができる。こうした断片が、FALP5'フランキンク配列の1部又は全てを含むライブラリーにおけるクローンにハイブリダイズすることができ、それが、FALPへのコード配列の開始に対し、丁度5'に一般的に配置される。同定されたクローンが、プロモータの1部だけを含む場合、クローンそれ自体又はその断片が、付加的に5'フランキンク配列を得るため、後の周辺のゲノムライブラリー・スクリーニングに対し使用することができる。断片によるスクリーニング(ハイブリダイゼーション及び洗浄を含む)は、FALPゲノム及び／又はcDNAをクローニングするため、上記のように行なうことができる。

20

#### 【0137】

5'のフランキンク配列が、相同性(即ち宿主細胞としての同じ種及び／又は株)、異種性(即ち宿主細胞の種又は株以外の種から)、ハイブリット(すなわち、2以上の資源から5'フランキンク配列の組み合わせ)、合成でよく、又はそれは、天然のFALP 5'フランキンク配列で良い。5'フランキンク配列の資源が、いずれかの単一細胞の原核生物、又は真核生物、いずれかの脊椎動物又は非脊椎動物、又は何らかの植物にて可能であり、5'フランキンク配列が、宿主細胞の機構内にて機能し、そしてその機構により活性化することができる。

30

#### 【0138】

本発明のベクターに有益な5'フランキンク配列が、技術的に周知な幾つかの方法のうちのいずれかにより得ることができる。典型的に、FALP5'フランキンク配列以外の本明細書に有益な5'フランキンク配列は、マッピングにより、そして/又は制限酵素エンドヌクレアーゼの消化によりこれまで同定されてきており、さらに適切な制限酵素エンドヌクレアーゼを使用して適切な組織資源から単離することができる。幾つかの場合に、5'フランキンク配列の全長ヌクレオチド配列が、知られている。こうした場合に、5'フランキンク配列が、核酸合成又はクローニングのための上記方法を使用して合成することができる。

#### 【0139】

5'フランキンク配列の全て、又はその1部だけ知られている場合、それは、同じ又は別の種からの適切なオリゴヌクレオチド及び／又は5'フランキンク配列の断片を有するPCRを用いて、そして/又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。5'フランキンク配列が、知られていない場合、ある5'フランキンク配列を含むDNA断片が、たとえば、コード配列又はさらに別の遺伝子、又は遺伝子群を含むことができる多種のDNAから単離することができる。単離は、正しいDNA断片を単離するために、1又は複数の慎重に選択された酵素を使用して、制限酵素エンドヌクレアーゼでの消化により行うことができる。消化後、所望の断片を、アガロース・ゲル精製、QiagenR<sup>TM</sup>カラムは、他の周知の方法により単離することげできる。

40

#### 【0140】

50

複製の開始点が、典型的に原核生物の発現ベクター1部、そして宿主細胞中のベクターの増幅を支援する。特定のコピー数へのベクターの増幅が、ある場合にFALPポリペプチドの最適な発現のため重要である。選択するベクターが、複製開始点が確かでない場合、たとえば、それが、周知の配列に基づいて化学的に合成され、ベクターの適切な位置に挿入される。そのベクターが、異なる種から宿主細胞に導入されるよう設計された(たとえば、細菌宿主細胞内にベクターを増幅し、次にそのベクターを、真核生物の宿主細胞に、コードされたFALPを最終的な発現をするための哺乳動物の細胞としての酵母細胞)に導入され、それが、複数の複製開始点を含むよう遺伝子操作することができる。適切であるものとして、同様のことが、本発明を行う際使用されるベクター内に含まれる他の要素に対しても真実である。

10

#### 【0141】

転写末端要素は、典型的にFALPポリペプチド・コード配列の末端に対し配置され、そしてFALPポリペプチドの末端転写に使用する。通常原核細胞の転写末端要素が、G-Cの豊富な断片でありその後ポリT配列である。FALPをコードするポリヌクレオチドに対し3'の他の要素が、さらに所望によりベクターに含まれる。こうした要素に含まれるものが、mRNAを安定にし、又は転写を高めるものである。こうした要素が、ベクター部分として実験室により、又は商業的に購入されたものから容易にクローンされるが、さらにこれらは、上記のものなどの核酸合成するための方法を用いて容易に合成される。

#### 【0142】

選択可能なマーカー遺伝子が、選択性の培養培地に増殖された宿主細胞の生存及び増殖に典型的に必要であり、選択系のいずれかの数が、形質転換された細胞株を復帰させるために使用することができる。典型的な選択マーカー遺伝子が、抗生物質又はその他の毒素、たとえば、(a)原核生物宿主細胞に対してアンピシリン、テトラサイクリン、又はカナマイシンへの耐性を与え、(b)栄養素要求性に欠陥のある細胞を補足し；又は(c) 複合培地から利用出来ない必須栄養素の供給するタンパク質をコードする。従って適切な選択の問題(challenge)(たとえば、機能アンピシリン耐性な遺伝子を発現するベクターにより形質転換された宿主細胞の培地における、アンピシリンの存在)では、選択可能なマーカーにより形質転換物質を、検出することができ、汚染する微生物の増殖を防止することができる(たとえば、宿主細胞のサブセットが、形質転換反応に存在するが、そこに本明細書記載のベクターが、導入されなかった)。

20

30

#### 【0143】

原核生物系における好ましい選択性マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、及びテトラサイクリン耐性遺伝子である。真核生物系の好ましい選択可能なマーカーは、tk又はapr細胞のそれぞれに対しジヒドロ葉酸還元酵素、ヘルペス・シンプレックス・ウイルス・チミジンキナーゼ、及びアデニン・ホスホリボシル変換酵素遺伝子を含む。たとえば、Wiglerら、(1977)、Cell,vol.11:223-232;and Lowyら、(1980)、Cell 22:817-823を参照。さらに抗代謝、抗生物質、又は除草の耐性が、選択の基礎として使用することができる。たとえば、dhfrが、メトトレキサートへの耐性を与える；neoは、アミノグリコシド・ネオマイシン、及びG-418への耐性を与え；そしてals又はpatが、クロロスルフォロン、及びホスヒノトリシン・アセチル転換酵素それぞれへの耐性を与える。たとえば、Wiglerら、(1980)、Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,vol 77:3567-3570;Colbere-Garapin,ら(1981)、J.Mol.Biol.150:1-14を参照。さらに何らかの他の適切な選択可能な遺伝子を用いることもできる。

40

#### 【0144】

選択肢としての例において、選択可能なマーカーは、現象型特性、たとえば適切な基質、エネルギー源、及び他に必要な反応組成物の存在に所定の波長における蛍光するタンパク質の発現(使用されるマーカーにより変化する)を与える。選択可能なマーカーが、形質転換物質を同定するばかりか、特定のベクター系に帰属する一過性、又は安定なタンパク質の発現量の定量に使用される。たとえば、Rhodesら、(1995)、Rhodesら、(1995)、Methods Mol. Biol.vol 55:121-131を参照。

50

## 【0145】

マーカ遺伝子の発現の存在、又は非存在は、関連する遺伝子も存在することを示唆しているが、FALPコード遺伝子の存在及び発現を確認することが好ましい。コードされるFALPの何らかの帰属を直接に評価することに加え、さらに他の手法を使用することができる。たとえば、FALPをコードする配列が、マーカ遺伝子配列内に挿入される場合、FALPをコードするポリヌクレオチドを含む形質転換された細胞が、マーカ遺伝子機能の非存在により同定することができる。選択肢としてマーカ遺伝子が、単一プロモータの制御下、FALPをコードするポリヌクレオチドと連結して配置することができる。誘発又は選択に応答してマーカ遺伝子の発現が、通常同様のダンデム遺伝子の発現を指示している。

## 【0146】

さらにリボソーム結合部位要素が、含むことができる。普通Shine-Dalgarno配列(原核生物において)、又はKozak配列(真核生物において)と称される、この要素は、プロモータに対し3'、及び合成されるポリヌクレオチドのコード配列に対し5'に典型的に配置される。Shine-Dalgarno配列は、変化するが典型的なポリプリン(すなわち、高濃度にてA-Gを有す)である。いずれかのShine-Dalgarno配を使用することができ、そして必要であれば、容易に合成することができる。

## 【0147】

要素が、本明細書に開示され、またはそれ以外提供されるようなFALPの発現のため上記の、及び他の有益な要素が、当業者により周知で、そしてたとえばSambrookらに(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)); Ausubelら、eds. (Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press (1994)); and Berger and Kimmel (Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques, vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1987))に記載されている。

## 【0148】

FALPが分泌される本発明のこれらの例として、シグナル配列が、たとえば合成後特異的な小器官に、又は細胞の外に(たとえば、増殖培地又はペリプラズム空間内に)、ポリペプチド指令するためにしばしば存在する。典型的にシグナル配列が、コード領域方向のFALPコード領域に、又はその5'末端部に配置される。多くのシグナル配列が、知られており、そして選択される宿主細胞において機能するこれらの何れかを使用することができる。そのため、シグナル配列が、FALPをコードするポリヌクレオチドに相同性でよく又は異種性でも良く、そして使用される宿主細胞に対し相同性でよく又は異種性でも良い。さらに、シグナル配列は、所望であれば化学的に合成することができる。しかしながら、本明細書の目的として、好ましいシグナル配列が、FALPを発現するために使用されている宿主細胞において、天然に生ずる配列である。

## 【0149】

有意に高級な真核細胞に基づく発現系における多くの場合に、FALP遺伝子の転写が、ベクター上の1又は複数のイントロンの存在により増大することができる。特に導入遺伝子が、ゲノムDNA配列の全長又はその断片である場合、イントロンが、天然のFALPゲノム配列内に天然に生成することができる。イントロンが、FALP配列内(大部分のcDNAに対して)に天然に生成しない場合、イントロンを、別の資源から得ることができる。イントロンが、FALPをコードするポリヌクレオチドに、そして/又は宿主細胞に相同性でも、異種性でもよい。プロモータ及びFALPをコードするポリヌクレオチドに対するイントロンの位置が、重要であり、その理由は、イントロンは、有効であるように転写されなければならない。このようにFALPをコードするポリヌクレオチドが、cDNA配列である場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位に対し3'であり、そしてポリA転写末端配列に5'である。好ましくはcDNAに対し、イントロンが、FALPをコードするポリヌクレオチドを遮断されないようなFALPをコードするポリヌクレオチド配列の一方の側、又は別の側の(すなわち、5'又は3')に配置される。いずれかのウイルス、原核生物及び真核生物(植物又は動物)の生体が使用でき、それが、挿入される宿主細胞と適合できることをあたえる。さら

10

20

30

40

50

に本明細書にかんられることは、合成イントロンである。所望による2以上のイントロンを、ベクターに使用することができる。

#### 【0150】

本発明の別の例において、天然に、修飾された、又はFALPsをコードする組換え核酸分子が、適切な宿主系における融合タンパク質を翻訳する異種配列を生成するために、遺伝子操作することができる。たとえば、商業的に入手できる抗体により認識できる異種性成分を含むキメリックFALPタンパク質が、FALP活性の阻害剤としてペプチド・ライブラリーのスクリーニングを容易にすることができる。

#### 【0151】

さらに異種タンパク質及びペプチド成分が、商業的に入手できる親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を容易にできる。こうした成分が、グルタチオン S-転移酵素(GST)、マルトース結合タンパク質(MBP)、チオレドキシン(Trx)、カルモジュリン結合ペプチド(CBP)、6-His, FLAG, c-myc, 及びヘマグルチニン(HA)を含む。GST, MBP, Trx, CBP, 及び6-Hisが、固定化されたグルタチオン、マルトース、フェニールアラニン・オキサイド、カルモジュイリン、及び金属-キレート樹脂のそれぞれに同族の融合タンパク質の免疫親和性による精製を可能にする。FLAG, c-myc及びヘマグルチニン(HA)が、これらエピトープ・タグを特異的に認識する商業的に入手できるモノクローナル、及びポリクローナル抗体を使用して、融合タンパク質の免疫親和性による精製を可能にする。さらに融合タンパク質は、FALPを、精製した後の異種成分から切り離すことのできるよう、FALPをコードする配列と異種性タンパク質配列との間に配置されたプロテオリテック・切断部位を含むよう、さらに遺伝子操作することができる。融合タンパク質の発現、及び精製のための方法が、Ausubelらにより記載されている。

#### 【0152】

上記の1又は複数の要素が、使用されるベクター合(または、材料として、他の要素が、上に記載されていないが、技術的に知られ、そして特定ベクター内に含まれるよう所望される材料として)にまだ存在していない場、これらは、個々に得ることができ、そしてそのベクターに導入される。その要素のそれぞれを得るために使用される方法が、技術的に良く知られ、そして使用することができる。

#### 【0153】

最終ベクターが、商業的に入手できる開始ベクターから典型的に構成される。本発明を行うための好ましいベクターが、細菌、昆虫、及び哺乳動物の宿主細胞と適合できるベクターである。こうしたベクターには、とりわけpCRII, pCR3, 及びpcDNA3.1(Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII(Stratagene Company, La Jolla, Calif.), pET15b(Novagen, Madison, Wis.), PGEX(Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), pEGFP-N2(Clontech, Palo Alto, Calif.), pETL(BlueBacII; Invitrogen), and pFastBacDual(Gibco/BRL, Grand Island, N.Y.)を含む。そうしたベクターが、完全なベクターに含まれるべき特定要素を含んでも、含まなくとも良い。1又は複数の所望の要素が、開始ベクター中に存在しない場合、たとえば、挿入される要素の両端、及びベクターの両端が、結合のため適合できるように、適切な制限酵素エンドヌクレアーゼにてベクターを切断することにより、各要素が、個々に得ることができ、そしてそのベクターに挿入(単独、又は2以上の要素の場合をともに)される。幾つかの場合、ベクターを遺伝子操作をし(たとえば、部位指向の変異誘発により)、所望の要素を挿入するための適切な配列(たとえば制限酵素部位)を、又は満足な結合を得るために、互いに結合すべき「平滑」な両端を提供する。平滑にすることは、全てで4つのヌクレオチドの存在にKlenow DNAポリメラーゼ又はT4DNAポリメラーゼを用いて、「粘着末端」を最初満たすことにより一般的に行はれる(たとえば、Sambrookらを参照)。

#### 【0154】

FALPをコードするポリヌクレオチドを、種々の手順によるベクターに挿入することができる。一般的にポリヌクレオチドが、技術的に周知の方法によ適切な制限酵素エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。好ましくは、発現されるFALPをコードするポリヌクレオチドが、適切な調節要素と適切な相において、たとえば、プロモータ、翻訳開始及び末端配列



、及び他の配列たとえば、ペリプラスミックな空間又は細胞外媒体に、翻訳されたタンパク質の分泌を指令できるリーダ配列にて構成される。好ましい例において、FALPをコードするポリヌクレオチドが、挿入されるベクターは、適切な適切な配置及びリーディングフレーム核酸配列に常駐し、それがポリヌクレオチドをコードするFALPと融合される場合、所望の特徴付け、たとえば発現されたタンパク質産生物に、発現される組換え生成物を安定性、又は単純化した精製を与えるN-末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードする。

#### 【0155】

ベクターの構成において、FALPをコードするポリヌクレオチド(少なくとも2のFALPsのそれぞれの1又は複数のコピー)、そして/又は付随する作用する要素が、所定ベクターに挿入することができることを、さらに注意すべきである。こうした例における、宿主生体が、所望のFALP<sub>(s)</sub>のベクター当たりより大きな量を生成することができる。ベクターに挿入できるFALPをコードするポリヌクレオチドがの多くのコピーを、適切な宿主微生物にトランスフェクトされ、そして複製及び転写される、そのサイズにより得られたベクターの能力によってのみ限定される。

10

#### 【0156】

ベクターが構成され、そしてFALPをコードするポリヌクレオチドが、ベクターの適当な部位に、挿入された後、完成されたベクターが、増幅そして/又は発現のための適切な宿主細胞に挿入できる。ベクターを選択された宿主細胞内に形質転換すると、塩化カルシウムの沈殿、エレクトロポレーション、粒子の衝撃、微量注射、リポフェクション、などの方法、又はEDAE-デキストラン法などを用いて行うことができる。選択される方法が、ある程度使用される機能種の宿主細胞である。これらの方法及び他の適切な方法は、技術的によく知られ、たとえばSambrookらにおいて記載されている。

20

#### 【0157】

FALPをコードするポリヌクレオチドにて形質転換される宿主が、何か適切な媒体を使用して、細胞培養からタンパク質の発現及び回収するための適切な条件下にて、培養することができる、そしてそして多くの基準培体が技術的に良く知られている。その媒地は、宿主細胞の増殖及び生存のため必要な全ての滋養物を通常含んでいる。E.coli細胞を培養するための適切な培地は、たとえば、Luria Broth(LB)、及び/又はTerrificBroth(TB)である。真核細胞を培養するための適切な培地は、RPMI 1640, MEM, DMEMであり、その全ては、培養されている特定細胞株により必要とされる血清及び/又は増殖因子にて補充することができる。昆虫培養のための適切な培地は、必要として、イーストレイト、ラクトアルブミン水和物、そして/又は仔牛血清にて補給されるGrace'sの培地である。何かの事象において、宿主微生物が、所望遺伝子の発現のため、適切な条件下で培養される。これらの条件は、一般的に使用される宿主細胞として特異的であり、こうした生体のための増殖条件に関し刊行された文献、たとえば、BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 8<sup>th</sup> Ed., Williams & Wikins Company, Baltimore, Md.から照らして、当業者により容易に決定される。

30

#### 【0158】

本明細書に明示されるように、形質転換細胞の選択的増殖ため有益な抗生物質又は他の化合物が、培地への補給物としてののに付加することができる。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換プラスミドに存在する選択的マーカー要素により追跡される。たとえば、選択可能なマーカー要素が、カナマイシン耐性である場合、培養培地に加えられる化合物は、カナマイシンである。適切な条件下で培養される場合、宿主細胞が、培養培地から、(宿主細胞それを培養培地に分泌すれば)、又はそれを生成する宿主細胞から直接に(それが分泌されないなら)、後で収集することができるポリペプチドを合成することができる。上記のように、タンパク質が、細胞内に分泌されるか保持されるかどうか(たとえば、原核又は真核細胞膜を介してFALPの分泌を指令するシグナル配列を含むことにより)は、使用される発現ベクターに設計することもできる。収集の後FALPポリペプチドが、何か適切な方法、又はその方法を組み合わせて、たとえば分子ふるいクロマトグラフィー、親和性ク

40

50

ロマトグラフィーなどを使用して、精製することができる。

#### 【0159】

一般的に、FALPをコードし、FALPを発現する核酸分子を含む宿主細胞が、当業者に周知な種々の方法により同定することができる。これらの方法は、核酸又はタンパクシツの検出及び/又は定量化するための膜、溶液、又はチップを基礎とする技術を含む、DNA-DNA又はDNA-RNAのハイブリット化、PCRの増幅、及びタンパク質バイオアッセイ又は免疫アッセイ技術を含むがそれに限定されない。

#### 【0160】

さらに、宿主細胞又は細胞-フリーの発現系において生成されるFALPポリペプチドの量が、基準方法を用いて評価することができる。こうした方法は、ウェスタン・ブロット分析、SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、HPLC分離、免疫沈降、マス・スペクトロメータ、アミノ酸分析、配列決定及び/又は活性化法を含む。

#### 【0161】

本発明により有益なポリペプチドは、単離された形状にて提供されるのは好ましく、そして好ましくは実質的に精製されることである。FALPポリペプチドが、宿主細胞から分泌されるよう設計されていた場合、大部分のポリペプチドが細胞培養培地において同様に見出される。この方法で調製されたポリペプチドが、典型的にアミノ末端にメチオニンを有していない、それは、細胞から分泌中に取り出されるたねである。しかしながら、FALPのポリペプチドが、宿主細胞から分泌されない場合、サイトプラズム、及び/又は核(真核細胞、細菌(特にグラム陽性菌)、及び昆虫宿主細胞)、又はペリプラズム(グラム陰性菌が宿主細胞として使用される場合に生ずるような)において存在し、そしてアミノ末端メチオニンを有することができる。

#### 【0162】

細胞内FALPに対して、宿主細胞が、最初に機構的に、浸透的に、又は緩衝溶液中でサイトプラズム内容物を放出するため洗剤により分離される。次にFALPポリペプチドを、種々の技術を用いて行なうことができる。たとえば、それが、カルボキシル、又は網に末端のいずれかでポリペプチドが、ヘキサヒスチジン又は他の小タグペプチド(たとえば、FLAG(Eastman Kodak Co., New Haven, Conn)又はmyc(Invitrogen, Carlsbad, Calif.))などのタグを含むように、ポリペプチドが合成されたならば、カラム基質が、タグに対し、又はポリペプチドに対し直接(たとえば、FALPを特異的に認識するモノクローナル抗体)に高い親和性有する場合、親和性カラムを通して溶液を通過させることによる、1段階手順で特に精製される。たとえば、ポリヒスチジンが、大きな親和性にて結合し、そしてニッケルに特異性を有し、従ってニッケルの親和性カラム(Qiagenニッケル・カラム)が、ポリヒスチジン・タグを含むFALPの精製に対し使用することができる。たとえば、Ausubeleads.を参照。

#### 【0163】

さらに抗体を、FALPを純化するために使用できる。FALPに対する抗体が、適切な方法を用いて生成することができる。抗体を製造するため、ヤキ、ウサギ、ラット、マウス、ヒトなどを含む種々の宿主が、FALPにより、又は免疫原特性を有する断片、又はそのオリゴペプチドにて注入することに免疫化することができた。宿主の種に依存して、種々のアジュバント(たとえば、Freund's アジュバント、ミネラル・ゲル(たとえば、水酸化アルミニウム)、及びリゾレシチン、プルオニック・ポリオルス、ポリアニオン、ペプチド、油性乳化物、及びジニトロフェノールなどの表面活性剤)が、免疫的な応答を増大させるために使用することができる。さらに、免疫原は、免疫化する前に担体に(たとえば、孔牛血清アルブミン、チログロブリン、及びキーホール・リンペット・ヘモシアニン)に結合できる。

#### 【0164】

FALPsを結合する抗体が、無傷のポリペプチド又は免疫抗原として関連する小ペプチドを含む断片を用いて調製することができる。FALP誘導のオリゴペプチド、ペプチド、又はFALP特異的抗体を誘発するために使用される断片が、好ましくは少なくとも約5アミノ産

残基、より好ましくは少なくとも約10アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を有し、さらにより好ましくは、天然タンパク質のアミノ酸配列の1部で、それがFALP活性を呈する。動物を免疫化するために(たとえば、マウス、ラット又はウサギ)使用されるポリペプチド又はオリゴペプチドが、RNAの翻訳から、又は化学的に合成され、そして所望されれば、担体のタンパク質に結合することができる。

#### 【0165】

FALPポリペプチドが、タグを有せず、そして抗体が利用できない場、精製するための他の知られた方法を使用できる。こうした方法は、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、HPLC、ゲル溶離と組み合わせた天然のゲル電気泳動、及び調製等電フォーカシングを含む。ある例において、これらの2以上の技術を組み合わせて、精製レベルを増大させて行なうことができた。ポリヒスチジンにてタグされたFALPsを、単離し、そして純粋にする特に好ましい方法は、ニッケル・カラムを使用する親和性クロマトグラフィーである。

10

#### 【0166】

FALPポリペプチドが、真核細胞の細菌又はサイトプラズムのペリプラスム空間に主に見出されると、予測される場合、処理されたポリペプチドが、こうした複合体を形成した場合、含有生体(細菌)を含むペリプラスム又はサイトプラズムの内容物を、いずれかの適切な技術を使用して抽出することができる。たとえば、宿主細胞が、French press、均質化、及び/又は超音波によりペリプラスムの内容物を放出するように溶離される。次ぎに均質化には、遠心分離にかけられる。

20

#### 【0167】

FALPポリペプチドが、サイトゾル又はペリプラスムに含有する生体を形性した場合、含有生体が、しばしば細胞膜の内側、及び/又は外側に結合することができ、したがって遠心分離後ペレット材料に主にみいだされることになる。次ぎにペレット材料が、封入体を放出、破壊、及び溶解するためアルカリpHでジチオセリオール、又は酸pHでtris カルボキシエチル・ホスフィンなどの還元剤の存在下、洗剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、尿素誘導体などのpH extremes又はカオトロピック剤で処理することができた。次ぎに現在の可溶性形状におけるFALPポリペプチドが、たとえば、ゲル電気泳動、免疫沈降などを用いて分析することができ、又はスクリーニング・アッセイに使用することができる。それが、FALPポリペプチドを単離するために所望される場合、単離は、標準方法を用いて行なうことができる。

30

#### 【0168】

幾つかの場合、FALPポリペプチドが、単離により生物活性と成らない。ポリペプチドを天然の3次構造に「再畳み込み」又は変換するための種々の方法を用いて、生物活性を付与する。こうした方法は、通常7以上のpHで、そしてカオトロップの特定濃度の存在下、溶解されるポリペプチドを暴露することを含む。カオトロップの選択は、封入体の溶解化のために用いられる選択と非常に類似するが、通常は低濃度で、溶解化のために使用されるものと同じカオトロップにする必要はない。さらにほとんどの場合、再折り畳み/酸化溶液が、還元剤又は還元剤プラス酸化形状を特定割合にて含み、タンパク質システイン・ブリッジの形状を生成するよう、ジスルフィドによるシャフリング(shuffling)を可能にする特定の酸化還元力を生成する。共通に使用されるレドックス結合体の幾つかは、システイン/シストアミン、グルタチオン(GSH)/ジチオビスGSH、cupricクロライド、ジチオセリオール(DTT)/ジチアンDTT、2-メルカプトエタノール(bME)/ジチオ-b(ME)を含む。幾つかの例において、共溶媒が、再折り畳みの効率を増大させるために必要である。この目的に使用される共通の試薬が、グリセロール、種々の分子量のポリエチレン・グリコール、及びグアニジンを含む。再折り畳みの後、FALPポリペプチドが可溶性になる。次ぎに、たとえば、ゲル電気泳動、免疫沈降などを用いて分析され、又はスクリーニングアッセイに使用することができる。再度FALPポリペプチドを単離するため、所望であれば、再折り畳みタンパク質の単離が、標準の方法を用いて行なうことができる。

40

#### 【0169】

50

FALPを含む封入体が、宿主細胞のサイトゾル又はペリプラズムの有意な程度に形成されない場合、ポリペプチドは、細胞均質の遠心分離の後、上澄液に主に見出され、そしてFALPポリペプチドが、いずれかの適切な方法、又は方法を組み合わせて上澄物から単離することができる。たとえばこれらの状況において、FALPポリペプチドを1部又は完全に単離することが好ましい場合、精製を標準的な方法にて行なうことができ、たとえば、電気泳動の後、電気溶離、種々のクロマトグラフィー(免疫親和性、分子シーブ、及び/又はイオン交換)、及び/又は高圧液化クロマトグラフィーにより分離する。

#### 【0170】

これらの状態において、FALPポリペプチドを1部又は完全に単離することが、好ましい場合、精製が、技術的に周知の標準的方法を用いて行なうことができる。こうした方法が、電気溶離、種々のクロマトグラフィー(免疫親和性、分子ふるい、及び/又はイオン交換)及び/又は高圧液化クロマトグラフィーによる分離を含む。幾つかの例において、高レベルの精製を行なうための2以上の方法を用いることが好ましい。別の方法は、所望の純度に達成するように、疎水性相互作用、HPLC又は親和性クロマトグラフィーを含むがそれ限定されない。1の実施例において、FALPポリペプチドが、免疫親和性クロマトグラフィーを用いて純化される。たとえば、FALPポリペプチド、又はその免疫原断片に対して上昇した抗体(たとえば、ある配列を有するか又は後で本明細書にて開示)が、適切な固体支持体に結合、そして抗体とこのポリペプチドを会合して行なう条件下で、FALPポリペプチドを含むポリペプチドの混合物と接触(たとえば、脳組織を均一化)させる。いったんFALPポリペプチドが、固定化された抗体と結合されると、固体支持体を洗浄し、比結合物質、及び/又は非特異的に結合されたポリペプチドを除去する。次ぎに所望のポリペプチドを、たとえば緩衝液のpH又は塩濃度の変化により、固体支持体から実質的に純粋な形状に分離する。

#### 【0171】

当業者が理解できるように、シグナル・ペプチド、タグなどが、発現の後に異種FALPから切断することができる。こうした切断が、組み換え型宿主細胞に発生し、もし必要であれば、細胞機構(たとえば、特定のシグナルペプチドを切断するためのペプチド)を呈示する。選択肢として、こうした配列が、後期段階の単離及び精製過程で切断することができる。

#### 【0172】

組み換え技術を用いて、FALPのポリペプチドを調製及び精製に加え、FALPポリペプチド、断片、及び/又はその誘導体が、Merrifieldら、(J. Am. Chem. Soc., vol. 85:2149(1963)) Houghtenら、(Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, vol. 82:5132(1985)), and Stewart and Young(Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, III(1984))のより記載の周知の技術を用い、化学的な合成法(固相ポリペプチド合成など)により調製することができる。こうしたポリペプチドが、アミノ末端にメチオニンを有する場合、有しない場合で合成することができる。自動による合成が、いずれか適切な機構、たとえば、ABI 431Aペプチド合成装置(PerkinElmer)を用いて行なうことができる。化学的に合成されたFALPポリペプチド又は断片が、ジスルフィド・ブリッジを形成するためにこれらの引用において記載の方法を使用して、酸化することができる。FALPポリペプチド又は断片が、組み換え型に生成された又は天然の資源から精製されたFALPポリペプチドに比較可能な生物活性を有すると予測され、従って組み換え型又は天然のFALPポリペプチドと相互交換して使用することができる。

#### 【0173】

さらに本発明は、FALPポリヌクレオチドに標的、又はハイブリットする抗センス、トリプレックス、リボザイム、及び試薬などポリヌクレオチドへの阻害性を提供する。従って別の観点において、本発明は、FALP遺伝子の発現を阻害するために使用できる抗センスオリゴヌクレオチド、及びポリヌクレオチドを提供する。とりわけ追加してさらに詳細に記載された、本発明の幾つかの治療方法が、in vivoにおける生理的条件下でのFALP活性を阻害し又は刺激するよう機能するオリゴヌクレオチドの投与に関与し、そして治療効果と

して十分な時間間隔にて、これらの条件下比較的安定である。ポリヌクレオチドが、こうした安定性を損なう、そして所望の組織、器官又は細胞にオリゴヌクレオチドの誘導をターゲットングを容易にするために修飾することができる。

#### 【0174】

本発明の抗センスポリヌクレオチドは、一般的に少なくとも約10塩基、典型的に少なくとも12又は14の抗センス配列、そしてFALPをコードするmRNA、又はFALP遺伝子から転写されるmRNAからの配列に特定にハイブリットする最大約3000の連続したヌクレオチドを含む。本発明の抗センスポリヌクレオチドは、より頻繁には長さが約12から約50のヌクレオチド配列、又は長さが約15から約25のヌクレオチドである。一般的に抗センスポリヌクレオチドが、安定な二重鎖を形成するに十分な長さにすべきであるが、所望されれば、*in vivo* 10において投与するにため、導入形態に依存し十分短くとも良い。ポリヌクレオチドの最小長さでは、幾つかの因子による標的配列に特異的なハイブリットが必要であり、例えば幾つかの因子は、G/Cのコンテンツ、(もしできれば)照合ミスの塩基対に位置付け、標的ポリヌクレオチドの集団と他の因子中ポリヌクレオチドの化学的性質、(たとえば、メチルホスホネイト骨格、ペプチド核酸、ホスホロチオエイト)とを比較して配列の固有度などである。

#### 【0175】

一般的に、特異的ハイブリット化を確実にするため、抗センス配列が、標的FALPmRNA配列に実質的に相補的である。特定の明示において、抗センス配列が、標的FALPmRNA配列に正確に相補的である。しかしながら、FALP RNA又はその遺伝子相当する関係する標的配列 20への特異的結合が、ポリヌクレオチドの機能的特長として保持されるかぎり、抗センスポリヌクレオチドが、ヌクレオチド置換、付加、欠失、転移、転写又は修飾、又は他の核酸配列、又は非核酸成分を含むことができる。

#### 【0176】

別の観点において、抗センス配列がFALP mRNAの比較的アクセッ可能な配列(比較的に2時構造のない)に相補てきである。これは、たとえばMFOLDプログラム(Genetics Computer Group, Madison WI)を用い所定のRNA二次を分析し、*in vitro* 又は技術的に周知の*in vivo* 30において試験することにより決定することができる。有効な抗センス組成物を同定するための別の有益な方法が、オリゴヌクレオチドの組み合わせ配列を使用する(たとえば、Millerら、Nature Biotechnology 15:537(1997)を参照)。

#### 【0177】

さらに本発明は、抗センス配列に付加する配列を有する抗センスポリヌクレオチド(すなわち抗-FALP-センス配列に付加)を提供する。この場合、抗センス配列が、有意に長い配列のポリヌクレオチドの中で含まれている。他の例において、ポリヌクレオチドの配列が、抗センス配列から成るか、又は抗センス配列である。

#### 【0178】

抗センス核酸(DNA, RNA, 修飾された、類似したなど)が、本明細書に開示されたように、化学的合成及び組替え方法などの核酸を製造するためのなんらかの適切な方法を使用して作成することができる。一つ例において、たとえば、本発明の抗センスRNA分子が、*de novo* 40化学的合成により、又はクローニングにより調製することができる。たとえば、FALP mRNAにハイブリットする抗センスRNAが、ベクター(たとえば、プラスミド)中のプロモータに逆配置に作用的に結合されるFALP DNAを挿入することにより(結紮する)作成することができる。プロモータ、及び好ましくは末端及びポリアデニール化シグナルが、正しく配置された場合、非コドン鎖に対応している挿入配列の鎖が、本発明の抗センスオリゴヌクレオチドとして転写され、そして作用される。本発明の抗センスオリゴヌクレオチドが、哺乳動物及びヒトを含む細胞のない抽出物、細胞、及び動物にFALP活性を阻害するために使用することができる。

#### 【0179】

抗センスポリヌクレオチドに対する一般的な方法に関して、ANTISENSE RNA AND DNA, D. A. Melton, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY(1988)を参照。さ 50

らに、Dagleら、Nucleic Acids Research, 19:1805(1991)を参照。

#### 【0180】

さらに本発明は、トリプル・ヘリックスを含む、又は「トリプレックス」核酸を形成する、2本鎖又は2重FALP核酸(たとえば、FALP RNA又はFALP遺伝子の折りたたまれた領域において)に結合するオリゴヌクレオチド、及びポリヌクレオチド(たとえば、DNA, RNA, PNAなど)を提供する。トリプル・ヘリックスの形状により、たとえばFALP遺伝子の転写を防止し、従って細胞のFALP活性を減少し又は除去することにより、FALPの発現を阻害することになる。何か特定の機構により結合されると考えることなく、トリプル・ヘリックス対が、生成するためのポリメラーゼ、転写因子、又は調節分子を結合するため2重ヘリックスを十分開く能力を折衷すると考えられる。

10

#### 【0181】

本発明の三重オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドは、三重ヘリックス形成の塩基-対合規則(例えば、Cheng など., J. Biol. Chem. 263: 15110 (1988); Ferrin and Camerini-Otero, Science 354: 1494 (1991); Ramdas など., J. Biol. Chem. 264: 17395 (1989); Strobel など., Science 254: 1639 (1991); and Rigas など., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83: 9591 (1986)を参照のこと)、及びFALP mRNA及び/又は遺伝子配列を用いて構成される。典型的には、本発明の三重形成オリゴヌクレオチドは、FALP RNA又は遺伝子における特定配列に対して“相補的”な、約10~約25個のヌクレオチド、又はそれ以上のヌクレオチドの特定配列(すなわち、安定した三重ヘリックスを形成するのに十分に大きい、しかし所望には、供給のモードに依存して、インビボで投与するのに十分に小さい)を含んで成る。この場合、“相補的”とは、安定した三重ヘリックスを形成できることを意味する。1つの態様においては、オリゴヌクレオチドは、FALP遺伝子の調節領域(例えば、FALP 5'-フランキング配列、プロモーター及びエンハンサー)又は転写開始部位(例えば、転写開始部位から-10~+10の間)に対して特異的に結合するよう企画される。三重DNAを用いての最近の治療進行の再考に関しては、Gee など., in Huber and Carr, 1994, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co, Mt Kisco NY 及び Rininsland など., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5854を参照のこと。

20

#### 【0182】

本発明はまた、FALP活性の阻害のために有用なリボザイムも提供する。本発明のリボザイムは、結合し、そして特異的に分解し、そしてFALP mRNAを不活性化する。有用なリボザイムは、FALP mRNAに対して相補的な5'-及び3'-末端配列を含んで成り、そして本発明に開示されるFALP mRNA配列に基づいて当業者により構築され得る(PCT公開W093/23572号を参照のこと)。本発明のリボザイムは、グループIイントロンリボザイム(Cech, Biotechnology 13: 323 (1995))及び他のハンマーヘッドリボザイム(Edgington, biotechnology 10:256 (1992))の特徴を有するそれらを包含する。

30

#### 【0183】

本発明のリボザイムは、分解部位、例えばGUA, GUU及びGUCを有するそれらを包含する。本発明に従ってのFALP活性のリボザイム介在性阻害のための他の最適な分解部位は、PCT公開W094/02595号及びW093/23569号(両者とも引用により本明細書に組込まれる)に記載されるそれらを包含する。分解部位を含む標的FALP遺伝子の領域に対応する15~20の長さのヌクレオチドの短いRNAオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドをより所望にすることができる二次構造特徴について評価され得る。分解部位の適合性はまた、リボヌクレオチド保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションへの接近性を試験することにより、又は当業界において知られている標準の方法に従ってインビトロリボザイム活性について試験することにより評価され得る。

40

#### 【0184】

Huなど., PCT公開W094/03596号により記載されるように、アンチセンス及びリボザイム機能は、単一オリゴヌクレオチドにおいて組み合わせられ得る。さらに、リボザイムは、本発明の例示的アンチセンスオリゴヌクレオチドの記載に関して上記に記載されるように、

50

1 又は複数の修飾されたヌクレオチド又はヌクレオチド間の修飾された結合を含んで成る。

【0185】

1つの態様においては、本発明のリボザイムは、インビトロで生成され、そして細胞又は患者中に挿入される。もう1つの態様においては、遺伝子療法は、標的細胞においてエクスピボ又はインスピボでリボザイムの発現のために使用される。

【0186】

本発明はまた、同時制御及び抑圧を包含することができる、RNA干渉 (RNAi) の方法により FALP 活性の阻害のために有用なポリヌクレオチドを提供する。この技法の再考は、Science 288: 1370-1372 (2000) に見出される。RNAi は後転写レベルに対して作用し、そして配列特異的である。この方法は、部分的な又は十分な二本鎖特徴を有する RNA、又はそのような RNA をコードすることができる前駆体の細胞又は細胞外環境への導入を含んで成る。 10

【0187】

Fire など., アメリカ特許第 6,506,559 号により記載されるように、RNA は、1 又は複数の重合されたりボヌクレオチドの鎖を含んで成ることができる。二本鎖構造は、単一の自己-相補的 RNA 鎖又は 2 つの相補的 RNA 鎖により形成され得る。RNA は、リン酸-糖バックボーン又はヌクレオシドのいずれかへの修飾を包含することができる。RNA 重複形成は、細胞内又は細胞外のいずれかで開始され得る。

【0188】

研究は、1 又は複数のリボヌクレオチドが特異的に二本鎖 RNA に結合し、そしてそれを短いフラグメントに分解することを示している。リボヌクレアーゼは、それらのフラグメントと結合したまま存続し、これは、相補的 mRNA に特異的に結合し、すなわち FALP 遺伝子のための転写された mRNA 鎖に特異的に結合する。FALP 遺伝子のための mRNA はまた、リボヌクレアーゼにより短いフラグメントに分解され、それにより FALP 遺伝子の翻訳及び発現を回避し、そしてその結果、FALP 活性を阻害する。さらに、RNA ポリメラーゼは、システムの効率を指数的に高める、短いフラグメントの多くのコピーの合成を促進するよう作用することができる。この遺伝子抑制経路のユニーク特徴は、サイレンシングがそれが開始される細胞に制限されないことである。遺伝子-サイレンシング効果は、生物の他の部分に高められ得、そしてさらに、生殖系を通していくつかの世代に伝達され得る。 20 30

【0189】

特に、本発明のポリヌクレオチドは、サイレンシング遺伝子のための遺伝子構造体を生成するために有用である。本発明のポリヌクレオチドは、FALP 遺伝子に対して特異的な単一の自己-相補的 RNA 配列をコードする遺伝子構造体を生成するために使用され得る。遺伝子構造体及び/又は FALP-特異的自己-相補的 RNA 配列は、当業界において知られているいずれかの従来の方法により供給され得る。遺伝子構造体内に、センス及びアンチセンス配列は、ドナー及び受容体スプライシング部位を用いて、正しいスプライシング配向で配置されるイントロン配列を端に有する。他の方法は、操作でき且つ効果的な構造体を創造するために、分離したイントロン配列よりもむしろ種々の長さのスペーサー配列を用いることができる。FALP 遺伝子構造体生成物の後-転写プロセッシングの間、イントロン配列はスプライシングされ、センス及びアンチセンス配列、及びスプライス結合配列の結合を可能にされ、二本鎖 RNA が形成される。選択のリボヌクレアーゼの二本鎖 RNA に結合し、そしてそれを分解し、それにより、FALP mRNA 遺伝子配列及びサイレンシング FALP 遺伝子の分解を導く現象のカスケードを開始する。 40

【0190】

他方では、自己-相補的 RNA 配列を発現するための遺伝子構造体を用いるよりもむしろ、FALP-特異的二本鎖 RNA セグメントが、遺伝子サイレンシング効果を発揮するために細胞の細胞質中に取り込まれるよう 1 又は複数の標的化された領域に供給される。RNA は、細胞当たり少なくとも 1 つのコピーの供給を可能にする量で導入され得る。より高い用量の二本鎖材料が、より効果的な阻害をもたらすことができる。阻害は、RNA の二重領域に 50

対応するヌクレオチド配列が遺伝子阻害のために標的化されることにおいて、配列一特異的である。FALP遺伝子の一部と同一のヌクレオチド配列を含むRNAが、阻害のために好ましい。標的配列に関して、挿入、欠失及び単一の点突然変異を有するRNA配列はまた、阻害のために効果的であろうことが見出された。従って、配列同一性は、当業界において知られている一列整列アルゴリズム及び、ヌクレオチド配列間の%差異の計算により最適化され得る。他方では、RNAの二重領域は、標的遺伝子転写体の一部とハイブリダイズできるヌクレオチド配列として機能的に定義され得る。

#### 【0191】

本発明の治療方法は、インビボ生理的条件下でFALP活性を阻害するか又は刺激するよう機能し、そして治療効果のために十分な時間、それらの条件下で比較的安定するオリゴヌクレオチドの投与を包含する。本明細書に示されるように、修飾された核酸は、そのような安定性を付与することにおいて、及び所望する組織、器官又は細胞へのオリゴヌクレオチドの標的化供給のために有用であり得る。オリゴー及びポリヌクレオチドは、適切な医薬製剤において薬物として直接的に、又は細胞、例えばリポソーム、免疫リポソーム、衝撃物、細胞中への直接的な摂取物、及び本明細書に記載されるような同様のもの中への核酸の導入により直接的に供給され得る。疾病の処理に関しては、本発明のオリゴヌクレオチドは、治療的有效量で患者に投与されるであろう。治療的有效量は、疾病の徴候を緩和するか、又は標的細胞におけるFALP活性を調節するのに十分な量である。治療目的のためのオリゴヌクレオチドの供給のために有用な方法は、アメリカ特許第5,272,065号に記載されている。医薬的活性化化合物の投与の他の詳細は、本明細書に提供される。もう1つの態様においては、オリゴー及びポリヌクレオチドは、本発明の遺伝子療法及び組換えDNA発現プラスミドを用いて供給され得る。

#### 【0192】

遺伝子療法は、外因性ポリヌクレオチドが移行される（典型的には）哺乳類細胞に対して医学的に有用な表現型効果的を生成するその外因性ポリヌクレオチドの導入を言及する。1つの観点においては、本発明は、FALP関連状態の処理のために遺伝子療法及び組成物を提供する。例においては、遺伝子療法は、FALP遺伝子生成物（例えば、FALP活性を高めるために、本明細書に開示される配列を有するFALPポリペプチド、又は活性を低めるための阻害FALPポリペプチドに実質的に類似するFALPタンパク質）を発現し、FALP遺伝子又はmRNA配列（例えば、FALP活性を低めるためのアンチセンスRNA）を有する核酸を発現し、FALP遺伝子生成物（例えば、PALP活性を低めるためにFALP mRNAに向けられたリボザイム）の発現に影響を及ぼすポリペプチド又はポリヌクレオチドを発現するか、又は内因性FALP配列（例えば、それぞれ遺伝子置換及び遺伝子ノックアウト）を置換するか又は破壊するベクターを、細胞中に導入することを包含する。多くの他の態様は、本明細書における開示の再考に基づいて当業者に明らかであろう。

#### 【0193】

FALP遺伝子療法において有用なベクターは、ウィルス又は非ウィルスであり得、そして本発明のFALP発現システムに関して、本明細書に記載されるそれらを包含する。遺伝子療法ベクターがこの開示及び他のものに記載されるように、プロモーター及び調節又はプロセッシング配列を含んで成ることは、当業者により理解されるであろう。通常、ベクターは、オリゴヌクレオチドの転写を駆動するよう作用する、プロモーター及び任意には、エンハンサー（プロモーター配列内に含まれるいずれのものとは異なる）、並びにエピソーム維持又は染色体組込み、及び所望には、高レベルの転写を提供する他の調節要素を含んで成る。遺伝子療法のために有用なプラスミドは、他の機能的要素、例えば選択マーカー、同定領域及び他の配列を含むことができる。追加の配列が、細胞の外部及び内部の安定性の付与、特定器官、組織又は細胞集団へのFALPヌクレオチド配列（センス又はアンチセンス）の供給の標的化、細胞中への侵入の介在、細胞の核中への侵入の介在、及び/又は核DNA内への組込みの介在において役割を有することができる。例えば、アプタマー（aptamer）様DNA構造体、又は他のタンパク質結合分子部位は、細胞表面受容体への、又は受容体に結合し、それにより細胞中へのDNAトランスファーの効率を高める血清タンパク質



へのベクターの結合を介在するために使用され得る。他のDNA部位及び構造体は、核膜における受容体に、又は核中に進行する他のタンパク質に直接的に又は間接的に結合し、それにより、ベクターの核摂取を促進する。他のDNA配列は、組込みの効率に、直接的に又は間接的に影響を及ぼすことができる。

#### 【0194】

適切な遺伝子療法ベクターは、複製の起点を有しても又は有さなくても良い。例えば、患者への投与の前、ベクターの増幅のためにベクターに複製の起点を含むことが有用である。しかしながら、複製の起点はしばしば、ベクターが宿主染色体DNA中に組込むか、又は宿主mRNA又はDNAに結合するよう企画される場合、除去され得る。

#### 【0195】

示されるように、本発明はまた、遺伝子置換療法（すなわち、組換え遺伝子による内因性FALP遺伝子の相同組換えによる置換）のための方法及び試薬を提供する。相同組換えによる組換えのために特異的に企画されるベクターが使用され得る。相同組換えを最適化するための重要な因子は、染色体配列に対する配列同一性の程度及び相同性の長さを包含する。特定の配列介在性相同組換えはまた、組込みが転写活性のDNAにおいてより容易に生じるので、重要である。相同標的化構造体を構成するための方法及び材料は、例えばMansour nado., 1988, Nature 336: 348; Bradley nado., Bio/Tech77ology 10: 534 (1992)により記載されている。また、アメリカ特許第5,627,059号；第5,487,992号；第5,631,153号；及び第5,464,764号を参照のこと。1つの観点においては、遺伝子置換治療は、調節されるべきFALP遺伝子の発現を制御する調節配列のすべては又一部の変更又は置換を包含する。例えば、FALPプロモーター配列（図5）が、破壊され（FALP発現を低めるために、又は転写制御部位を破壊するために）、又は外因性プロモーターが置換される（例えば、FALP発現を高めるために）。

10

20

30

#### 【0196】

本発明はまた、FALP“遺伝子ノックアウト”（すなわち、組換え生成されるベクターを用いての内因性FALP遺伝子の相同組換えによる欠失又は破壊）のための方法及び試薬も提供する。遺伝子ノックアウトにおいては、標的化された配列は、調節配列（例えば、FALPプロモーター）、又はRNA又はタンパク質コード配列であり得る。内因性遺伝子を発現するためへの相同組換えの使用は、アメリカ特許第5,272,071号，W0 91/09955号，W0 93/09222号，W0 96/29411号，W0 95/31560号，及び W0 91/12650号に、詳細に記載される。また、Moynahan など., 1996, Hum. Mol. Genet. 5: 875を参照のこと。

#### 【0197】

遺伝子治療ベクターは、インビボ、インビトロ又はエクスビボで細胞又は組織中に導入され得る。エクスビボ療法に関しては、ベクターは、患者から採取られた細胞、例えば幹細胞中に導入され、そして自己由来の移植体についてクローン的に増殖され、同じ患者に戻される（例えば、アメリカ特許第5,399,493号及び第5,437,994号を参照のこと）。

#### 【0198】

本発明はまた、コード配列又は調節（例えば、プロモーター）配列であり得る。外因性FALP遺伝子配列を含んで成るトランスジェニック非ヒト多細胞生物（例えば、植物及び非ヒト動物）又は単細胞生物（例えば、酵母）を提供する。多細胞生物の例は、植物、昆虫及び非ヒト動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、モンキー、サル、ブタ及び他の非ヒト哺乳類を包含する。単細胞生物の例は、酵母である。1つの例においては、生物は、ヒトFALPタンパク質の配列を有する外因性FALPポリペプチドを発現する。

40

#### 【0199】

本発明はまた、FALPをコードする遺伝子が突然変異誘発されるか又は欠失され（すなわち、コード又は調節領域における）、その結果、生来のFALPが発現されず、又は野生型細胞又は生物に比較される場合、低められたレベルで又は異なった活性を用いて発現される、単細胞及び多細胞生物（又はそれらからの細胞）も提供する。そのような細胞及び生物はしばしば、“遺伝子ノックアウト”細胞又は生物として言及される。

#### 【0200】

50

本発明はさらに、内因性FALP遺伝子が存在するか又は任意には、突然変異誘発されるか又は欠失され、そして外因性FALP遺伝子又は変異体（例えば、ヒトFALP）が導入され、そして発現される細胞及び生物を提供する。このタイプの細胞及び生物は、例えばFALP活性又は発現のモジュレーターを同定し；FALP遺伝子における突然変異の効果を決定するためのモデルシステムとして有用であろう。

#### 【0201】

特定遺伝子（例えば、内因性FALP遺伝子）の変更又は破壊のための方法は、当業者に良く知られており、例えばBaudin など., Nucl. Acids Res. 21: 3329 (1993); Wach など., Yeast 10: 1793 (1994); Rothstein, Methods Enzymol. 194: 281 (1991); Anderson, Methods Cell Biol. 48: 31 (1995); Pettitt など., Development 122: 4149-4157 (1996); Ramirez-Solis など., Methods Enzymol. 225: 855 (1993); 及びThomas など., Cell 51: 503 (1987)を参照のこと。典型的には、そのような方法は、調節されるべき特定遺伝子の発現を制御する調節配列のすべて又は一部の変更又は置換を包含する。調節配列、例えば生来のプロモーターが変更され得る。遺伝子の標的化された突然変異誘発のための1つの従来の技法は、興味ある遺伝子を含むゲノムDNAフラグメントのベクター中への配置、チミジンキナーゼを含むベクターにおける選択可能ネオマイシン耐性カセット周囲の標的化された遺伝子に関連する2種のゲノムアームの続くクローニングを包含する。次に、この“ノックアウト”構造体は、適切な宿主細胞、すなわちマウス胚幹（ES）細胞中にトランスフェクトされ、続いてこれは、正の選択（例えば、ネオマイシン耐性を選択するために、G418を用いて）、及び負の選択（例えば、チミジンキナーゼを欠く細胞を排除するために、FIAUを用いて）にゆだねられ、ノックアウトベクターによる相同組換えを受けた細胞の選択が可能にされる。このアプローチは、興味ある遺伝子の不活性化を導く。例えば、アメリカ特許第5,464,764号；第5,631,153号；第5,487,992号；及び第5,627,059号を参照のこと。内因性遺伝子の“ノックアウト”発現はまた、興味ある遺伝子の調節配列（例えば、プロモーター）中に異種核酸を導入するために相同組換えの使用により達成され得る。機能的酵素又は生成物の発現を妨げるためには、読み取り枠を変更するか、又はプロモーターを破壊する単純な突然変異誘発が適切である。発現をアップレギュレーションするためには、生来のプロモーターが、高いレベルの転写を誘発する異種プロモーターにより置換され得る。また、“遺伝子トラップ挿入”が、宿主遺伝子を破壊するために使用され得、そしてマウスES細胞が、Holzschu (1997) Transgenic Res 6: 97-106に記載されるように、ノックアウトトランスジェニック動物を生成するために使用され得る。他の方法も当業界において知られている。

#### 【0202】

相同組換えによる内因性遺伝子の発現の変更はまた、問題の構造遺伝子を含んで成る核酸配列を用いることにより達成され得る。上流配列は、異種組換え構造体を標的化するために使用される。FALP構造遺伝子配列情報、例えば配列番号1を用いて、当業者は、通常の実験のみにより、相同組換え構造体を創造することができる。内因性遺伝子の発現を変更するための相同組換えは、アメリカ特許第5,272,071号、及びW0 91/09955号、W0 93/09222号、W0 96/29411号、W0 95/31560, and W0 91/12650.に記載されている。動物における相同組換えは、Moynahan (1996) Hum. Mol. Genet. 5: 875, and in plants by Offringa (1990) EMBO J. 9: 3077により記載されている。

#### 【0203】

示されるように、本発明はまた、単離された、実質的に純粋な合成又は組換えFALPポリペプチド、及び哺乳類FALPポリペプチドの免疫原フラグメントも提供する。1つの態様においては、FALPポリペプチド又はフラグメントは、本明細書に示される配列又はその副配列と同一か、又は実質的に同一のアミノ酸配列を有する。他の態様においては、FALPポリペプチドは、本明細書に開示されるアミノ酸残基の保存性置換により特徴づけられる変異体である。本発明のポリペプチドは、十分な長さであり得、又は十分な長さのタンパク質のフラグメント（例えば、本発明のFALPポリペプチド及び変異体の少なくとも20、少なくとも40、少なくとも60又は少なくとも100個の残基を含んで成る）をコードすることがで

きる。例えば、切断され、突然変異誘発され、誘導体化され、又は他の配列に融合される（例えば、融合タンパク質を形成するために）、本明細書に開示されるアミノ酸配列に対して、修飾されるFALPポリペプチドがまた、本発明により提供される。いくつかのFALPポリペプチドは、アミノ配列残基の挿入、欠失又は置換を含んで成る。例えば、いくつかの保存性アミノ酸置換、すなわち類似する構造特性、例えば実効電荷、疎水性及び同様のものを有する異なったアミノ酸による、選択されたアミノ酸の置換が行われ得る。典型的には、FALP変異体は、図及び/又は本明細書に示される1又は複数のFALP対立遺伝子に構造的に且つ機能的に類似する。構造的類似性は、例えば実質的な配列同一性（上記に定義されるような）、及び/又は免疫学的交差反応性により示される。本明細書に示されるように、本発明のFALPポリペプチドは、組換え又は合成方法を用いて調製されるか、又は天然の細胞源から単離され得る。 10

#### 【0204】

いくつかの態様においては、本発明のFALPポリペプチドは、免疫原（例えば、抗-FALP抗体を生成するために）として使用され得る。典型的には、本発明の免疫原FALPフラグメントは、本明細書に開示される少なくとも約6個の連続残基、しばしば少なくとも約8、約10又は約12個、又は約16個の連続残基を含んで成る。

#### 【0205】

本発明の実質的に純粋な、単離された又は組換えFALPポリペプチドはまた、図に示される配列を有するポリペプチドと特異的に免疫反応する抗体を結合するそれらの能力により特徴づけられ得る。特異的免疫反応性は通常、少なくとも約 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 又は $10^{10} \text{ M}^{-1}$ のそのリガンド（例えば、FALP）に対する抗体の特異的結合親和性により特徴づけられる。 20

#### 【0206】

種々の適用に関しては、与えられる環境下でポリペプチドの同定、検出及び定量化を促進するために、ラベルされた存在物として、すなわち検出できるラベル又はグループ、又は交差できるグループに共有結合される本発明のFALPポリペプチドを供給することが所望される。それらの検出できるグループは、検出できるポリペプチドグループ、例えばアッセイできる酵素又は抗体エピトープを包含する。他方では、検出できるグループは、種々の他の検出できるグループ又はラベル、例えば放射性ラベル（例えば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ ）又は化学ルミネセント又は蛍光グループから選択され得る。同様に、検出できるグループは、基質、補因子、インヒビター又は親和性リガンドであり得る。 30

#### 【0207】

さらに、例えばFALPポリペプチドは、より安定したペプチドを生成するために、1又は複数のアミノ酸残基を、同じタイプのD-アミノ酸（L-リシンの代わりにD-リシン）により置換することによって修飾され得る。同様に、アミノ又はカルボキシル末端の修飾、例えばカルボキシル末端のアミド化、又はアミノ末端又はペギル化された誘導体のアシル化は、本発明のポリペプチドに安定性質を付与するために使用され得る。

#### 【0208】

“タンパク質”又は“ポリペプチド”に関して主に記載されているが、上記ポリペプチドの構造類似体及び誘導体、例えばペプチド擬似体及び同様のものが、FALPのための置換基として、例えばFALPアゴニストとして、又は他方では、FALP活性アンタゴニストとして 40  
使用され得ることを、当業者は理解するであろう。ペプチド擬似体は、鋳型ペプチドの性質に類似する性質（例えば、生物学的活性）を有する非ペプチド薬物として医薬産業において通常使用されるペプチド類似体である（Fauchere, Adv. Drug Res. 15: 29 (1986); Evans など., J. Med. Chem. 30: 1229 (1987)）。それらは、コンピューター処理された分子モデリングの助けにより開発され得る。治療的に有用なペプチドに対して構造的に類似するペプチド擬似体は、同等の治療効果を生成するために使用され得る。ペプチド擬似体は、ポリペプチド態様よりも有意な利点、例えばより経済的な生成及びより高い化学安定性を有することができる。

#### 【0209】

本発明はまた、ヒトFALPポリペプチドと特異的に免疫反応する抗体も提供する。従って 50

、本発明の抗体は、本発明に開示されるアミノ酸配列又はその免疫原フラグメントに対して同一であるか又は実質的に同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを特異的に認識し、そして結合するであろう。本発明の抗体は通常、少なくとも $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 又は $10^{10}$  M<sup>-1</sup>のFALPに対する特異的結合親和性を示す。本発明の抗-FALP抗体は、種々の用途、例えばFALPポリペプチドの単離（例えば、免疫親和性クロマトグラフィーによる）、FALPポリペプチドの検出、及びFALP活性の阻害（例えば、インビボ又はインビトロ）のための用途を有する。

#### 【0210】

本発明の抗-FALP抗体は、本明細書に記載されるように、当業者に良く知られている種々の手段により製造され得る。抗体は、FALPポリペプチド又はエピトープを特異的に結合する、フラグメント、キメラ及び類似する結合剤（例えば、ファージ表示技法の生成物）を包含する。1つの観点においては、抗体は、抗原特異的結合のために十分な抗体L及びH鎖可変ドメインを含む、組換え的に調製された二本鎖ポリペプチド、及び2種のポリペプチドの結合を維持するのに十分な抗体L及びH鎖不変領域（例えば、H鎖のC<sub>H</sub>1ドメイン）の少なくともフラグメントである。1つの観点においては、抗体は、FALPを結合するよう形状化された、抗体L及びH鎖可変ドメインを含んで成る一本鎖抗体（sFv）である。本発明はまた、FALPに対するイントラボディ（intrabody）も企画する。

#### 【0211】

ポリクローナル又はモノクローナル抗体の生成方法は、号業界において良く知られている。例えば、Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY (1991); Stites など. (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (7th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, 及びそこに引用される引例 ("Stites"); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2d ed.) Academic Press, New York, NY (1986); Kohler and Milstein, 1975, Nature 256: 495-97; 及び Harlow and Laneを参照のこと。それらの技法は、ファージ又は類似するベクターにおける組換え抗体のライブラリーからの抗体の選択による抗体調製を包含する。Huse など., 1989, Science 246: 1275-81; 及び Ward など., 1989, Nature 341: 544-46を参照のこと。ポリクローナル抗体の生成に関しては、適切な標的免疫系、典型的にはマウス又はウサギ、また、ヤギ、羊、牛、鶏、テンジクネズミ、サル及びラットが選択される。宿主により生成される免疫グロブリンは、沈殿され、単離され、そして通常の方法、例えば親和性精製により精製され得る。実質的に一特異的抗体集団は、ポリクローナル血清のクロマトグラフィー精製により生成される。モノクローナル抗体に関しては、適切な動物が選択され、そして所望する免疫化プロトコールが続く。

#### 【0212】

本発明の抗体は、いずれかのイソタイプのものであり、例えばIgM, IgD, IgG, IgA及びIgEであり得、そしてIgG, IgA及びIgMが最も好ましい。好ましいモノクローナル抗-FALP抗体は、FALPの1又は複数の生物学的活性を中和する（すなわち、阻害するか又は阻止する）。そのような抗体は、所望する阻害活性についてハイブリドーマ上清液をスクリーニングすることにより得られる。約 $10^8$  L/モル、好ましくは約 $10^9$ ～約 $10^{10}$ 又はそれ以上の親和性を有するモノクローナル抗体が、下記方法により生成され得る。非ヒトモノクローナル抗体、例えばネズミ、ウサギ又はウマは良く知られており、そしてFALP又はそのフラグメントを含む調製物により宿主動物を免疫化することにより調製され得る。免疫化された動物から得られる抗体-生成細胞は、不滅化され、そしてスクリーンされるか、又はFALPポリペプチドに結合する抗体の生成について、まずスクリーンされ、そして次に不滅化される。

#### 【0213】

本発明のいくつかの抗-FALPモノクローナル抗体は、それらの標的物に対するそれらの親和性を低めないで、それらの可能性ある抗原性を低めるために、ヒト適合されるか又はキメラ性である。ヒト適合された抗体は、当業界において記載されている。例えば、Queen, など., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 10029 (1989); アメリカ特許第 5,563, 762

10

20

30

40

50

号；第5,693,761号；第5,585,089号及び第5,530,101号を参照のこと。ヒト適合化のために使用されるヒト抗体配列は、天然において存在するヒト抗体の配列であるか、又はいくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であり得る。Kettleborough など., Protein Engineering 4: 773 (1991); Kolbinger など., Protein Engineering 6: 971 (1993)を参照のこと。FALPに対するヒト適合されるモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫系の要素を有するトランスジェニック動物を用いて生成され得る（例えば、アメリカ特許第5,569,825号；第5,545,806号；第5,693,762号；第5,693,761号；及び第5,7124,350を参照のこと）。

#### 【0214】

有用な抗-FALP抗体はまた、ファージ表示技法を用いて生成され得る（例えば、Dower など., WO 91/17271号 及び McCafferty など., WO 92/01047号を参照のこと）。それらの方法においては、メンバーがそれらの外表面上で異なった抗体を表示するファージのライブラリーが生成される。抗体は通常、Fv又はFabフラグメントとして表示される。所望する特異性を有するファージ表示抗体は、FALPポリペプチドに対する親和性増強により親和性増強により選択される。一本鎖抗体は、当業界において良く知られている方法を用いて生成され得る（例えば、Colcher などl., Ann. N Y Acad. Sci. 880: 263-80 (1999); Reiter, Clin. Cancer Res. 2: 245-52 (1996); アメリカ特許第4,946,778号；第5,260,203号；第5,455,030号；第5,518,889号；及び第5,534,621号を参照のこと）。 10

#### 【0215】

発現されると、完全な抗体、それらのダイマー、個々のL及びH鎖、又は本発明の他の免疫グロブリン形は、当業界の標準の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、親和性クロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び同様の方法に従って精製され得る（一般的に、PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE 3RD EDITION (Springer-Verlag, N. Y., 1994)を参照のこと）。 20

#### 【0216】

抗体（例えば、抗-FALP抗体）は、調製物に存在するポリペプチド分子の少なくとも約80%及び少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%又はそれ以上が同じ抗原（例えば、FALPポリペプチド）を特異的に結合する場合、実質的に純粋である。医薬使用に関しては、少なくとも約90~95%の均質性のFALP免疫グロブリンが好ましく、そして98~99%又はそれ以上の均質性が最も好ましい。 30

#### 【0217】

本発明の抗体は、修飾を伴って又はそれを伴わないで使用され得る。時折り、抗体は、検出できるシグナルを提供する物質を共有又は非共有結合することによってラベルされ得る。そのようなラベルは、当業界において良く知られているそれらのラベル、例えば放射性、蛍光又は生物活性（例えば、酸素）ラベルを包含する。ラベルされた結合存在物として、本発明の抗体は、診断用途において特に有用である。

#### 【0218】

FALPポリペプチドに対する抗体の特異性を共有するが、しかしまた、第2成分に対して特異的に結合できるハイブリッド抗体はまた、本発明により包含される。ハイブリッド抗体においては、1つのH及びL鎖対は1つの抗体からであり、そして他の対はもう1つのエピトープに対して生ぜしめられた抗体からである。これは、多機能原子価の性質、すなわち少なくとも2種の異なったエピトープを同時に結合する能力をもたらし、そのようなハイブリッドは、それぞれの成分抗体を生成するハイブリドーマの融合により、又は組換え技法により形成され得る。 40

#### 【0219】

本発明の1つの観点においては、FALPの発現は、疾病状態又は疾病状態への傾向、障害又はFALP規則に関連する状態の個人の診断のためにモニターされるか又は決定される。種々の態様においては、疾病状態は、肥満又は肥満関連状態である。

#### 【0220】

本発明はまた、FALPの活性を調節する化合物、又はFALPの活性を調節する能力について 50

スクリーニングすることができるアッセイ方法を提供する。この方法はまた、種々の薬物スクリーニング技法において組換えFALPを用いることにより化合物をスクリーニングするために有用である。従って、本発明は、FALP機能の推定上の特異的アゴニスト又はアンタゴニストを評価する方法を包含する。従って、本発明は、FALPの活性を調節する化合物についてのスクリーニングアッセイの調製及び実施へのそれらの化合物の使用に向けられる。予備スクリーンは、そのような同定される化合物の少なくともいくつかはたぶん、FALPモジュレーターであるので、FALPに結合できる化合物についてスクリーニングすることにより行われ得る。結合アッセイは通常、FALPタンパク質と1又は複数の試験化合物とを接触せしめ、そして前記タンパク質及び試験化合物による結合複合体の十分な時間の形成を可能にすることを包含する。形成されるいずれかの結合複合体は、多くの確立された分析技法のいずれかを用いて検出され得る。タンパク質結合アッセイは、同時-沈殿、非変性SDS-ポリアクリルアミドゲル上での同時-移行、及びウェスタンブロット上で同時-移動を測定する方法を包含するが、但しそれらだけには限定されない。そのようなアッセイに使用されるFALPタンパク質は、天然において発現され、クローン化され、又は合成され得る。

10

#### 【0221】

1つの態様においては、アッセイは細胞に基づくアッセイであり、そしてFALPをコードする核酸配列を有するベクター又は発現カセットにより、安定して又は一時的にトランスフェクトされる細胞が使用される。細胞は、FALPの発現のために適切な条件下で維持され、そして存在する結合のために適切な条件下で推定上の剤と接触せしめられる。結合は、標準の技法を用いて検出され得る。例えば、結合の程度は、適切な対照に対して（例えば、推定上の剤の不在下でバックグラウンドに対して、又は既知のリガンドに対して）決定され得る。

20

#### 【0222】

結合又は複合体形成の検出は、直接的に又は間接的に行われる。例えば、推定上の剤は、適切なラベル（例えば、蛍光ラベル、化学ルミネセントラベル、同位体ラベル、酵素ラベル及び同様のもの）によりラベルされ得る。そして結合は、ラベルの検出により決定され得る。

#### 【0223】

あるスクリーニング方法は、FALPの発現又は活性をアップレギュレートする（又は、他方では、阻害する）化合物についてのスクリーニングを包含する。そのような方法は一般的に、試験化合物が、FALPを発現する1又は複数の細胞と接触せしめられ、そして次に、FALP発現（転写又は翻訳生成物のいずれか）又は活性の変化を検出する、細胞に基づくアッセイを行うことを包含する。いくつかのアッセイは、内因性FALPを発現する細胞により行われる。他の発現アッセイは、外因性FALPを発現する組換え細胞により行われる。いずれの場合においても、FALP発現は、本明細書に記載されるように、多くの異なった手段で検出され得る。例えば、細胞におけるFALPの発現レベルは、FALPの転写体（又はそれらに由来する相補的核酸）と特異的にハイブリダイズするプローブにより、細胞において発現されるmRNAをプローブすることにより決定され得る。プロービングは、細胞を溶解し、そしてノザンブロットを行うことにより、又は現場-ハイブリダイゼーション技法（上記を参照のこと）を用いて、細胞を溶解しないで行われ得る。他方では、FALPタンパク質は、細胞溶解物が、FALPに特異的に結合する抗体によりプローブされる免疫学的方法を用いて検出される。同様に、FALP活性は、アッセイされ得る。薬物スクリーニングの1つの方法は、FALP、例えば本明細書に開示される配列を有するタンパク質を発現する組換えDNAにより安定して形質転換される真核又は原核宿主細胞を用いる。

30

40

#### 【0224】

適切なアッセイにおいては、ヒトFALPタンパク質の少なくとも1つの性質、活性又は機能的特性を有するFALPタンパク質（単離された又は組換え）が使用される。

#### 【0225】

発現又は活性のレベルは、基線値に比較され得る。発現レベルはまた、負の対照としてFALPを発現しない細胞について決定され得る。そのような細胞は一般的に、試験細胞と実

50

質的に同じである。

#### 【0226】

いくつかの自動アッセイ方法が、短時間で、数万種の化合物のスクリーニングを可能にするよう最近、開発されて来た。例えば、Fodorなど., Science 251: 767-73 (1991)、及び化学多様化ライブラリーの他の記載（多くの化合物による結合親和性の試験についての手段を記載する）を参照のこと。適切なアッセイの開発は、本発明により提供されるように、多量の精製されたFALP、及び/又は組換えFALPを発現する細胞の利用により非常に促進され得る。

#### 【0227】

さらにもう1つの観点においては、本発明は、治療的有効量のFALP機能のモジュレーター、例えばFALP機能又は遺伝子発現のアンタゴニスト（インヒビター）を、FALP-介在性状態、障害又は疾病を有する対象に投与することによって、そのような疾病、障害又は状態を処理するための方法を提供する。FALP発現又は活性に関連する疾病、障害及び状態は、肥満及び肥満関連状態を包含する。そのようなモジュレーターは、FALP機能又は発現の小分子アゴニスト及びアンタゴニスト；アンチセンス及びリボザイム三重ポリヌクレオチド；遺伝子療法及び同様のものを包含する。本発明の方法及び試薬は、動物、例えば哺乳類（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、羊、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス）の処理において、又はヒト疾病の動物又はインビトロ（例えば、細胞培養物）モデルにおいて使用され得る。

10

#### 【0228】

本発明はさらに、FALPのアゴニスト、アンタゴニスト又はリガンドを含んで成る治療組成物、及びFALPにより介在される生理学的又は病理学的状態の処理方法を提供する。

20

#### 【0229】

FALPポリペプチド、そのフラグメント、センス及びアンチセンスポリペプチド、抗-FALP抗体又はその結合フラグメント、及びFALP活性のアンタゴニスト又はアゴニスト（例えば、小分子モジュレーター）は、無菌条件下で、試験される宿主に直接的に投与され得る。しかしながら、活性成分を単独で投与することが可能であるが、それを医薬製剤として提供することもしばしば好ましい。配合物は典型的には、少なくとも1つの活性成分、及び1又は複数のその許容できるキャリアーを含んで成る。個々のキャリアーは、他の成分との適合できる点において、医薬的に及び生理学的に許容でき、そして患者に有害であるべきではない。例えば、生物活性剤は、安定性又は薬理学的性質、例えば半減期を高めるために、それらの投与の前、キャリアータンパク質、例えばオボアルブミン又は血清アルブミンにより複合体化され得る。さらに、本発明の治療製剤は、他の化学療法剤又は化学予防剤と組み合わせられるか、又はそれらと共に使用され得る。

30

#### 【0230】

治療製剤は、医薬業界において良く知られているいずれかの方法により調製され得る。例えばGilman nado. (eds. ) GOODMAN AND GILMAN'S : THE PHARMACOLOGICAL BASES OF THERAPEUTICS (8th ed. ) Pergamon Press (1990); 及びRemington, THE SCIENCE OF PRACTICE AND PHARMACY, 20th Edition. (2001) Mack Publishing Co. , Easton, Pa.; Avis など. (eds. ) (1993) PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS: PARENTERAL MEDICATIONS Dekker, N. Y.; Liebermanなど. (eds. ) (1990) PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS: TABLETS Dekker, N. Y.; and Lieberman など. (eds. ) (1990) PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS: DISPERSION SYSTEMS Dekker, N. Y.を参照のこと。

40

#### 【0231】

従って、本明細書において使用される場合、用語“用量形”とは、哺乳類、特にヒトへの投与のために適切なタンパク質及び/又はポリヌクレオチドの医薬製剤、特に哺乳類、好ましくはヒトへの投与のための治療用タンパク質及び/又はポリヌクレオチドの溶液における安定化のために適切なそれらの医薬製剤のために適切である、当業界において良く知られているいずれかの適切な用量形を包含する。すべてこれは、FALP遺伝子生成物が組成物の形で存在するか否か関係ない。従って、本明細書において使用される場合、用語“

50

用量形”とは、哺乳類、特にヒトへの投与のために適切なタンパク質及び/又はポリヌクレオチドの医薬製剤、特に哺乳類、好ましくはヒトへの投与のための治療用タンパク質及び/又はポリヌクレオチドの溶液における安定化のために適切なそれらの医薬製剤（単独ではないが）のために適切である、当業界において良く知られているいずれかの適切な用量形を包含する。すべてこれは、FALP遺伝子生成物が組成物の形で存在するか否かに関係ない。1つの例は、錠剤、カプセル、ロゼンジ又は同様の経口投与形、又はシロップ、水溶液、エマルジョン及び同様のものの液体形であり、それらは、経口投与形である場合、消化管において効果を誘発する前、治療用タンパク質及び/又はポリヌクレオチドを分解から保護することができる。経皮投与のための用量形の例は、経皮用パッチ、経皮用包帯、及び同様のものを包含する。皮膚に対して直接的に、又はパッド、パッチ又は同様のものを通して適用されても、いずれにせよ、ローション、ステック、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ゲル、等が、局部用量形内に包含される。坐剤投与のための用量形の例は、身体腔（特に、直腸、膣及び尿道）中に挿入されるいずれかの固体又は他の用量形を包含する。粘膜投与のための用量単位の例は、適切であることが知られているようなキャリアーを、活性成分の他に含む、坐剤、浣腸のための溶液、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、発泡体、ネブライズされた溶液、粉末及び類似する配合物を包含する。デポット投与のための用量単位の例は、活性剤のペレット又は小さな円柱状体、又は固体形を包含し、ここで活性成分は、マトリックス又は生分解性ポリマー、マイクロエマルジョン、リポソームに封入されるか又はマイクロカプセル封入される。移植可能な注入装置の例は、活性剤が生分解性ポリマー又は合成ポリマー、例えばシリコーン、シリコーンゴム、シラスティック又は類似するポリマー内に封入されるか又はそれらに分散されているいずれかの固体形を包含する。他方では、注入装置のための用量形は、リポソーム供給システムを使用することができる。

10

20

#### 【0232】

処理される疾病及び患者の病状に依存して、本発明の化合物は、経口、非経口（例えば、筋肉内、腹腔内、静脈内、ICV、槽内注射又は注入、皮下注射、又は移植体）により、吸入スプレー、鼻腔内、膣内、直腸、舌下又は局部路により投与され得、そして従来の非毒性の医薬的に許容できる、個々の投与路のために適切なキャリアー、アジュバント及びビークルを含む適切な用量単位配合物において、単独で又は一緒に配合され得る。

30

#### 【0233】

本発明の医薬組成物及び方法は、さらに、上記に言及された病理学的状態の処理において通常適用される、本明細書に示されるような他の治療的活性化合物を含んで成ることができる。

#### 【0234】

FALP調節を必要とする状態の処理又は予防においては、適切な用量レベルは一般的に、約0.001~100mg/kg体重/日であり、これは1回又は複数回の用量で投与される。好ましくは、用量レベルは、約0.01~約25mg/kg/日；より好ましくは、約6.05~約10mg/kg/日である。適切な用量レベルは、約0.01~25mg/kg/日、約0.05~10mg/kg/日、又は約0.1~5mg/kg/日である。この範囲内で、用量は、約0.005~約0.5又は0.5~5mg/kg/日である。経口投与に関しては、組成物は好ましくは、処理されるべき患者への投与の症状調節のための活性成分を、約1~100mg、特に1,5, 10,15, 20,25, 50,75, 100,150, 200,250, 300,400, 500,600, 750,800, 900, and 1000mgを含む錠剤の形で供給される。化合物は、1日当たり1~4回、好ましくは1日当たり1又は2回、投与され得る。

40

#### 【0235】

しかしながら、その特定用量レベル及び特定患者のための投与の頻度は、変化し、そして種々の要因、例えば使用される特定の化合物、化合物の代謝安定性及び作用の長さ、年齢、体重、一般的に健康、性別、食事、投与のモード及び時期、排泄の速度、薬剤の組み合わせ、特定の病状の重症度、及び治療を受ける宿主に依存するであろう。

#### 【0236】

本発明の化合物は、炎症及び免疫調節障害及び疾患、例えば喘息及びアレルギー性疾患

50



、並びに自己免疫病理学、例えばリウマチ様関節炎及びアテローム硬化症、及び上記に示されるそれらの病理学を予防し、そして処理するために、関連する利用性を有する他の化合物と組み合わせられ得る。

#### 【0237】

本発明は、生物学的サンプルにおけるFALPポリペプチド及びポリヌクレオチドの検出及び定量化のための多くの方法（例えば、FALP活性又は発現アンタゴニストをスクリーニングするためのアッセイ）を提供する。1つの態様においては、FALP遺伝子生成物（例えば、ポリペプチド又はmRNA）の発現又は過発現は、FALPにより介在されるか、又はそれに関連する疾病又は病状と相互関係する。

#### 【0238】

生物学的サンプルは、血液サンプル、血清、細胞（例えば、完全細胞、細胞画分、細胞抽出物及び培養された細胞又は細胞系）、組織（例えば、生検から得られる組織）、体液（例えば、尿、痰、羊水、滑液）又は培地（培養された細胞又は細胞系からの）、及び同様のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない。FALPポリヌクレオチドを検出するか又は定量化するための方法は、シグナル増幅を伴って又は伴わないでの増幅に基づいてアッセイ、ハイブリダイゼーションに基づくアッセイ、及び増幅－ハイブリダイゼーションの組み合わせアッセイを包含するが、但しそれらだけには限定されない。FALPポリペプチドを検出し、そして定量化するためには、典型的な方法は、FALPポリペプチド又はエピトープに対して特異的に結合する抗体又は他の結合剤を用いるイムノアッセイである。

10

20

#### 【0239】

ポリメラーゼ鎖反応（PCR）又はその変法は、典型的な増幅に基づくアッセイである。インビトロ増幅方法を通して当業者を方向づけるのに十分な技法の例は、PCR TECHNOLOGY: PRINCIPLES AND APPLICATIONS FOR DNA AMPLIFICATION, H. Erlich, Ed. Freeman Press, New York, NY (1992); PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, eds. munis, Gelfland, Snisky, and White, Academic Press, San Diego, CA (1990)に見出される。他の適切な標的物増幅方法は、リガーゼ鎖反応（LCR; Wu and Wallace, 1989, Genomics 4: 560）; 鎖置換増幅（SDA; Walker など., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 392-396）; 核酸配列に基づく増幅（NASBA; Cengage, Mississauga, Ontario ;例えばCompton, 1991, Natl. Acad. Sci. 350: 91）、及び同様のものを包含する。PCRの1つの有用な変法は、PCR ELISA（例えば、Boehringer Mannheim Cat. No. 1 636 111）であり、ここでジゴキシゲニン-dUTPがPCR生成物中に組み込まれる。PCR反応混合物が変性され、そしてPCR生成物の内部配列にアニーリングするよう企画された、ビオチンによりラベルされたオリゴヌクレオチドによりハイブリダイズされる。ハイブリダイゼーション生成物は、ストレプトアビジンにより被覆されたプレート上に固定され、そして抗-ジゴキシゲニン抗体を用いて検出される。

30

#### 【0240】

ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション技法を用いて特定のDNA及びRNA測定のための種々の方法は、当業者に知られている（Sambrookを参照のこと）。ハイブリダイゼーションに基づくアッセイは、標的ポリヌクレオチドに対してポリヌクレオチドプローブがハイブリダイズされるアッセイを言及する。通常、本発明のポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブは、FALP核酸配列の連続配列に対して完全に又は実質的に同一である。好ましくは、ポリヌクレオチドプローブは、少なくとも10個の塩基、しばしば少なくとも約20個の塩基、及び時々、少なくとも約200個又はそれ以上の長さの塩基である。ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションへの使用のためのポリヌクレオチドプローブ配列を選択するための方法は、Sambrookに論じられている。

40

#### 【0241】

ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション形式は、当業者に知られている。いくつかの形式においては、少なくとも1つの標的物及びプローブが固定される。固定されたポリヌクレオチドは、DNA、RNA、又はもう1つのオリゴ又はポリヌクレオチドであり得、そし

50

て天然又は非天然に存在するヌクレオチド、ヌクレオチド類似体又は主鎖を含んで成る。そのようなアッセイは、次のいくつかの形式のいずれかにおいて存在することができる：サザン、ドット及びスロット ブロット、高密度ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドアレイ（例えば、GeneChips<sup>TM</sup> Affymetrix）、ディプスチック、ピン、チップ又はビーズ。それらの技法のすべては当業者において良く知られており、そして市販の診断キットに基づかれる。ハイブリダイゼーション技法は一般的に、Hames など., ed., NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, A PRACTICAL APPROACH IRL Press, (1985); Gall and Pardue Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 63: 378-383 (1969); 及び John など., Nature, 223: 582-587 (1969)に記載されている。

#### 【0242】

10

1つの態様においては、現場ハイブリダイゼーションが、サンプルにおけるFALP配列を検出するために使用される。現場ハイブリダイゼーションアッセイは、良く知られており、そして一般的に、Angerer など., METHODS ENZYMOL., 152: 649-660 (1987) 及び Ausubel, 前記に記載される。

#### 【0243】

1つの態様においては、FALPポリヌクレオチドは、本発明の抗-FALP抗体を用いて、サンプルにおいて検出される。多くの良く確立された免疫学的結合アッセイが、本発明のFALPを検出し、そして定量化するために適切である。例えば、アメリカ特許第4,366,241号；第4,376,110号；第4,517,288号；及び 第4,837,168号，及びまた METHODS IN CELL BIOLOGY VOLUME 37: ANTIBODIES IN CELL BIOLOGY, Asai, ed. Academic Press, Inc. New York (1993); BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY 7th Edition, Stites & Terr, eds. (1991); Harlow, 前記 [例えば, Chapter 14], 及び Ausubel, 前記, [例えば, Chapter 11]を参照のこと。

20

#### 【0244】

FALPを検出するためのイムノアッセイは、競争的であるか又は非競争的であり得る。通常、アッセイされるFALP遺伝子生成物は、検出できるラベルを用いて、直接的に又は間接的に検出される。アッセイに使用される特定のラベル又は検出できるグループは通常、アッセイに使用される抗体の特異的結合を有意に妨げない限り、本発明の決定的観点ではない。ラベルは、捕獲剤（例えば、抗-FALP抗体）に共有結合され得るか、又は捕獲剤により認識されるよりも異なったエピトープでFALPポリペプチドに特異的に結合する、第3成分、例えばもう1つの抗体に結合され得る。

30

#### 【0245】

非競争イムノアッセイは、捕獲される分析物（FALPポリペプチド）の量が直接的に測定されるアッセイである。1つのそのようなアッセイは、捕獲される分析物上の2種の非干渉エピトープに対して反応性のモノクローナル抗体を用いての2部のモノクローナルに基づくイムノアッセイである。例えば、背景情報については、Maddox など., J. Exp. Med., 158: 1211 (1983)を参照のこと。そのようなアッセイにおいては、サンプルにおけるFALPの量は直接的に測定される。例えば、いわゆる“サンドイッチ”アッセイを用いて、捕獲剤（FALP抗体）は、それらが固定される固体基質に直接的に結合され得る。次に、それらの固定された抗体は、試験サンプルに存在するポリペプチドを捕獲する。次に、このようにして固定されたFALPは、ラベリング剤、例えばラベルを担持する第2のFALP抗体により結合される。他方では、その第2のFALP抗体は、ラベルを欠くことができるが、しかしそれは、第2抗体が由来する種の抗体に対して特異的なラベルされた第3抗体により結合され得る。第2抗体は、検出できる成分、例えば第3のラベルされた分子が特異的に結合できるビオチン、例えば酵素ラベルされたストレプトタビジンにより修飾され得る。負及び正の対照がまた、使用され得る。

40

#### 【0246】

競争アッセイにおいては、サンプルに存在するFALPポリペプチドの量が、サンプルに存在する分析物（例えば、FALPポリペプチド）により、捕獲剤（例えば、抗-FALP抗体）から置換される、添加された（外因性）FALPの量を測定することによって、間接的に測定さ

50

れる。1つの競争アッセイにおいては、既知量のFALPがサンプルに添加され、そして次に、サンプルが、FALPに対して特異的に結合する捕獲剤（例えば、抗-FALP抗体）と接触される。抗体に結合されるFALPの量は、サンプルに存在するFALPの濃度に反比例する。

#### 【0247】

好ましくは、抗体は固体支持体上に固定される。抗体に結合されるFALPの量は、FALP/抗体複合体に存在するFALPの量を測定することにより、又は他方では、複合体化されていないFALPの量を測定することにより決定され得る。FALPの量は、ラベルされたFALPを提供することにより検出され得る。

#### 【0248】

例えば、ハプテン阻害アッセイを用いて、分析物（この場合、FALP）が固体支持体上に固定される。既知量の抗-FALP抗体がサンプルに添加され、そして次に、サンプルがその固定されたFALPと接触される。この場合、固定されたFALPに結合される抗-FALP抗体の量は、サンプルに存在するFALPの量に反比例する。再び、固定された抗体の量が、抗体の固定された画分、又は溶液に残る抗体の画分を検出することにより検出され得る。検出は、抗体がラベルされる場合、直接的であり、又は抗体が上記のように抗体に対して特異的に結合する、ラベルされた成分の続く添加によれば間接的であり得る。

#### 【0249】

競争及び非競争FALPポリペプチドイムノアッセイの他に、本発明はまた、FALPポリペプチドの検出及び定量化のための他のアッセイを提供する。例えば、ウェスタンブロット（イムノブロット）分析は、サンプルにおけるFALPの存在を検出し、そして定量化するために使用され得る。技法は一般的に、分子量に基づいてゲル電気泳動によりサンプルポリペプチドを分離し、その分離されたポリペプチドを適切な固体支持体（例えば、ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター又は誘導体化されたナイロンフィルター）に移し、そしてFALPを特異的に結合する抗体と共にサンプルをインキュベートすることを含んで成る。抗-FALP抗体は、固体支持体上のFALPに特異的に結合する。それらの抗体は、直接的にラベルされ得るか、又は他方では、抗-FALPに対して特異的に結合する、ラベルされた抗体（例えば、ラベルされる羊抗-マウス抗体）を用いて検出され得る。

#### 【0250】

さらに、アッセイ、例えばリポソームイムノアッセイ（LIA）はまた、本発明により包含される。LIAは、特定分子（例えば、抗体）を結合し、そして封入された試薬又はマーカを開放するよう企画されるリポソームを用いる。次に、開放される化学物質が、標準技法に従って検出される（Monroe など., 1986, Amer. Clin. Prod. Rev. 5: 34-41を参照のこと）。

#### 【0251】

本発明の治療及び診断（検出）方法のために有用な試薬は便利には、キット形に供給される。従って、本発明は、本発明のポリペプチド、抗体及びポリヌクレオチドを含むキットを包含する。

#### 【0252】

1つの態様においては、キットは容器に1又は複数の次のものを含んでなる：（1）FALPポリヌクレオチド（例えば、FALP cDNA配列に対応し、そして標的ポリヌクレオチドを増幅することができるオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブ）；（2）抗-FALP抗体；（3）任意には、固体表面（例えば、スライド、多重ウェルプレート又は試薬管）上に被覆されるFALPポリペプチド又はフラグメント；（4）FALPポリヌクレオチド（例えば、アッセイにおいては正の対照として使用するための）；（5）管。本発明の検出方法を実施するための説明書、及び検量線もまた包含され得る。

#### 【実施例】

#### 【0253】

材料及び方法

3T3-L1細胞の分化：

3T3-L1前駆脂肪細胞を、10%の仔ウシ血清によりDMEM中で、亜密集培養(subconfluent c 50

ultures)として保存される。細胞の密集後の分化は、 $0.25\mu\text{M}$ のデキサメタゾン、 $0.5\text{mM}$ のIBMX、及び $10\mu\text{g/ml}$ のインスリンにて2日間処理することにより、密集化した細胞の分化が、開始される。この後 $10\mu\text{g/ml}$ のインスリンにて2日間インキュベートする。次ぎにその細胞を、10%の仔ウシ血清によるDMEM中でさらに4日間保存される。Red Oil O染色により、90%以上の細胞が、典型的な脂肪細胞の形態性を呈示することを示した。

#### 【0254】

2次元ゲルエレクトロフォoresis (2-DE):

3T3 L1前駆脂肪細胞又は脂肪細胞(分化後8日目)を、7Mの尿素、2Mのチオ尿素、4%CHAP, 10mMのDTT、1%のフォーマイト3乃至10を含むを含む溶離緩衝液中で溶解される。次にこれらの試料から等量のタンパク質を、一次元フォカシング(forcussing)のためのpH 4乃至7の免疫固定Drystrips(Pharmacia)を用いて、前に記載したように2次元ゲル電気泳動により分析した(Wang, Y., Xu, A., Ye, J., Kraegen, E.W., Tse, C.A. and Cooper, G.J. (2001) Diabetes 50, 1821-7)。分離されたタンパク質を、シルバー又はCoomassie Brilliant Blue R250(CBB)のいずれかにて染色した。異なって発現されるタンパク質を、Melamine 2ソフトウエア(Bio-Rad)により同定した。

#### 【0255】

In-gelトリプシン消化、逆相高速液化クロマトグラフィ(RP HPLC)及びアミノ酸配列決定:

2-DEゲルにより分離された関連タンパク質を切り取り、そしてゲル片を、前記In-gelトリプシン消化にかけた。Xu, A., Bellamy, A.R. and Taylor, J.A., EMBO Journal 19, 6465-74(2000)を参照。抽出されたトリプシンとペプチド混合物を、Jupiter  $5\mu\text{m}$  C18 column(250x2.00mm, Phenomenex)により分離する。予備加温カラム(column)( $37^{\circ}\text{C}$ )を、0.1%のトリフルオロ酢酸(v/v)にて7分間洗浄し、その後50分の線形勾配の8%乃至36%のアセトニトリルを $200\mu\text{l/min}$ の流速で使用し溶離した。Perkin-Elmer(Procise, Model 492)タンパク質配列決定(sequencer)を備えたEdman変性法を用いて、アミノ酸配列決定のために、十分に分離された画分が選択される。

#### 【0256】

ヒト-マウスのFALPのクローニング:

製造者の指示(Life technology)に基づくTRIZOL試薬を使用して、マウスの3T3-L1脂肪細胞又はヒトの脂肪パッド(pads)から、全RNAを精製した。全RNAからoligo-dTでプライムされたcDNAを、PCRクローニングを変性するための鋳型として使用した。マウスFALPの2のトリピックなペプチドのアミノ酸配列により設計された2の変性プライマーは、

1. 5'-ATGGCNAAYGGNACNGAYGCNAGY-3'(配列番号1)
2. 5'-YTGNGTNAYCCAYTGRTCNCTNCCNGC-3'(配列番号2)

以下2の「ゲスマー(guessmers)」をヒトFALPクローニングとして使用した。

#### 【0257】

1. hFALP/UP: 5'-ATCGGGATCCATGGCCAACGGGACCAAC-3'(センス)(配列番号3)、
2. hFALP/DS: 5'-GTACGAATTCCTCATCTGCGGGGAGGC-3'(アンチセンス)(配列番号4)。

#### 【0258】

製造者の指示(Life Technology)によるcDNAの末端(RACE)の3'-及び5'-高速増幅化を使用して、マウス及びヒトのHALPのcDNAの全長が得られた。

#### 【0259】

次ぎにDNA断片を、pGEMT-イーズ・ベクター(Bromega)に挿入し、DNAの配列検証した。

マウスFALPの哺乳動物の発現のためのベクターを、センス・プライマー5'-ATCGGGATCCATGGCCAACGGGACCGACGCC-3'(配列番号5)を、そしてアンチセンス・プライマー5'-ATCGGAATTCTCACTTGTCATCGTCGTCCTTGCTAGTCGGGGAGAGCCAGGGGCC-3'を使用し、cDNA増幅により生成した。BamHI/EcoRIによる消化の後、断片を、pcDNA3.1ベクターに挿入し、pcDNA-FALP-Fを生成し、それが、そのC末端で標識(tag)としたFLAGエピトープを伴う全長のFALPをコードする。

#### 【0260】

マウスのFALPの一過性発現、及び免疫細胞化学：

FLAG-標識のFALPをコードする哺乳動物の発現ベクターは、FuGENE 6トランスフェクト試薬を用いてCOS-7細胞、又は3T3 L1の脂肪細胞内にトランスフェクトした。その細胞をさらに24時間又は48時間増殖し、メタノール/アセトンを用いて固定し、マウス抗-FLAGモノクローナル・抗体(Sigma)にてインキュベートし、さらにcy3-結合ヤギ抗-マウス・ポリクローナル抗体(Sigma)を伴い染色した。次ぎにその試料を、ZEISS Axioskop 2に加えてデジタルカメラを備えた顕微鏡を用いて分析した。

#### 【0261】

ノーザン・ブロット分析：

3T3 L1細胞又はマウスの脂肪組織のいずれかから精製された10 µgのRNAを、1.2%のホルムアルデヒド-変性・アガロース・ゲルにて分離し、ナイロン膜に移し変えた。ハイブリット化を、前記のように(Xu, A., Bellamy, A.R. and Taylor, J.A. (1999) *Biochemical Journal* 342, 683-9)、プローブとして<sup>32</sup>Pにて標識化した全長の脂肪細胞、アジポネクチン、PPARγ、又はGLUT4 cDNAを用いて行なった。その膜を、ホスホリメジャー(phosphorimager)を用いて視覚化し、MacBASソフトウェア(Fujifilm)を用いて定量した。

#### 【0262】

結果及び論評

FALPの特徴付け、脂肪変換中に発現される新規のタンパク質：

脂肪変換中異なって発現される新規なタンパク質を同定するため、3T3 L1の前駆脂肪細胞及び脂肪細胞からのタンパク質が、2-DEにより分析された。ゲルの低分子量の領域内にて、脂肪細胞(分化後8日目)において選択的に発現されるが、前駆脂肪細胞において発現されない(図1)2のタンパク質が、見出された。

#### 【0263】

これら2のタンパク質の性質を同定するため、そのスポットを、複数の調製2Dゲル、及びトリプシンにて消化されたゲルから切除した。そのタンパク質のトリプシンとペプチドの混合物をRP HPLCにより分離し、そして十分に溶解した画分を、アミノ酸配列決定により分析した。データベースによる検索により、スポット1から誘導された配列決定されたペプチド(FDETTAD)が、マウスの表皮の脂肪酸結合タンパク質(Swissprot Accession 番号P55053)にて排他的に整合したことを示した。「スポット」2由来のトリプシンのペプチドMANGTDAVSPLT(配列番号7)、及びAGTDQWTQQSPS(配列番号8)に対するアミノ酸配列が、利用可能なデータベースに存在するいずれか周知のタンパク質と有意な相同性を示さない。このタンパク質の部分的なcDNA配列が、トリプシン・ペプチドのアミノ酸配列により設計されたプライマーを使用し、変性したRT PCRにより得られた。全体をコードするcDNA配列が、3'-及び5'-RACE PCR戦略(図2)により得られた。この遺伝子のDNA配列を、Genbank(accession番号AY079153)に寄託した。

#### 【0264】

生物技術情報の全国バイオテクノロジー情報センターで、核酸データベースのBLASTnの検索によれば、マウスのFALP cDNA配列が、ハツカネズミ18日目の胚性cDNA(遺伝子accession番号AK003912)から誘導される発現された配列タグ(EST)配列と有意に相同性を共有することが、示されている。マウスFALPにおけるcDNA配列のオープンリーディング・フレームが、所定の分子量が約14kDa、及びpI値が約6.4と想定されるタンパク質をコードし(図2)、それが2Dゲル(図1)内にて分離されたタンパク質のスポットに完全に照合する。BLASTpデータベースの検索により、FALPの全長のアミノ酸配列が、いずれか周知のタンパク質とほとんど相同しないことを示し、FALPが新規な脂肪細胞のタンパク質であることを示唆している。

#### 【0265】

FALP mRNAの分化に依存した発現：

ノーザン・ブロット分析により3T3 L1先駆脂肪細胞の脂肪細胞への変換中、FALP mRNAの発現の時間経過が、次ぎに試験された。図3に示すようにFALP mRNAが、形態的(細胞内の小滴の周辺の形状及び外観)に細胞の分化及び変化を十分に相関させる。約800bpの量

のFALP mRNAが、2日ほど早く開始が現れ、後に脂肪の変換の誘発に続き、6日にて最大に到達した。FALPの発現の反応速度が、aP2と並行し、そしてアジポネクチンよりわずかに早く、脂肪細胞中でタンパク質が排他的に発現した。Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. and Lodish, H.F., *Journal of Biological Chemistry* 270, 26746-26749 (1995); Hu, E., Liang, P. and Spiegelman, B.M., *Journal of Biological Chemistry* 271, 10697-10703 (1996)を参照。従って、その結果から実証されることは、FALP mRNAの発現及び脂肪細胞の現象型が同時に現れることである。

#### 【0266】

マウスのFALPの脂質組織特異的発現：

FLATの組織分配を調査するための、マウスから種々の組織RNAsを用いて、ノーザン・ブロット分析を行なった。図4に示すようにFALP mRNAが、マウスの上皮(白色の脂肪組織)及び肩甲間(茶色の脂肪細胞)脂肪パッドに顕著に発現された。脂肪組織内のFALP mRNAのサイズが、3T3 L1の脂肪細胞にて検出されたものと類似した。FAKP mRNAが、肺、脾臓、腎臓、小腸、心臓、及び骨格筋並びに肝臓を含む他の試験組織においてほとんど検出されなかった。この分析により明示されることは、FALTの両方のアイソフォームの発現が、マウスの脂肪組織へ著しく制限されたことである。

#### 【0267】

2の交互のスプライスされるアイソフォームとして、HALPのヒト相同性：

マウスのFALPのヒト相同性を同定するため、そのアミノ酸配列が、ヒトのゲノム配列に対する検索のため使用された。この分析により知見されたことは、染色体21q22.1の領域内に2のDNA断片があり、それが7670塩基の塩基対により切断され、そしてマウスFALPのN-末端69アミノ酸残基と85%以上の同一性を有する有力なポリペプチドをコードする。脂肪細胞におけるこの有力なヒトFALPの相同性の存在を確認するため、2の「ゲスマー(guesmers)」が、その方法に記載されているようにヒトFALPの有力な配列に基づいて設計された。2の「ゲスマー(guesmers)」を使用する逆転PCR分析では、予測されるサイズ(~180bp)(図5)のバンドが現れた。DNA配列分析では、この推定される遺伝子の発現を検証した。さらにcDNA末端の3'高速増幅を使用した分析の知見によれば、ヒトFALPの遺伝子が、2の相違するアイソフォームとして存在し、それがヒトFALP $\alpha$ 及びFALP $\beta$ それぞれを言及している(図6)。これら2のDNA配列が、Genbank(accession番号AY079152及びAF483549)に寄託されている。これら2のアイソフォームのコード領域が、共通のN-末端を共有しているが、相違するC-末端を有する。ヒトのFALP $\alpha$ 及び $\beta$ の概念的なタンパク質が、約19kDaと約11kDaのそれぞれの想定された分子量を有し、173と102のアミノ酸残基から構成される。ヒトFALPの遺伝子構造が、3種のエクソンを含み、そのエクソンI及びIIが両アイソフォームにて共有されるNH<sub>2</sub>末端の68アミノ酸残基コードする(図5)。エクソンIII及びIII'が、交互にスプライスされ、それが、 $\alpha$ アイソフォームに対しC00H-末端105のアミノ酸残基、及び $\beta$ アイソフォームに対し33のアミノ酸残基をそれぞれコードする。

#### 【0268】

FALTの非細胞の分配：

プログラムTMpred(Hofmann, K. and Stoffel, W., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 166 (1993)を参照)を用いてヒト及びマウスのFALPsの配列分析は、保存された1本の膜貫通ドメインの差し渡し(spanning)23アミノ酸残基を同定することでFALPが、内在性膜タンパク質であることを明示している。FALPの細胞内の位置を検査するため、C00H-末端FLAGエピトープタグFALP構成物を、一過性トランスフェクトによりCOS 7細胞又は3T3 L1の脂肪細胞のいずれかの細胞中へ導入した。免疫蛍光顕微鏡を使用する分析により表されていることは、より多い量でFLAG-タグFALPが、小さなパッチ様構造(図7A及び7B)を形成している核周辺領域に蓄積した。

#### 【0269】

3T3 L1の脂肪細胞を、50nMのインスリンにて処理すると、細胞質全体に広がる(図7C)多くの個別の斑点状構造内へ小さな核周辺画分からFALTの再分配が生ずる。さらにわずかな斑点構造が、細胞の周辺領域で観察され、それが血漿膜で存在することを示唆している。

この結果により、FALTが、インスリンにより調節される動的な画分に位置けされていることを示唆する。インスリンによる処理が、COS7細胞中FALPの再配分を起こさなかった、おそらくこの細胞株におけるインスリン受容体の欠損又はその他のシグナリング成分によるものである。

#### 【0270】

本明細書に言及され、又は引用された全ての特許、刊行物、科学製品、webサイト、及び他の資料及び材料により、本発明が関係する当業者の技術レベルにて明示され、そしてこうして引用されたそれぞれの資料及び材料が、本明細書によりあたかもそれが、その全体を個別に引用により取り入れたか又は明細書にその全体を説明したことと同じ程度に引用により取り入れられる。出願者は、こうしたいずれかの特許、刊行物、科学製品、web siteからいずれか、又は全ての材料又は情報、電氣的に利用できる情報、および別に引用される材料又は資料を明細書に物理的に取り入れる権利を保持する。

10

#### 【0271】

本明細書に記載された特定の方法および組成物が、好ましい例を代表しそして明示されたもので、本発明の範囲を限定する意図はない。その他の目的、観点、及び実施例は、この明細書の考えに基づいて当業者に存在し、本請求の範囲により定義されたように本発明の精神の範囲内に包含される。種々の置き換え、及び変更が、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく本明細書に開示された本発明に対し行うことができることは、当業者に容易に明らかとなろう。本明細書に示例的に記載されている本発明が、何らかの要素又は要素群、又は制限又は制限群のない状態で行うことができ、それは、本明細書に必須うとして特に開示されていない。従ってたとえば、本明細書の各例において、本発明の例又は試料において、いずれかの用語「含む」「とくに成る」及び「成る」は、明細書における他の2の用語のいずれかと置き換えることができる。さらに「含む(comprising)」、「含む(including)」、「含む(containing)」などは、拡張的に、そして限定することなく読み出すことができる。本明細書に適切に例示的に記載されている方法(methods)、及び方法(processes)が、異なる手順の工程にて行うことができ、そしてこれらは、本明細書又はクレームに明示された手順の工程に制限する必要がない。さらに使用される明細書として、及び添付されたクレームにおいて、通常形式「a」、「an」及び「the」は、その他の点で内容が明らかに示されない限り、複数の引用を含む。従ってたとえば、「宿主細胞」の引用は、こうした宿主細胞の複数性(たとえば、培養又は集団)などを含む。本特許は、明細書に特に開示される特異的な例、又は実施例、或いは方法に限定されると解釈される状況下ではない。発言が、出願者により応答書面で、特別に、そして表現的に承認、又は保留なく採用されないかぎり、本特許は、特許及び商標局の審査官、又は他の局員又は従業員により行われる何らかの発言により限定されると解釈される状況下ではない。

20

30

#### 【0272】

用いられた用語及び表現は、表現する語とし、そして限定されないものとして使用されそして明示され、そして記載されるいずれかと等しい特徴、又はその1部を排除するためのこうした用語及び表現の使用を意図するものでないが、種々の変更が、クレームとして本発明の範囲内である可能性が認められる。

#### 【0273】

好ましい例及び所望による特性、修飾及び開示された本明細書の考えの変動が、当業者により用いられ、そしてそうした修飾及び変動が、添付クレームにより定義されたように本発明の範囲内と考えられる。

本発明は、本明細書に広く、一般的に記載されている。さらに遺伝子開示に含む狭い種、及び亜遺伝子グループのそれぞれが本発明の1部を形成する。切り出された材料であるかどうかに関係なく、特に本明細書に引用され、属から主題を条件又は負に限定して取り出した本発明の遺伝子記載を含む。

#### 【0274】

他の例は、以下のクレームの範囲内である。加えて本発明の特長又は観点が、当業者は、本発明がこれにより個々のメンバーの何れかに関し記載され、又はMarkush グループ

40

50

のめんばーのサブグループに関し記載されている。

【図面の簡単な説明】

【0275】

【図1】図1は、3T3 L1の前駆脂肪細胞を脂肪細胞に変換した後に誘導される低分子量タンパク質の2次元電気泳動(2-DE)法による分離を示す。前駆脂肪細胞又は脂肪細胞(分化後8日目)からの等量のタンパク質を、2-DEにより分離し、銀にて染色した。脂肪細胞に存在するが、前駆脂肪細胞に存在しないことを示しているタンパク質を、矢印が示している。

【図2】図2は、マウスFALP(Genbank accession number AY079153),現在の指定マウスFALP-aのヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す。アミノ酸配列は、最も長いオープン・リーディング・フレームから誘導される。アミノ酸の配列決定により決定される2のトリプシンのペプチドに対するアミノ酸配列が、重要である。38と61の間の中核となるアミノ酸残基が、TmPred programにより明示されるように、提示される疎水性膜貫通ドメインを示している。

【図3】図3は、3T3 L1細胞株の分化誘導中、FALPの時間依存発現を示している。細胞を、10%のFCSを伴うDMEMにおいて増殖した。密集の(confluent)前駆脂肪細胞(日0)を、方法に記載されているように、分化混合物に暴露した。指定された時間点で、細胞から調製された総量10 $\mu$ gのRNAを、マウスのFALP及びアジポネクチン及び18S のためノーザン・ブロット分析にかけた。

【図4】図4は、FALP mRNA発現の組織分布を示している。ノーザン・ブロット分析を、明示されているようにマウスの種々の組織から誘導されるRNAにて行った。マウスFALPの全長のcDNAを、プローブとして使用した。

【図5】図5は、ヒトの脂肪組織からFALP遺伝子の2のイソ型のクローニングを示す。ヒトの脂肪組織から精製された全RNAを鋳型として使用し、逆転写によりcDNAを生成した。次ぎにそのcDNAをPCR分析のため鋳型として使用した。センス及び抗センスプライマーを、方法に記載のように指定した。レーン1:1kbプラスDNAラダー。レーン2:プライマーとして2の「ゲスマー(guessmer)」を使用するPCR。レーン3:製造者の指示当たりとして(Invitrogen)として上流の特異的プライマーとしてセンス「ゲスマー(guessmer)」を、そして下流のプライマーとしてGeneRacerTM3'プライマーを使用するPCR。

【図6】図6は、ヒトのFALP $\alpha$ 及びヒトのFALP $\beta$ の遺伝子構成体、及び転写体を示している。紙面上部は、ヒトの脂肪組織からクローンされる2のFALPアイソフォームの核酸配列、及び演繹されたアミノ酸配列を示している。下線の文字は、両方のアイソフォームにより共有されるヌクレオチド及びアミノ酸配列である。31と61との間の中核となるアミノ酸残基は、断定される疎水性膜貫通領域を示している。下部のグラフは、ヒトのFALPの遺伝子構造体を示している。 $\alpha$ アイソフォームに対し、イントロン、及びイントロンIIが、それぞれ $\sim 7.5$ kb、と $\sim 6.0$ kbである。 $\beta$ アイソフォームに対するイントロンIIは、 $\sim 8.0$ kbである。

【図7】図7は基礎的、そしてインスリンにて処理された細胞におけるFLAGにてタグ化されたFALPの免疫局在化を示している。A:分化誘導(B及びC)から6日後で、COS7細胞(A)又は3T3 L1脂肪細胞が、Fugene 6(Roche)を使用し、プラスミドpC-FALP-Fにてトランスフェクトし、そして0.1%のFBSを含むDMEMにてさらに48時間増殖した。その細胞は、50nMのインスリンにて15分間(C)処理するか、又は未処理(A及びB)のものである。メタノール/アセトンにて2分間固定した後、その試料を、マウスの抗-FLAGモノクローナル抗体(27 $\mu$ g/ml)、及びcy3-結合ヤギ抗マウス・ポリクローナル抗体(1:500)にて逐次染色され、さらに蛍光顕微鏡下により視覚化された。FALPの発現は、主に核周囲の領域で簡単な構造に制限され、そしてインスリンと3T3 L1の脂肪細胞との処理の後に、細胞質全体にわたる多くの別々のスポットに再分散された。



【図 1】

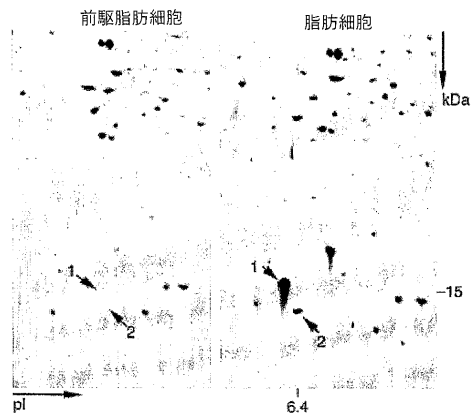


Figure 1

【図 2】

```
gnaaaaaagccacagtc
atg gcc aac ggg acc gac gcc tct gtc ccg ctc acc agc
M A N G T D A S V P L I S
tat gag tat tac ctg gac tac ata gac ctc att cct gtg
Y E Y Y L D Y I D L I P V
gac gag aag aag ctg aca gcc aac aag cat tcc att gtc
D E K K L K A N K H S I Y
ctc ttt ctc atc atc gcc ctg tgg ttg agc ctg gct acc
I A L W L S L A T F V V L
ttc gtg ctg ctg ctc tac atg tcc tgg tgg ggc tcc
L F L I L I Y M S W S G S
cca cag atg aag aac agt ccc can ccc cag cca ata tgt
P Q M R H S P Q P Q P I C
tca tgg act cac agc ttc aac ctc cct ctg tgc ctc cgg
S W T H S F N L P L C L R
agg gcc tcc ctg cag aca aca gag gag cca gga agg aga
R A S L Q T T E E P G R R
gct ggc act gac cag tgg tta acg cag cag agt cct tct
A G T D Q W L T Q Q S P S
gcc tca gcc ccg ggg ccc ctg gct ctc ccc tag gaaccaggtcca
A S A P G P L A L P
ggatgaggtccacaggccatcagctggcctcacactcaagCagtggtagcctgg
agacagagctgtcaccctgttagacggatgagccagagagccagtcgagctca
gcnaacgggtgaactccanccacccaggcagctacgtcttttttagggccgttta
caatggccttgatatagcaggaactgaccgggacannaccnagtttacaaga
ggaccatcacacattgtagtgacgttaggtgacggagctgccctggcaca
gctgtctctgttgagcagccttagcctgcttgccttaccattgctttgggggt
acacagguaatanaatgtganntaggatnaaaaaa
```

Figure 2

【図 3】

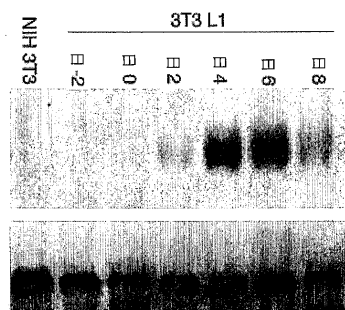


Figure 3

【図 5】

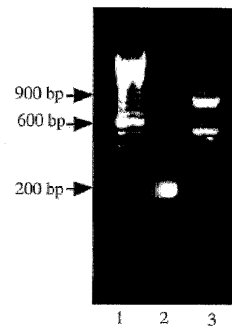


Figure 5

【図 4】

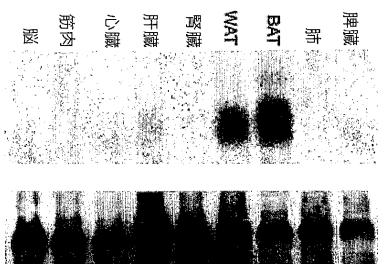


Figure 4

【图 7】

**Figure 7**

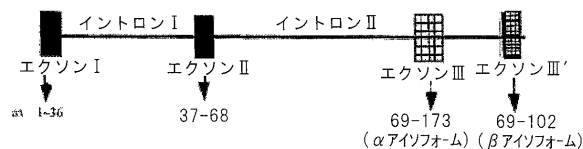


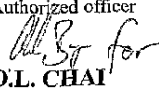
Figure 6

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NZ03/00039

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| Int. Cl. <sup>7</sup> : C07K 14/47, 16/18; C12N 5/20; A61K 38/17, 39/395; A61P 3/04, 3/06, 9/12                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>Derwent, GenPept, PDB, PIR, PRF, RefSeq, Swiss-Prot, TrEMBL<br>SEQ ID NOs: 11, 14, 17, 20                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                         | Relevant to claim No.                                                                                                                                   |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | THE RIKEN GENOME EXPLORATION RESEARCH GROUP PHASE II TEAM <i>et al.</i> , "Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection", Nature (2001), vol. 409, no. 6821, pages 685-690 | 1-30, 36-37, 47-51                                                                                                                                      |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | & GenPept accession number BAB23071, submitted 10 July 2000<br>100% identity to human FALPα                                                                                                |                                                                                                                                                         |
| P, X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | & Swiss-Prot accession number Q9D159, submitted 1 October 2002                                                                                                                             |                                                                                                                                                         |
| P, X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | & RefSeq accession number NP_084120, submitted 18 December 2002                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| Date of the actual completion of the international search<br>8 May 2003                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                            | Date of mailing of the international search report<br>16 MAY 2003                                                                                       |
| Name and mailing address of the ISA/AU<br>AUSTRALIAN PATENT OFFICE<br>PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA<br>E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au<br>Facsimile No. (02) 6283 3929                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                            | Authorized officer<br><br>O.L. CHAI<br>Telephone No : (02) 6283 2482 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NZ03/00039

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                |                       |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
| X                                                     | WO 99/53051 A2 (GENSET), 21 October 1999<br>See Claim 3 and SEQ ID NO: 884, 100% identity to N-terminal region of human FALP                                                                                                                   | 1-30, 36-37,<br>47-51 |
| P, X                                                  | XU A. <i>et al.</i> , "Identification of novel putative membrane proteins selectively expressed during adipose conversion of 3T3-L1 cells", Biochemical and Biophysical Research Communications (2002), vol. 293, no. 4, pages 1161-1167       |                       |
| X                                                     | & GenPept accession number AAL86908, submitted 13 February 2002<br>100% identity to human FALP $\beta$                                                                                                                                         | 1-30, 36-37,<br>47-51 |
| X                                                     | & GenPept accession number AAL80042, submitted 15 February 2002<br>100% identity to human FALP $\alpha$                                                                                                                                        | 1-30, 36-37,<br>47-51 |
| X                                                     | & GenPept accession number AAL80043, submitted 15 February 2002<br>100% identity to mouse FALP $\alpha$                                                                                                                                        | 1-30, 36-37,<br>47-51 |
| X                                                     | & GenPept accession number AAL80044, submitted 15 February 2002<br>100% identity to mouse FALP $\beta$                                                                                                                                         | 1-30, 36-37,<br>47-51 |
| P, X                                                  | & Swiss-Prot accession number Q8TCY5, submitted 1 October 2002                                                                                                                                                                                 |                       |
| P, X                                                  | GARDINER K. <i>et al.</i> , "Annotation of Human Chromosome 21 for Relevance to Down Syndrome: Gene Structure and Expression Analysis", Genomics (2002), vol. 79, no. 6, pages 833-843                                                         |                       |
| X                                                     | & GenPept accession number AAL51048, submitted 3 December 2001<br>100% identity to human FALP $\alpha$                                                                                                                                         | 1-30, 36-37,<br>47-51 |
| A                                                     | & GenPept accession number AAL51049, submitted 3 December 2001<br>100% identity to C-terminal region of human FALP $\alpha$                                                                                                                    |                       |
| P, X                                                  | MAMMALIAN GENE COLLECTION (MGC) PROGRAM TEAM, "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences", Proceedings of the National Academy of Sciences USA (2002), vol. 99, no. 26, pages 16899-16903 |                       |
| P, X                                                  | & GenPept accession number AAH27543, submitted 8 April 2002                                                                                                                                                                                    |                       |
| P, X                                                  | & Swiss-Prot accession number Q9D159, submitted 1 October 2002                                                                                                                                                                                 |                       |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NZ03/00039

**Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos :  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos : (in part) 1-8, 13-33, 35-51  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
These claims define FALPs ("FAt tissue-specific Low molecular weight Proteins"), which is merely a vague and arbitrary designation that is not restricted to the proteins of the present invention and may encompass proteins that are not disclosed. These FALPs are considered to be economically unsearchable, therefore the search was restricted to SEQ ID NOs: 11, 14, 17 and 20.
  
3. ☐ Claims Nos :  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

**Box II** Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/NZ03/00039

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent Document Cited in<br>Search Report |         |    |          | Patent Family Member |         |    |              |
|-------------------------------------------|---------|----|----------|----------------------|---------|----|--------------|
| WO                                        | 9953051 | AU | 30501/99 | CA                   | 2319089 | EP | 1068312      |
|                                           |         |    |          |                      |         |    | END OF ANNEX |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl.                     | F I                 | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|---------------------|-------------|
| <b>A 6 1 P</b> 3/06 (2006.01)   | A 6 1 P 3/06        | 4 C 0 8 4   |
| <b>A 6 1 P</b> 3/10 (2006.01)   | A 6 1 P 3/10        | 4 C 0 8 6   |
| <b>A 6 1 P</b> 9/12 (2006.01)   | A 6 1 P 9/12        | 4 H 0 4 5   |
| <b>A 6 1 P</b> 43/00 (2006.01)  | A 6 1 P 43/00 1 1 1 |             |
| <b>C 0 7 K</b> 14/47 (2006.01)  | C 0 7 K 14/47       |             |
| <b>C 0 7 K</b> 16/18 (2006.01)  | C 0 7 K 16/18       |             |
| <b>C 1 2 N</b> 1/15 (2006.01)   | C 1 2 N 1/15        |             |
| <b>C 1 2 N</b> 1/19 (2006.01)   | C 1 2 N 1/19        |             |
| <b>C 1 2 N</b> 1/21 (2006.01)   | C 1 2 N 1/21        |             |
| <b>C 1 2 P</b> 21/02 (2006.01)  | C 1 2 P 21/02 C     |             |
| <b>C 1 2 Q</b> 1/02 (2006.01)   | C 1 2 Q 1/02        |             |
| <b>C 1 2 Q</b> 1/68 (2006.01)   | C 1 2 Q 1/68 A      |             |
| <b>G 0 1 N</b> 33/15 (2006.01)  | G 0 1 N 33/15 Z     |             |
| <b>G 0 1 N</b> 33/50 (2006.01)  | G 0 1 N 33/50 Z     |             |
| <b>G 0 1 N</b> 33/53 (2006.01)  | G 0 1 N 33/53 D     |             |
| <b>G 0 1 N</b> 33/566 (2006.01) | G 0 1 N 33/53 M     |             |
| <b>C 1 2 N</b> 15/02 (2006.01)  | G 0 1 N 33/566      |             |
| <b>C 1 2 N</b> 5/10 (2006.01)   | C 1 2 N 15/00 C     |             |
| <b>A 6 1 K</b> 38/00 (2006.01)  | C 1 2 N 5/00 A      |             |
| <b>C 1 2 P</b> 21/08 (2006.01)  | C 1 2 N 5/00 B      |             |
|                                 | A 6 1 K 37/02       |             |
|                                 | C 1 2 P 21/08       |             |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 クーパー, ガース ジェイムス スミス

ニュージーランド国, オークランド, ポンソンビー, クランマー ロード 2

(72)発明者 シュー, エイミン

ニュージーランド国, オークランド, マウント イーデン, ベルビュー ロード 34ビー

(72)発明者 ワン, ユー

ニュージーランド国, オークランド, マウント イーデン, ベルビュー ロード 34ビー

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36  
DA37 DA77 FB02 FB03  
4B024 AA01 AA11 BA44 BA53 BA80 CA04 CA07 CA09 CA12 CA20  
DA02 EA04 GA03 GA13 HA11 HA13 HA14 HA17  
4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ53 QQ61 QQ79  
QQ89 QQ91 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR48 QR56 QR62  
QR77 QR80 QS16 QS25 QS33 QS34 QS36 QX01 QX02  
4B064 AG01 AG27 CA01 CA10 CA19 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA90X AA91X AA91Y AA93Y AB01 AB05  
AC14 BA02 BA05 BA08 CA24 CA25 CA43 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA23  
DC50 NA14 ZA421 ZA422 ZA701 ZA702 ZC022 ZC331 ZC332 ZC351

ZC352

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA42 ZA70 ZC02

ZC33 ZC35

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20

EA50 FA71 FA72 FA74



|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | FALP蛋白                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2006502697A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 公开(公告)日 | 2006-01-26 |
| 申请号            | JP2003573025                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 申请日     | 2003-03-03 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 普罗特米克斯公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | - 蛋白拌匀公司Rimitido                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| [标]发明人         | クーパーガースジェイムススミス<br>シュエエイミン<br>ワンユー                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |         |            |
| 发明人            | クーパー, ガース ジェイムス スミス<br>シュエ, エイミン<br>ワン, ユー                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/12 A61P43/00<br>C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15<br>G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N15/02 C12N5/10 A61K38/00 C12P21/08 C12N5/20                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| CPC分类号         | A61K38/00 A61K2039/505 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/12 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/<br>4713                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/12<br>A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02<br>C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.C<br>C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02 C12P21/08                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/<br>DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01<br>4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/<br>CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA13 4B024/HA11 4B024/HA13<br>4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/<br>QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR08<br>4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/<br>QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01<br>4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/<br>CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/<br>AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/<br>AC14 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065/CA44<br>4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/<br>BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/CA23 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA421 4C084/ZA422<br>4C084/ZA701 4C084/ZA702 4C084/ZC022 4C084/ZC331 4C084/ZC332 4C084/ZC351 4C084/ZC352<br>4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/<br>ZA42 4C086/ZA70 4C086/ZC02 4C086/ZC33 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20<br>4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/<br>EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74 |         |            |
| 代理人(译)         | 青木 笃<br>石田 敬<br>西山雅也                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| 优先权            | 60/361152 2002-03-01 US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |

摘要(译)

描述了新的显示出对胰岛素反应的脂肪组织低分子量蛋白质 ( FALP )。

|                                        |                                             |                                |  |                               |  |
|----------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|--|
|                                        |                                             | 特表2006-50265<br>(P2006-502697) |  | (43) 公表日 平成18年1月26日(2006.1.2) |  |
| (51) Int. Cl.                          | F I                                         | テーマコード (参考)                    |  |                               |  |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01)                | C 1 2 N 15/00 Z N A A                       | 2 G O 4 5                      |  |                               |  |
| A 6 1 K 31/7088 (2006.01)              | A 6 1 K 31/7088                             | 4 B O 2 4                      |  |                               |  |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01)                | A 6 1 K 45/00                               | 4 B O 6 3                      |  |                               |  |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01)                | A 6 1 K 48/00                               | 4 B O 6 4                      |  |                               |  |
| A 6 1 P 3/04 (2006.01)                 | A 6 1 P 3/04                                | 4 B O 6 5                      |  |                               |  |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 72 頁) 最終頁に続       |                                             |                                |  |                               |  |
| (21) 出願番号 特願2003-573025 (P2003-573025) | (71) 出願人 501487003                          |                                |  |                               |  |
| (86) (22) 出願日 平成15年3月3日 (2003.3.3)     | プロテミックス コーポレイション リミテッド                      |                                |  |                               |  |
| (85) 翻訳文提出日 平成16年11月1日 (2004.11.1)     | ニュージーランド国、オークランド、クイーン ストリート 1 5 1 , レベル 2 8 |                                |  |                               |  |
| (86) 国際出願番号 PCT/NZ2003/000039          | (74) 代理人 100099759                          |                                |  |                               |  |
| (87) 国際公開番号 W02003/074559              | 弁理士 青木 篤                                    |                                |  |                               |  |
| (87) 国際公開日 平成15年9月12日 (2003.9.12)      | (74) 代理人 100077517                          |                                |  |                               |  |
| (31) 優先権主張番号 60/361,152                | 弁理士 石田 敬                                    |                                |  |                               |  |
| (32) 優先日 平成14年3月1日 (2002.3.1)          | (74) 代理人 100087413                          |                                |  |                               |  |
| (33) 優先権主張国 米国 (US)                    | 弁理士 古賀 哲次                                   |                                |  |                               |  |
|                                        | (74) 代理人 100082898                          |                                |  |                               |  |
|                                        | 弁理士 西山 雅也                                   |                                |  |                               |  |
|                                        |                                             | 最終頁に続く                         |  |                               |  |
| (54) 【発明の名称】 F A L P タンパク質             |                                             |                                |  |                               |  |