

申請日期	P0.10.16
案 號	P0125551
類 別	C12N 15/53, 9/10, 51/19, 5/10, 42P 2/68, 607K 16/46, C12Q 1/48

A4

C4

(以上各欄由本局填註) G01N 33/53, 33/573, 33/543, 33/56, A61K 38/45, 48/100, A61P 36/30

發明
新 型 專 利 說 明 書

一、發明 新 型 名 稱	中 文	新穎酵素基因及其表現產物
	英 文	NOVEL ENZYME GENE AND EXPRESSION PRODUCT THEREOF
二、發明 創 作 人	姓 名	1.藤原 力 TSUTOMU FUJIWARA 2.岡本 考史 TAKASHI OKAMOTO 3.新美 正史 MASASHI NIIMI 4.急式 弘之 HIROYUKI KYUSHIKI
	國 籍	1.日本 2.日本 3.日本 4.日本
三、申請人	住、居所	1.日本德島縣鳴門市鳴門町高島字中島436 2.日本兵庫縣姫路市北條宮之町227-102 3.日本德島縣德島市川内町金岡5-1-107 4.日本德島縣德島市川内町鶴島377-1-1301
	姓 名 (名 稱)	日商大塚製藥股份有限公司 OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
三、申請人	國 籍	日本
	住、居所 (事務所)	日本國東京都千代田區神田司町2-9
三、申請人	代 表 人 姓 名	通口 達夫 TATSUO HIGUCHI

申請日期	
案 號	
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明人 創作	姓 名	5.山本 惠史 YASUCHIKA YAMAMOTO 6.植山 篤則 ATSUNORI UEYAMA
	國 籍	5.日本 6.日本
	住、居所	5.日本德島縣板野郡北島町鯛濱字西須34-1 6.日本德島縣德島市庄町2-44-1
三、申請人	姓 名 (名 稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝
訂
線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區)	申請專利，申請日期：	案號：	， ☐ 有 ☐ 無主張優先權
日本	2000年6月13日	特願2000-176631	☐ 有 ☒ 無
日本	2000年9月25日	特願2000-290679	☐ 有 ☒ 無

有關微生物已寄存於：

寄存日期：

，寄存號碼：

食品工業發展研究所

2001年10月05日

CCRC940379

五、發明說明(1)

技術範疇

本發明係關於能表現麩胺：果糖-6-磷酸鹽胺移轉酶(後稱"GFAT")活性之新穎酵素基因，及具有該基因所編碼胺基酸序列之新穎蛋白質(酵素)。

背景技藝

GFAT是將果糖-6-磷酸催化轉換成葡萄糖胺-6-磷酸(該步驟是活體中六碳糖胺生物合成作用之速率決定步驟)的重要酵素。近來，McKnight等人已揭示編碼681個胺基酸殘基之人類GFAT基因(McKnight, G. L.等人, J. Biol. Chem., 267, 25208-25212 (1992))。而後，Nishi等人揭示一新穎的人類GFAT基因(美國專利案號5,876,713)。

GFAT活性抑制劑被認為可促進細胞攝入葡萄糖，及降低血液中葡萄糖的含量，因此，該抑制劑被視為可用以治療糖尿病的藥劑。胰島素可促進細胞攝入葡萄糖，而細胞內的葡萄糖經由糖解作用代謝，因此累積產生能量來源的ATP。然而，當攝入過量葡萄糖時，葡萄糖的代謝物，果糖-6-磷酸，會進入六碳糖胺的生物合成作用。藉由GFAT的作用，六碳糖胺生物合成作用中之果糖-6-磷酸會轉換成葡萄糖胺-6-磷酸。

已有報告指出葡萄糖胺-6-磷酸代謝物會避免葡萄糖轉送受體(glucose transporters)轉移至細胞膜上，導致細胞攝入葡萄糖受到抑制(FASEB J., 5, 3031-3036 (1991); Diabetologia, 38, 518-524 (1995); J. Biol. Chem., 266, 10155-10161 (1991); J. Biol. Chem., 266, 4706-4712

五、發明說明 (2)

(1991)；及Endocrinology, 136, 2809-2816 (1995))。

在葡萄糖代謝途徑中，六碳糖胺生物合成途徑被視為在攝入過量葡萄糖時的回饋機制扮演重要的角色。在六碳糖胺代謝途徑中，GFAT是重要的速率決定酵素。已知患有非-胰島素-依賴性糖尿病患者(第二型)之GFAT活性一般較高，有報告指出GFAT活性是造成血液中高葡萄糖含量的原因之一(Diabetes, 45, 302-307 (1996))。

除了人類GFAT (J. Biol. Chem., 267, 25208-25212 (1992)；美國專利案號5,876,713)外，尚有老鼠GFAT，酵母菌GFAT，及大腸桿菌GFAT報導。這些GFATs與人類GFAT的相似程度相當高。然而，目前尚未得知對骨骼肌(是葡萄糖代謝作用的重要組織)具有專一性之新穎GFAT的存在。

分離具GFAT活性之新穎GFAT基因能闡明GFAT在六碳糖胺生物合成作用中所扮演的調節性功能，分離特定表現於組織中的GFAT基因(諸如骨骼肌)能進一步闡明組織中葡萄糖的代謝機制，除此之外，發現抗GFAT蛋白質(該蛋白質具有此種GFAT基因編碼胺基酸序列的表現產物)之抑制活性特定候選化合物可開發新穎作用機制之降血糖藥劑，以預防及治療糖尿病。

鑒於前述，本發明主旨是分離諸如此類之新穎GFAT基因，特別是特定表現於骨骼肌中之GFAT基因。

發明揭示

為達前述目標，本發明發明者已廣泛進行研究，並成功

五、發明說明 (3)

自人類骨骼肌之cDNA庫中選殖出編碼具GFAT活性蛋白質之新穎核苷酸序列的cDNA。有關特定表現於人類骨骼肌及心臟之所要蛋白質及基因，本發明已成功完成選殖。

因此，本發明提供：

(1) 包括下列聚核苷酸(a)、(b)、(c)或(d)之基因：

(a) 編碼SEQ ID NO：1胺基酸序列所組成的聚肽之聚核苷酸，或該聚核苷酸的互補股；

(b) 至少編碼與SEQ ID NO：1胺基酸序列所組成的聚肽之聚核苷酸有98%相似度之聚核苷酸，或該聚核苷酸的互補股；

(c) 編碼刪除、取代、或加成根據(a)胺基酸序列其中一或多個胺基酸，而具GFAT活性之聚肽的聚核苷酸，或該聚核苷酸互補股；或

(d) 至少編碼與根據(a)胺基酸序列所組成的聚肽有98%相似度之聚肽的聚核苷酸，或該聚核苷酸互補股；

(2) 包括下列聚核苷酸(a)或(b)之基因：

(a) SEQ ID NO：2核苷酸序列所組成之聚核苷酸，或該聚核苷酸的互補股；或

(b) 高度嚴苛條件下，與根據(a)核苷酸序列所組成之聚核苷酸雜化的聚核苷酸；

(3) 根據(2)的基因，其包括SEQ ID NO：2之核苷酸序列；

(4) (1)或(2)所列基因表現所產生之基因表現產物；

(5) 包括(1)或(2)所列基因之重組表現載體；

五、發明說明(4)

- (6) 帶有(5)所列重組表現載體之宿主細胞；
- (7) 經(5)所列重組表現載體轉型的轉型細胞；
- (8) 下列(a)、(b)、或(c)所示之蛋白質：
- (a) SEQ ID NO：1胺基酸序列所組成之蛋白質；
- (b) 刪除、取代或加成根據(a)胺基酸序列其中一或多個胺基酸，並具GFAT活性之蛋白質；或
- (c) 至少與根據(a)胺基酸序列98%相似度之胺基酸序列所組成之蛋白質；
- (9) 一種用以治療或預防低血糖症之組合物，其包括以(1)或(2)所列之基因，或(4)所列之基因表現產物為活性成分；
- (10) 一種用以治療或預防低血糖症組合物，其包括以(8)所列蛋白質為活性成分；
- (11) 一種抗體，特別是單株抗體，其可鍵結至任何選自(4)所列基因表現產物、(8)所列蛋白質，及該產物或蛋白質的片段；
- (12) 一種用以篩選可抑制(1)所列基因、(4)基因表現產物、或(8)所列蛋白質酵素活性之候選化合物的方法，該方法包括：(i)在競爭方式下，將(11)所列抗體與含有候選化合物及業經標記之(8)所列蛋白質或該蛋白質部分肽的試驗液體反應；及測定已鍵結至抗體之標記蛋白質或部分肽含量；(ii)同時或依序將含有候選化合物之試驗液體與前述抗體及其他標記抗體反應，該抗體固定在載體物上；並測定在載體物上標記藥劑的活性；或(iii)在(8)所列蛋白質或該

五、發明說明 (5)

蛋白質部分肽與受質反應，及蛋白質或該蛋白質部分肽與受質及候選化合物反應情形下，測定蛋白質或蛋白質部分肽之酵素活性，並比較不同情形下酵素的活性；及

(13) 一種(12)所列篩選方法所採用之篩選套組，其包括測定緩衝液、(8)所列蛋白質或該蛋白質部分肽，及作為受質之果糖-6-磷酸及麩胺。

本發明亦提供：

(14) 定量測定試驗液體中含SEQ ID NO：1胺基酸所組成之蛋白質(後稱“GFAT1L蛋白質”)或該蛋白質片段的方法，該方法包括：以競爭方式，將對抗含有編碼SEQ ID NO：1胺基酸序列聚肽之聚核苷酸或含有由SEQ ID NO：2聚核苷酸基因(後稱“GFAT1L基因”)基因表現產物的抗體，或對抗GFAT1L蛋白質或該蛋白質片段(例如部分肽)之抗體與試驗液體與標記GFAT1L蛋白質或蛋白質片段反應；及測定鍵結至抗體上標記GFAT1L蛋白質或蛋白質片段的含量；

(15) 測定試驗液體中本發明蛋白質或蛋白質片段之定量方法，該方法包括：將試驗液體與(14)所列已固定至載體物上抗體反應，及同時或依序與對抗另一個標記GFAT1L蛋白質的抗體反應；及測定在載體物上標記藥劑之活性；

(16) 一種藥劑，特別是係用以治療及預防糖尿病的藥劑，其包括對抗GFAT1L蛋白質的抗體(較佳是對抗具有中和GFAT1L蛋白質活性之活性GFAT1L蛋白質)；及

(17) 一種篩選抑制GFAT酵素活性化合物之方法，該方

五、發明說明(6)

法包括將GFAT1L蛋白質或蛋白質片段與受質反應情形，及將GFAT1L蛋白質或蛋白質片段與受質及試驗化合物反應情形下，測定蛋白質或片段之酵素活性，並比較個別情形下酵素活性。

本發明亦提供：

(18) 一種反向DNA，其包括互補於或實質互補於GFAT1L基因之DNA，並具抑制該DNA表現作用之核苷酸序列；

(19) 一種GFAT1L基因反向DNA，其包括實質互補於GFAT1L基因DNA的核苷酸序列，其中該核苷酸序列完全互補於DNA，或與互補DNA至少約98%(較佳者為至少約99%)相似度之核苷酸序列；及

(20) 一種醫藥組合物，特別是係用以治療及預防糖尿病的醫藥組合物，其包括GFAT1L基因的反向DNA。

在本發明說明書中，胺基酸、核苷酸序列，及核酸縮寫係根據IUPAC-IUB [IUPAC-IUB生物命名信息，Eur. J. Biochem., 138; 9 (1984)]，”製備含有核苷酸序列或胺基酸序列說明指引”(日本專利局印行)，及技藝中慣用符號。

圖式簡要說明

圖1是以根據實例2所獲之RT-PCR產物進行瓊脂糖膠片電泳分析後，所顯示本發明基因在器官中表現型態的照片。

圖2所示是根據實例4，以F-6-P為受質時，所得本發明GFAT1L酵素特徵，GFAT活性之Km及抑制型態。

五、發明說明 (7)

圖3所示是根據實例4，以麩胺為受質時，所得本發明GFAT1L酵素特徵，GFAT活性之Km及抑制型態。

圖4所示是根據實例4中GFAT1L之酵素反應曲線。

本發明最佳執行模式

後文將更詳細說明本發明基因及蛋白質。

本發明蛋白質特徵是其含有SEQ ID NO：1胺基酸序列，或實質上與SEQ ID NO：1胺基酸序列相似的胺基酸序列，例如本發明蛋白質為源自人類細胞(特別是人類橫紋肌細胞)或人類組織(特別是骨骼肌或心臟)之蛋白質。另一種情況是本發明蛋白質可為合成的蛋白質。

實質上與SEQ ID NO：1相似的胺基酸序列之實例包括具有與SEQ ID NO：1胺基酸序列至少約98%相似度之胺基酸序列，較佳至少約99%，及刪除、取代、或加成SEQ ID NO：1胺基酸序列其中一或多個胺基酸者。實質上與SEQ ID NO：1胺基酸序列相同之胺基酸序列組成之蛋白質實例包括實質上與SEQ ID NO：1胺基酸序列相同之胺基酸序列及實質與本發明SEQ ID NO：1相同胺基酸序列組成之蛋白質的等量相同GFAT活性之蛋白質。特定實例包括後述GFAT1L基因同質基因產物(GFAT1L同質基因包括異體基因)，及具有與哺乳類相同GFAT活性之蛋白質，諸如人類、馬、羊、牛、狗、猴、貓、熊、鼠及兔。

本專利說明書所用“實質等量”係指蛋白質GFAT活性在特徵上(例如生理、化學或醫藥上)彼此相同。因此，蛋白質與蛋白質間的定量參數會有不同，諸如GFAT活性及分

五、發明說明 (8)

子量。

利用已知的方法可測定GFAT活性，例如Marshall等人揭示的方法(Marshall等人，J. Biol. Chem., 266, (8), 4706-4712 (1991))。

本專利說明書所用“GFAT活性”係指在後述實例中，以果糖-6-磷酸為受質時，UDP-N-乙醯基葡萄糖胺抑制GFAT活性之混合抑制型態中所呈現的GFAT活性。因此，GFAT活性明顯與拮抗抑制型態所示之GFAT活性不同。後文中，具有本發明特定混合抑制型態之GFAT活性簡稱為“GFAT活性”。

刪除、取代或加成前述胺基酸位置之胺基酸是不受限制的，只要含有所得修飾胺基酸序列之蛋白質仍呈現GFAT活性即可。同理，可任意刪除、取代或加成胺基酸數目，只要所得胺基酸序列所組成之蛋白質具有GFAT活性即可。

本發明基因編碼對骨骼肌及心臟具有專一性之蛋白質(GFAT1L蛋白質)，其由699胺基酸殘基之SEQ ID NO：1胺基酸序列所組成，該基因特別實例包括後述實例中以所謂“GFAT1L”之PCR產物的DNA序列推論出之基因，該基因的核苷酸序列如SEQ ID NO：2所示，含有2097個核苷酸。

本發明GFAT1L基因業經證實具有新穎核苷酸序列，其在McKnight等人選殖之GFAT基因(McKnight, G. L.等人，J. Biol. Chem., 267, 25208-25212 (1992))的第684核苷

五、發明說明(9)

酸及第685核苷酸位置處插入54個核苷酸。

因此，本發明基因編碼蛋白質之胺基酸序列在McKnight等人所揭示基因推論之胺基酸序列的第228胺基酸及第229胺基酸位置處多插入了18個胺基酸。

本發明蛋白質具有GFAT活性，及可作為(例如)治療或預防改善低血糖症的藥劑。抗本發明基因反向DNA之抗體或抗該基因表現產物之抗體預期具有治療糖尿病的功效，及該抗體可作為篩選治療糖尿病藥劑的候選化合物之用。

本專利說明書所用”基因”包括雙股DNA及單股DNA，諸如雙股DNA之正向股或反向股。基因的長度不受特別的限制。因此，除非特別聲明，本發明基因(DNA)包括含有人類基因體DNA之雙股DNA、含有cDNA之單股DNA(正向股)、含有互補正向股之單股DNA(反向股)及其片段。

本發明基因(DNA)可含有引導序列、編碼區域及非基因序列(exon)及基因序列(intron)。聚核苷酸實例包括RNA及DNA，DNA包括cDNA、基因體DNA，及合成DNA。具有特定胺基酸序列之聚肽包括聚肽片段、聚肽同質體、聚肽衍生物，及聚肽變體。

基因變體的實例包括天然存在的對偶基因變體、非天然存在的變體，及進行刪除、取代、加成及插入作用之變體。此種變體所編碼之聚肽的功能實質上並未改變。

聚肽包括具有至少對偶基因有98%相似度的聚肽(較佳者為99%)、聚肽同質體，或天然存在之聚肽變體。

本發明基因表現產物之生物活性(例如GFAT活性)是(例

五、發明說明 (10)

如)將果糖-6-磷酸催化轉換成葡萄糖胺-6-磷酸的作用，GFAT活性亦可為增加人類或哺乳動物血液中葡萄糖含量的作用。利用FASTA程式採用之序列分析軟體可測定分析有關DNA及聚肽之相似度(Clustal, V., Methods Mol. Biol., 25, 307-318 (1994))。

本發明基因變體包括造成胺基酸休止或保守取代作用之變體；換言之，變體特徵是變體核苷酸序列所編碼之胺基酸殘基並未改變。

保守取代胺基酸殘基的類型如下所述。

原有胺基酸殘基	保守取代胺基酸殘基
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn或Gln
Ile	Leu或Val
Leu	Ile或Val
Lys	Arg或Glu
Met	Leu或Ile
Phe	Met, Leu或Tyr

五、發明說明 (11)

Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp或Phe
Val	Ile或Leu

通常，一或多個密碼所編碼之半胱胺酸殘基會造成特定聚肽雙硫鍵，因此，刪除半胱胺酸殘基，及以其他胺基酸殘基取代該殘基。

根據前述所列，比較保守取代胺基酸殘基之情形，當任意取代胺基酸殘基時，所得蛋白質特徵稍微改變。

通常取代作用的類型認為會產生最大改變之蛋白質特徵如下：

a) 疏水性胺基酸殘基(諸如白胺醯基、異白胺醯基、苯基丙胺醯基、纈胺醯基或丙胺醯基)取代親水性胺基酸殘基(諸如絲胺醯基或蘇胺醯基)；

b) 任何其他胺基酸殘基取代半胱胺醯基或脯胺醯基；

c) 具有負電價支鏈的胺基酸殘基(諸如麩胺醯基或天冬胺醯基)取代正電價支鏈胺基酸殘基(諸如離胺醯基、精胺醯基或組織胺醯基)；及

d) 不具支鏈的胺基酸殘基(諸如甘胺醯基)取代具有非常大支鏈的胺基酸殘基(諸如苯基丙胺醯基)。

本發明基因及基因產物提供闡述、瞭解、診斷、預防及治療糖尿病之資訊及方法，本發明基因適以開發能抑制或誘發基因表現之新穎藥劑，以作前述治療用。偵測個體或

五、發明說明 (12)

組織中抑制或誘發本發明基因表現之基因產物的表現，或偵測突變作用(刪除或點突變作用)或不正常基因表現適以闡述或診斷糖尿病。

編碼前述修飾胺基酸序列之本發明基因可用以偵測編碼非-修飾胺基酸序列之本發明基因。

本發明基因之特定實例包括(但非侷限於)由編碼SEQ ID NO: 1胺基酸序列蛋白質的核苷酸序列所組之GFAT1L基因。本發明基因亦包括GFAT1L基因同質體。

本發明所用"GFAT1L基因"同質體係指視為一系列基因群之相關基因，該基因具有與本發明GFAT1L基因序列(或基因產物)相似的序列，及在前述結構特徵、基因表現形式，及前述生物功能上與GFAT1L基因相似者(例如使用FASTA程式所得之同質體)。GFAT1L基因同質體的實例包括具有至少與編碼胺基酸序列SEQ ID NO: 1所組蛋白質之核苷酸序列有98%相似度之聚核苷酸，較佳者為至少99%相似度，以及互補該聚核苷酸之聚核苷酸。

藉由(例如)突變作用或轉譯作用後的修飾作用可天然修飾前述胺基酸序列(變體)，天然存在基因(例如本發明GFAT1L基因)可以人工方式修飾之。本發明包括所有具有前述特徵之修飾基因，不論造成或採用的修飾作用或變化作用為何。本發明基因包括編碼SEQ ID NO: 1胺基酸序列基因之對偶基因。

前述人工方法實例包括基因工程方法，諸如特定位置突變作用 [Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382

五、發明說明 (13)

(1987); Methods in Enzymology, 100, 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984); Zoku Seikagaku Jikken Koza 1 "Idenshi Kenkyu-ho II," Nippon Seikagakkai出版, 105頁(1986)]; 化學合成方法, 諸如磷酸三酯方法及磷酸amidite方法[J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967); J. Am. Chem. Soc., 91, 3350(1969); Science, 150, 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981); Tetrahedron Lett., 24, 245 (1983)]; 及前述方法組合。更詳細言之, 利用phosphoramidite方法或三酯方法之化學合成作用可完成DNA的合成作用。另一種方式是, 利用市售自動化寡核苷酸合成裝置合成DNA。適當的條件下, 鏈合合成互補股可自單股產物化學合成出雙股DNA, 或是使用適當的引子序列及DNA聚合酶添加互補股以合成雙股DNA。

本發明基因特定實例包括具有SEQ ID NO: 2核苷酸序列之基因。核苷酸序列(編碼區域)為相對於SEQ ID NO: 1胺基酸序列之個別胺基酸殘基的密碼組合實例, 本發明基因非限於具有此種特定核苷酸序列的基因; 本發明基因可具有選自相對個別胺基酸殘基之任意密碼組合的核苷酸序列, 密碼的選擇係利用慣用的方法完成, 例如, 選擇密碼可考慮宿主使用密碼出現的頻率[Nucleic Acids Res., 9, 43 (1981)]。

如前所述, 本發明基因包括與SEQ ID NO: 2核苷酸序列一致相似之核苷酸序列之基因。

五、發明說明 (14)

SEQ ID NO: 2核苷酸序列一致相似之核苷酸序列所組之基因係指至少由與SEQ ID NO: 2核苷酸序列98%相似度之核苷酸序列所組之核苷酸序列，較佳者為99%，或是與該聚核苷酸互補之聚核苷酸。

基因實例包括在高度嚴苛條件下(例如，60℃下，含有0.1% SDS之0.2×SSC，或60℃下，含有0.1% SDS之0.1×SSC)，與SEQ ID NO: 2雜化之核苷酸序列的基因。

根據本專利說明書所揭示的基因特定實例中的序列資訊，可利用慣用基因工程方法輕易的製備或獲得本發明基因[參考分子選殖第二版，冷泉灣實驗室1989年印行；Zoku Seikagaku Jikken Koza “Idenshi Kenkyu-ho I, II, III,” Nippon Seikagakkai出版(1986)]。

明確言之，利用慣用方法，從能表現本發明之適當來源中製備cDNA庫，並利用適當的探針或對本發明基因有專一性的抗體，自基因庫中篩選所要的選殖體[例如，Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613 (1981); Science, 222, 778 (1983)]。

前述cDNA來源實例包括表現本發明基因之各種細胞及組織；及源自該等細胞或組織之細胞培養，可利用慣用的方法自此等來源分離RNA或mRNA，純化mRNA，或製備及選殖cDNA。在本發明中，可採用市售的mRNA或cDNA庫(例如Clontech實驗室公司產品)。

自cDNA庫中篩選本發明基因的方法並無特別的限制，且可利用慣用的方法進行篩選工作。篩選方法的特別實例

五、發明說明 (15)

包括對蛋白質具有專一性之免疫篩選方法，自cDNA中篩選出能產生該蛋白質之相對cDNA選殖體的方法；以可與所要DNA序列選擇性鍵結之探針進行之菌斑雜化作用；選殖體雜化作用；及其組合。

篩選時所用的探針係根據本發明基因之核苷酸序列的資訊，以化學合成之DNA，或為所得的本發明基因或基因片段。另一種方式是，篩選時所用的探針係根據本發明基因核苷酸序列之資訊所設計的正向引子或反向引子。

前述探針所用的核苷酸序列為相對SEQ ID NO：2之部分核苷酸序列，其包括至少部分插入序列的54個核苷酸中之15個或更多個的連續核苷酸，較佳為20個連續核苷酸，更佳者為30個連續核苷酸，更佳者為50個連續核苷酸。另一種方式是，具有前述核苷酸序列之陽性選殖體可作為探針之用。

較佳是採用PCR之DNA/RNA增殖作用方法製備本發明基因[Science, 230, 1350 (1985)]。當無法自基因庫中輕易製備全長的cDNA時，較佳採用RACE方法[Rapid amplification of cDNA ends; Jikken Igaku, 12 (6), 35 (1994)]，明確言之，是5'-RACE方法[M. A. Frohman等人，Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8, 8998 (1988)]。

此PCR所用的引子是根據本發明所揭示的GFAT1L基因序列資訊所設計的，可利用慣用的方法合成之。以前述的慣用方法可分離及純化增殖的DNA/RNA；例如膠片電泳作用。

五、發明說明 (16)

利用慣用的方法可測定前述所得之本發明基因或DNA片段之核苷酸序列，諸如二去氧方法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463 (1977)]或Maxam-Gilbert方法[Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)]。另一種方式是，可利用市售的定序套組方便的定出核苷酸序列。

當使用如此所得之部分或全部本發明基因的核苷酸序列時，可專一性偵測個體或各式組織中該基因的表現。

利用慣用方法可偵測基因表現，偵測方法的實例包括RT-PCR之RNA增殖作用[反向轉錄-聚合酶鏈結反應；E. S. Kawasaki等人，RNA增殖作用。在PCR步驟中，方法及應用指引，Academic Press, Inc.，聖地牙哥，21-27 (1991)]，諾氏墨漬分析法[分子選殖，冷泉灣實驗室(1989)]；原位RT-PCR [Nucl. Acids Res., 21, 3159-3166 (1993)]；細胞大小階段之原位雜化作用測定；NASBA方法[核酸序列為基礎之增殖作用，Nature, 350, 91-92 (1991)]，及各式的方法。較佳者，以RT-PCR進行偵測。

PCR所採用的引子並無特別限制，只要該引子可專一性增殖本發明基因即可。該引子係根據本發明基因核苷酸序列資訊設計而成的。引子實例包括含有本發明基因部分核苷酸序列，及通常具有10至35個核苷酸，較佳者約15至30個核苷酸。

本發明基因包括偵測本發明基因時所用之專一性引子及/或專一性探針之DNA片段。

五、發明說明 (17)

DNA 片段是與由 SEQ ID NO : 2 核苷酸序列組成之 DNA 在高度嚴苛條件下進行雜化之 DNA。高度嚴苛條件並無特別限制，只要 DNA 片段可作為引或探針即可。例如，雜化作用可在前述條件下進行；換言之，60℃ 下，含有 0.1% SDS 之 0.2×SSC，或 60℃ 下，含有 0.1% SDS 之 0.1×SSC。

藉由使用本發明基因，以慣用遺傳工程技術輕易並穩定的大量製備該基因產物(GFAT1L 蛋白質)或含有該基因產物之蛋白質。

本發明亦提供諸如本發明基因所編碼 GFAT1L 蛋白質之蛋白質；含有製備該蛋白之基因的載體；經該載體轉型的宿主細胞；及培養宿主細胞製備該蛋白的方法。

利用慣用的基因-裂解技術[例如，Science, 224, 1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 5990 (1983)]，根據本發明 GFAT1L 基因核苷酸序列資訊製備本發明蛋白質。

更明確言之，根據下述製備蛋白質：製備能於宿主細胞中表現編碼所要蛋白質的基因之重組 DNA (表現載體)；將 DNA 帶入至宿主細胞內以轉型該細胞；培養所得之轉型細胞；及從培養產物中回收蛋白質。

前述宿主細胞可為原核細胞或真核細胞，原核宿主細胞實例包括廣泛使用的大腸桿菌(*Escherichia coli*)及枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)。較佳者為大腸桿菌，特別佳者

五、發明說明 (18)

是使用大腸桿菌 K-12。真核宿主細胞實例包括脊椎動物細胞及酵母細胞，較佳者為脊椎動物細胞，包括猴COS細胞 [Cell, 23: 175 (1981)]，中國倉鼠卵細胞，及卵細胞株中二氫葉酸還原酶缺失之細胞株 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77: 4216 (1980)]，酵母細胞中較佳實例包括酵母菌屬細胞。上述實例的宿主細胞並無限制。

當宿主為原核細胞時，需使用可在宿主細胞複製之載體。較佳的載體包括表現質體，其在本發明基因上方處含有啟動子，SD (Shine-Dalgarno)序列，及蛋白質合成作用時所需之起始密碼(例如ATG)，以便該基因可在宿主細胞中表現。通常，源自大腸桿菌之質體(諸如pBR322，pBR325，pUC12或pUC13)是廣泛使用的前述載體。這些實例並無限制，其他各式載體亦可使用。表現基因之市售源自大腸桿菌載體實例包括 pGEX-4T (Amersham Pharmacia Biotech的產品)；pMAL-C2及pMAL-P2 (New England Biolabs的產品)；pET21及pET21/lacq (Invitrogen的產品)；及pBAD/His (Invitrogen的產品)。

當以脊椎動物細胞為宿主所用之表現載體實例所包括之載體，需在欲表現本發明基因上方處含有啟動子、RNA分解位置、聚腺酸化位置及轉錄作用終止序列，倘有需要，載體得含有複製原。表現載體之特別實例包括pSV2dhfr，其具有SV40之起始啟動子 [Mol. Cell. Biol., 1: 854 (1981)]。除此之外，可使用各式市售已知的載體。用以表現基因之市售源自脊椎動物細胞載體包括動物細胞載體(諸

五、發明說明 (19)

如 pEGFP-N 及 pEGFP-C (Clontech 的產品)，pIND (Invitrogen 的產品)，及 pcDNA3.1/His (Invitrogen 的產品)；及昆蟲細胞載體(諸如 pFastBac HT (GibcoBRL 的產品)，pAcGHLT (PharMingen 的產品)，及 pAc5/V5-His，pMT/V5-His，及 pMT/Bip/V5-his (Invitrogen 的產品)。

當以酵母細胞為宿主時，表現載體之特別實例包括 pAM82，其含有相對酸性磷酸酶基因之啟動子[Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80: 1 (1983)]。酵母細胞表現載體之市售商品實例包括 pPICZ (Invitrogen 的產品)及 pPICZ α (Invitrogen 的產品)。

所採用的啟動子類型並無特別限制，例如，宿主為 *Escherichia* 屬時，較佳使用色胺酸(trp)啟動子，lpp 啟動子，lac 啟動子，recA 啟動子，或 PL/PR 啟動子。當宿主為 *Bacillus* 屬時，較佳使用例如 SP01 啟動子，SP02 啟動子，或 penP 啟動子。當宿主為酵母菌時，較佳使用例如 pH05 啟動子，PGK 啟動子，GAP 啟動子，或 ADH 啟動子。當宿主為動物細胞時，較佳使用例如源自 SV40 啟動子，反轉錄病毒啟動子，金屬硫蛋白啟動子，熱誘啟動子，site megalovirus 啟動子，或 SR α 啟動子。

一般融合蛋白表現載體較佳為本發明基因之表現載體，融合蛋白表現載體的特別實例包括表現麩胺基硫-S-移轉酶(GST)之融合蛋白基因之 pGEX (Promega 的產品)。

能增進聚肽在宿主細胞中表現及分泌之聚核苷酸序列實例包括分泌序列及導引序列。當使用細菌宿主時，例如，

五、發明說明 (20)

使用標幟序列(六組胺酸標誌)可以純化融合成熟之聚肽。
當宿主為哺乳細胞時，則使用例如紅血球凝集素(HA)。

將所要的重組DNA(表現載體)帶入至宿主細胞內及轉型
宿主細胞的方法並無特別限制，可採用各式慣用的方法。

利用慣用的方法培養因此所得之轉型細胞。經由培養，
表現出所設計基因編碼之本發明標的蛋白，並產生於轉型
細胞內或外(累積及分泌)，或產生在轉型細胞之細胞膜上
。

根據所用之宿主細胞，可從各式傳統之培養液中選用細
胞培養所用的培養液，在適合宿主細胞生長條件下培養細
胞。

倘有需要，可利用各式的分離技術，根據蛋白質的物理
及化學特性，分離及純化因此所得之本發明重組蛋白[參
考”Biochemistry Data Book II,” 1175-1259頁，第一版，
首印，1980年6月23日，Tokyo Kagaku Dojin印行；
Biochemistry, 25, (25), 8274 (1986); Eur. J. Biochem.,
163, 313 (1987)]。

分離技術的特別實例包括一般回復原狀處理、蛋白沉澱
物處理(鹽析)、離心作用、滲透壓電擊方法、超音波、超
過濾作用、分子篩層析法(膠片過濾法)、吸附層析法、離
子交換層析法、親合力層析法、高效液態層析法(HPLC)、
透析法、及其組合。更佳者，可採用含有能與本發明蛋白
專一性鍵結抗體之管柱的親合力層析法。

當設計編碼本發明蛋白之基因時，較佳是使用SEQ ID

五、發明說明 (21)

NO: 2之GFAT1L基因的核苷酸序列，倘有需要，可適當選擇及修飾相對於蛋白胺基酸殘基之密碼來設計該基因。

利用一般化學合成方法，根據SEQ ID NO: 1胺基酸序列製備本發明蛋白質，該合成作用實例包括一般液相方法或固相方法之肽合成作用方法。

肽合成作用方法的特別實例包括逐步加長方法，其係根據胺基酸序列資訊，逐步依序將胺基酸鍵結至另一胺基酸殘基上，藉此加長胺基酸鏈；及片段縮合方法，其中片段係由數個事先合成之胺基酸所組成，經由偶合反應將片段與另一片段鍵結。本發明蛋白質可用任何一種方法合成。

在此種肽合成作用中，可以慣用的方法進行縮合作用。縮合作用方法實例包括疊氮化合物方法、混合酸酐方法、DCC方法、活化酯方法、氧化-還原方法、DPPA(二苯基磷酸基疊氮)方法、DCC + 添加物(1-羥基苯并三唑、N-羥基琥珀醯胺、N-羥基-5-去甲苄-2,3-二羧基亞醯胺)方法，及Woodward方法。

在此方法中所用的溶劑可選自肽縮合反應中廣泛所用的溶劑，溶劑實例包括二甲基甲醯胺(DMF)、二甲基砜(DMSO)、六磷酸醯胺、二噁烷、四氫呋喃(THF)，乙酸乙酯，及其溶劑混合物。

在前述肽合成作用過程中，可利用酯化作用將未參與反應之胺基酸或肽上的羧基酯化，而將其保護起來，例如低碳數烷酯；例如甲酯，乙酯，第三-丁酯，及芳香烷酯；例如苄酯，對-甲氧基苄酯，及對-硝基苄酯。

五、發明說明 (22)

可利用基團(例如乙醯基，苄基，苄基氧羰基，或第三-丁基)將具有側鏈官能基之胺基酸(例如酪胺酸的羥基)保護起來。然而，保護作用是視情況進行的。除此之外，例如，精胺酸上的胍基可用適當的保護基團(諸如硝基，甲苯磺醯基、對-甲氧基苯磺醯基、仲甲基-2-磺醯基、苄基氧羰基、異苄基氧羰基或金剛烷基氧羰基)保護。

經由例行性方法可將包括於前述胺基酸、肽及本發明蛋白質上的保護基團去保護；例如催化還原作用或利用液態氫/鈉、氟化氫、溴化氫、氯化氫、三氟乙酸、乙酸、甲酸或甲烷磺酸等試劑。

可利用前述各式方法適當純化因此所得之本發明蛋白質，例如，一般所用的方法係肽化學範疇中所採用的方法；例如離子交換樹脂、分配層析法、膠片層析法及逆流分布。

本發明蛋白質適以作為製備其專一性抗體之免疫原，利用該免疫原，可製備所要的抗血清(多株抗體)及單株抗體。

製備其抗體方法是技藝中所熟知的方法，因此，在本發明中，亦可經由例行性方法製備抗體(參考，例如 zoku-seikagaku jikken kouza“研究免疫學方法”，日本生化協會出版(1986))。

因此所得之抗體(例如)可用以純化 GFAT1L 蛋白質；利用其免疫學方法分析及鑑定蛋白質。更明確言之，因為本發明基因證實在骨骼肌組織及心臟組織中表現，該抗體可

五、發明說明 (23)

用以測定這些組織中GFAT的濃度。除此之外，含有以該抗體為活形成分之藥劑可作為對抗疾病(諸如糖尿病疾其併發症)之治療或預防藥劑。

在藥劑範疇內，因此所獲之本發明蛋白質可作為以該蛋白質為活性成分之藥劑，因此，本發明提供一種內含以本發明蛋白質為活性成分之藥劑組合物。

如前所述，以本發明蛋白質作為藥劑的優點是可增進對骨骼肌具有專一性之聚肽的GFAT活性，骨骼肌被視為是葡萄糖代謝重要的組織，或可促進減緩低血糖症的作用。根據分法可證實這些活性；例如，Marshall等人所述之方法(J. Biol. Chem., 266, (8), 4706-4712 (1991))，該方法將於本專利說明書中後述。

在前述方法中，當GFAT作用所形成之麩胺進一步與麩胺去氫酶(GDH)反應時，APAD(輔酶)會同時還原成APADH，測定還原作用所伴隨吸收值的變化，可提供GFAT活性。明確言之，在該方法中，適當稀釋的GFAT1L大腸桿菌溶液之可溶性分液(50微升)加至置於96槽孔微量盤中之受質溶液(40 mM磷酸鈉緩衝液，pH 7.5，50 mM KCl，1.25 mM EDTA，0.3 mM APAD，6單位/毫升GDH，0-6 mM麩胺酸，及0-6 mM果糖-6-P (F6P))(200微升)中；混合物在37°C下反應60分鐘；利用微量盤讀計經由光學以365毫微米測定因為反應後吸收值的變化。

藥劑組合物中作為活性成分之本發明蛋白質亦包括其醫學上可接受之鹽類，這些鹽類包括鹼金屬鹽，諸如鈉、

五、發明說明 (24)

鉀或鋰；鹼土金屬鹽，諸如鈣、鎂或鋇；及銨鹽。前述鹽類另外包括酸加成鹽，其係將本發明蛋白質與適當有機酸或無機酸反應後而成的。典型酸加成鹽實例包括氫氯酸鹽、氫溴酸鹽、硫酸鹽、氫硫酸鹽、醋酸鹽、草酸鹽、戊酸鹽、油酸鹽、月桂酸鹽、硼酸鹽、苯甲酸鹽、乳酸鹽、磷酸鹽、對-甲苯磺酸鹽(tosylates)、檸檬酸鹽、順丁烯二酸鹽，反丁烯二酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、磺酸鹽、羥乙酸鹽、順丁烯二酸鹽、壞血酸鹽、苯磺酸鹽及苯酸鹽。

前述藥劑組合物中包括醫藥有效量之本發明蛋白質(作為活性成分)，及組合時之適當藥劑載劑或稀釋劑。

用於前述藥劑組合物(藥劑配方)之藥劑載劑實例係根據配方使用形式，包括典型之稀釋劑及媒劑。特別之實例包括填充劑、膨脹劑、鍵結劑、潤濕劑、分散劑、表面活性劑、潤滑劑及適當選用之載劑，並根據所製備之配方單位投藥形式使用。

特別佳者，本發明藥劑配方是根據蛋白質配方中所用之各式成分及類似物製備而成，諸如穩定劑、無菌劑、緩衝劑、等張劑、螯合劑、pH-調節劑及表面活性劑。

穩定劑實例包括人類血清白蛋白、典型L-胺基酸、醣類及纖維素衍生物。這些穩定劑可單獨使用或組合使用，亦可與其他成分(諸如表面活性劑)組合使用。此種組合使用可能會另外增進活性成分之穩定性。

前述L-胺基酸並無特別限制，任何L-胺基酸均可使用，諸如甘胺酸、半胱胺酸或麩胺酸。

五、發明說明 (25)

前述醣類並無特別限制，可使用單醣類(諸如葡萄糖、甘露糖、半乳糖及果糖)；糖醇(諸如甘露醇、肌醇及木糖醇)；雙醣類(諸如蔗糖、麥芽糖及乳糖)；及多醣類(諸如葡萄糖精、羥基丙基澱粉、軟骨素硫酸及玻糖醛酸)及其衍生物。

表面活性劑並無特別限制，不論離子性或非離子性表面活性劑均可使用。實例包括聚氧伸乙基丙二醇花楸丹烷酯、聚氧伸乙基烷酯、花楸丹單醯酯及脂肪酸甘油酯。

纖維素衍生物並無特別限制，而纖維衍生物包括甲基纖維素、乙基纖維素、羥基乙基纖維素、羥基丙基纖維素、羥基丙基甲基纖維素及羧基甲基纖維素。

前述醣類適當添加總量是每微克活性成分約0.0001毫克或更多，較佳者約0.01-10毫克。前述表面活性劑添加總量是每微克活性成分約0.00001毫克或更多，較佳者約0.0001-0.01毫克。人類血清白蛋白添加總量是每微克活性成分約0.0001毫克或更多，較佳者約0.001-0.1毫克。胺基酸添加總量是每微克活性成分約0.001-10毫克，纖維素衍生物添加總量是每微克活性成分約0.00001毫克或更多，較佳者約0.001-0.1毫克。

加至本發明藥劑配方中之活性成分含量範圍廣泛，適當控制在約0.00001-70重量%，較佳者約0.0001-5重量%。

本發明藥劑配方可含有各式的添加物，諸如緩衝劑、等張劑及螯合劑。緩衝劑的實例包括硼酸、磷酸、醋酸、檸檬酸、 ϵ -胺基癸酸、麩胺酸，及或其鹽類(例如鹼金屬鹽

五、發明說明 (26)

，諸如鈉或鉀鹽，及鹼土金屬鹽，諸如鈣或鎂鹽)。等張劑實例包括氯化鈉、氯化鉀、醣類及甘油。螯合劑實例包括伸乙二胺四乙酸鈉及檸檬酸。

本發明藥劑配方可為溶液配方形式，另一種方式是，該配方亦可為便於保存之冷凍乾燥形式，使用時，將其溶解於水，含有生理食鹽緩衝液等溶液，以形成適當濃度之配方。

可根據治療目的來決定本發明藥劑配方各種形式之投藥單位形式，典型投藥形式實例包括固態(諸如錠片、藥丸、粉末、藥粉、顆粒及膠囊狀藥劑)；及液態(諸如溶液、懸浮液、乳化液、糖漿及藥水)。根據投藥的途徑，這些投藥形式可另外區分為經口藥劑、非經腸藥劑、經鼻氣管藥劑、經由陰道藥劑、坐劑、舌片及軟膏。根據相對之典型方法，可混合、成形及製備這些形式。

例如，當配方為錠片時，可使用各式的配方載劑。實例包括媒劑(諸如乳糖、蔗糖、氯化鈉、葡萄糖、尿素、澱粉、碳酸鈣、白陶土、結晶體纖維素、水楊酸及磷酸鉀)；鍵結劑(諸如水、乙醇、丙醇、單純糖漿、葡萄糖溶液、澱粉溶液、動物膠溶液、羧基甲基纖維素、羥基丙基纖維素、甲基纖維素及聚乙基吡咯啉烷酮)；分散劑(諸如羧基甲基纖維素鈉、羧基甲基纖維素-Ca、低取代程度羥基丙基纖維素、乾澱粉、藻酸鈉、粉末瓊脂、粉末昆布糖、碳酸氫鈉及碳酸鈉)；表面活性劑(諸如聚氧乙烯花楸丹脂肪酸酯、硫酸月桂酯、及單硬脂酸甘油酯)；分散預防劑(諸如蔗

五、發明說明 (27)

糖、三硬脂酸甘油酯、可可膏及氫化油)；吸收加強劑(諸如四級胺基及硫酸月桂酯)；潤濕劑(諸如甘油及澱粉)；吸附劑(諸如澱粉、乳糖、白陶土、膨土及羽狀矽酸)；及潤滑劑(諸如純化滑石粉、硬脂酸鹽、粉末硼酸及聚乙烯丙二醇)。

除此之外，錠片可視情況以慣用塗覆物質塗覆，形成塗覆錠片。此種錠片的實例包括糖-塗覆錠片、動物膠-塗覆錠片、腸衣錠片及薄膜塗覆錠片。另一種方式是，錠片可為雙層錠片或多層錠片。

當配方為藥丸時，可使用的配方載劑包括媒劑(諸如葡萄糖、乳糖、澱粉、可可膏、氫化蔬菜油、白陶土及滑石粉)；鍵結劑(諸如粉末亞拉伯膠、粉末膠黃著樹膠、動物膠及乙醇)；及分散劑(諸如昆布糖及瓊脂)。

經由例行性方法，將本發明活性成分及上述實例中所述之配方載劑混合，以製備動物膠或軟性物質之膠囊藥劑。

經口投藥之液態配方包括醫藥學上可接受溶液、乳化液、懸浮液、糖漿及藥水，且其含有常用非活性之稀釋劑(諸如水)。該液態配方可另外含有佐劑(諸如潤濕劑、乳化劑及懸浮劑)。這些配方可以例行性方法製備之。

當藥劑配方為非經腸投藥之液態配方時；例如無菌水溶液或非水溶液、乳化液及懸浮液，可使用稀釋劑，諸如水、乙醇、丙醇、聚乙烯丙二醇、乙氧化異脂酸醇、聚氧化異脂酸醇、聚氧乙烯花楸丹脂肪酸酯或蔬菜油，諸如橄欖油。除此之外，可加入可注射之有機酯，諸如油酸乙酯。

五、發明說明 (28)

這些液態配方可另外含有典型溶解佐劑，諸如緩衝液；潤濕劑、乳化劑、懸浮液、保存劑及分散劑。

無菌作用係採用諸如通過可過濾掉細菌之濾紙之過濾法；添加消毒劑；放射線處理；或加熱處理。除此之外，無菌固態組合物在使用之前，溶解在無菌水或適當無菌基質中，亦可製備液態配方。

當配方為坐劑及經陰道投藥藥劑時，可使用配方載劑，諸如聚乙炔丙二醇、可可膏、高碳數醇類、高碳數醇酯、動物膠及半合成甘油酯。

當配方為軟膏時，諸如貼片、乳液及膠體，可使用白石蠟脂、石蠟、甘油、纖維素衍生物、丙二醇、聚乙炔丙二醇、矽酮、膨土及蔬菜油，諸如橄欖油。

經由例行性方法，利用已知標準媒劑，可製備經鼻氣管或舌下投藥之藥劑組合物。

本發明藥劑可包含額外的成分，諸如色素、保存劑、香料、芳香劑、甜味劑及其他醫藥物。

投用前述藥劑配方脂方法並無特別的限制，採用的方法是根據條件而定的，諸如配方的形式、病患狀態；例如年齡或性別，及疾病的嚴重性。明確言之，錠片、藥丸、液體、懸浮液、乳化液、顆粒及膠囊藥劑係經口投藥。注射針劑係以靜脈注射單一投藥或與典型補充劑組合使用，諸如葡萄糖或胺基酸，倘有需要，係以肌肉內、皮內、皮下或腹腔內方式注射之。坐劑係經肛門投藥，經鼻氣管藥劑係經鼻腔氣管投藥，舌下藥劑係經口投藥，軟膏則是經皮

五、發明說明 (29)

投藥。

含於前述藥劑配方中的活性成分含量及投藥劑量並無特別限制，根據一些條件，這些含量範圍廣範，諸如所要的治療效果、投藥方法、治療期間及病患狀態(如年齡或性別)等。通常，每公斤人體體重每日投藥劑量約0.01微克至10毫克，較佳約0.1微克至1毫克。投藥配方可以每日投與單劑或分次投藥。

因此所得之本發明骨骼肌專一性 (本發明蛋白質)具有GFAT活性，及該蛋白質全部或部分可作為減緩低血糖症藥劑之用。

如後述實例所示，本發明基因證實可於骨骼肌組織中表現，因此，製備包括本發明GFAT1L基因全部或部份反向DNA之任意基因表現載體，及利用該載體在骨骼肌組織細胞中產生具有互補於mRAN之RNA序列，可以抑制轉譯作用，以抑制GFAT1L基因表現，因此，骨骼肌組織中六碳糖胺生物合成途徑之GFAT活性會被抑制，並促進細胞攝入葡萄糖的含量，以降低血糖的含量。如此一來，促進葡萄糖代謝作用，進而抑制或減緩糖尿病進展。本發明基因可能為抗-糖尿病作用之基因治療組合物，或為具有相同效果之基因療劑。

本發明亦提供包括全部或部份GFAT1L基因以為基因治療用之載體，及包含利用該載體將GFAT1L基因帶入細胞內之藥劑(為活性成分)。

因此，本發明提供用於基因治療之引入載體，其包括含

五、發明說明 (30)

有全部或部份SEQ ID NO: 2反向DNA序列之GFAT1L反向基因；利用該載體將GFAT1L反向基因帶入的細胞；含有作為活性成分之引入載體以為基因治療用之基因治療藥劑，及利用載體將GFAT1L反向基因帶入的細胞。

本發明亦提供在糖尿病病患骨骼肌細胞或肌肉組織位置投與糖尿病治療藥劑，以促進這些組織中葡萄糖代謝作用，及抑制糖尿病病患的糖尿病進展或促進其體中葡萄糖代謝作用，藥劑的特徵在於基因治療用之引入載體，其包括含有全部或部份SEQ ID NO: 2序列之反向DNA之GFAT1L反向基因，及利用該載體將GFAT1L反向基因帶入之細胞。

除此之外，本發明提供一種含有基因治療用之病毒性引入載體之藥劑作為活性成分，其包括前述GFAT1L反向基因，明確言之，此藥劑係為(例如)治療用，以促進骨骼肌中葡萄糖的代謝作用。

根據本發明基因治療將於後述。除非特別說明，慣用的化學、分子生物學、微生物、重組DNA技術、遺傳學及免疫學可用於進行後述的基因治療。這些方法的實例揭示於Maniatis, T.等人，分子選殖：實驗室手冊(冷泉灣實驗室，冷泉灣，紐約(1982))；Sambrook, J.等人分子選殖：實驗室手冊，第二版(冷泉灣實驗室，冷泉灣，紐約(1981))；Ausbel, F.M., 等人，分子生物學最新步驟，John Wiley及Sons，紐約，(1992)；Anand，複合基因體分析技術，(學院印行(1992))；Guthrie, G.等人，酵母遺傳指引及分子生物學，(學院印行(1991))；及Fink等人，

五、發明說明 (31)

Hum. Gene Ther., 3, 11-19 (1992)。

本發明提供一種基因治療方法，其中提供反向核苷酸藥劑會在本發明基因表現細胞中產生具有與mRNA序列互補之RNA，以抑制GFAT活性或抑制血糖濃度的增加；抑制轉譯作用；及抑制GFAT1L基因的表現。

前述基因治療方法是種利用抑制轉錄作用或轉譯作用步驟來抑制標的基因表現的方法，該抑制效果係(例如)在含有GFAT1L基因之GFAT表現細胞中鍵結適當之mRNA，或在DNA雙股螺旋結構中併入形成三股結構達到的。此方法被認為是產生與該基因mRNA互補之反向寡核苷酸，及該反向寡核苷酸移轉至標的細胞所導致的。

倘提供抑制GFAT1L基因表現功能效果，則受體細胞/標的細胞中GFAT活性或血糖濃度的增加會受抑制。利用含有反向寡核苷酸之載體或質體，將寡核苷酸帶入至標的細胞內，然其仍留在染色體外。

根據前述反向寡核苷酸之糖尿病基因療法，係將該反向核苷酸係併入至反轉錄病毒、腺病毒或源自AAV之載體上，而以病毒或載體轉植至GFAT活性表現的細胞，以便大量表現反向寡核苷酸，如此，可以達到降低所要血糖濃度的效果。

以反向寡核苷酸帶入至含有GFAT1L基因細胞內，以抑制GFAT1L蛋白質表現為例，反向寡核苷酸無須與相對GFAT1L基因全長相同，例如，仍可使用具有特定功能之前述包括部分序列之改良者及基因，只要這些採用者所具

五、發明說明 (32)

有的功能實質上與抑制GFAT1L基因表現功能相當即可。

此種引入所要基因，以達重組目的及保持在染色體外目的之載體是技藝中所熟知的，任何已知的載體均可用於本發明。這些載體實例包括病毒性載體及質體性載體，其包括一套與表現控制元素鏈結之GFAT1L反向寡核苷酸，並可在標的細胞中表現出反向寡核苷酸的產物。雖然前述表現載體可為前述載體，但揭示於美國專利申請案5,252,479及PCT國際申請案WO 93/07282或利用pRC/CMV (Invitrogen的產品)之原始載體(諸如pWP-7A、pWP-19、pWU-1、pWP-8A、pWP-21及/或pRSVL)是較佳者。更佳者，可使用後述各式的病毒性載體。

有關基因轉移治療時所用載體中之啟動子，較佳使用與治療疾病標的之疾病部分組織有專一性的啟動子。

說明啟動子之特別實例。骨骼肌有關的啟動子實例包括骨骼肌肌動蛋白、肌凝蛋白長鏈、及肌酸激酶等。心臟有關之啟動子實例包括心房鈉尿激素、心室專一性肌凝蛋白短鏈及心房專一性及心室專一性 α -肌凝蛋白長鏈。肝臟有關之啟動子實例包括白蛋白、 α -胎兒蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶、運鐵蛋白及transstyrene。大腸有關之啟動子實例包括羧酸脫水酶I抗原及胚胎致癌性抗原。子宮及胎盤有關之啟動子實例包括動情激素、芳香酶細胞素P450、膽固醇側鏈溶解酶P450及17 α -羥基酶P450。

前列腺有關之啟動子實例包括前列腺抗原、gp91-fox基因及前列腺專一性卡利克連。胸部有關之啟動子實例包括

五、發明說明 (33)

erb-B2、erb-B3、 β -酪蛋白、 β -乳球蛋白及乳蛋白。肺臟有關之啟動子實例包括活化子蛋白C尿球蛋白。皮膚有關之啟動子實例包括K-14角蛋白、人類角蛋白1或6及白血素。

腦部有關之啟動子實例包括grial纖維狀酸性蛋白、成熟星狀細胞專一性蛋白、髓脂質鹼性蛋白及酪胺酸羥基酶。胰臟有關之啟動子實例包括絨毛素、升血糖激素、Langerhans擬澱粉小體聚肽、澱粉酶及PAP1。胸腺有關之啟動子實例包括硫球蛋白及降血鈣素。骨骼有關之啟動子實例包括 $\alpha 1$ 膠原蛋白、骨鈣素及骨涎糖蛋白。腎臟有關之啟動子實例包括腎醇素、肝臟/骨骼/腎臟鹼性磷酸酶及紅血球生成蛋白。

製備併有反向寡核苷酸之載體時，可根據本發明基因之核苷酸序列資訊，以一般遺傳工程方法(如前所述)，輕易的製備出欲引入之反向寡核苷酸(與相對GFAT1L基因序列完全或部分之互補序列)。

藉由將DNA帶入至細胞內之已知任何各式方法，可將併有反向寡核苷酸之載體帶入至細胞中，此方法實例包括電擊穿孔法、磷酸鈣共同沉澱法及病毒轉誘法。亦可使用經GFAT1L基因反向寡核苷酸轉型之細胞，其為純化狀態時，可用以抑制GFAT活性或抑制血糖含量增加之藥劑或為研究基因療法之模式。

在基因治療中，併有前述反向寡核苷酸之載體可藉由注射至組織位置，或以一般注射法將其帶入至病患標的細胞

五、發明說明 (34)

內。當以一般注射法注射該載體時，載體會到達任何可表現GFAT mRNA的其他位置之細胞中，倘無法使得轉誘基因永久的併入至每個標的細胞染色體上，則必須定期重複的注射。

本發明基因治療包括將併有前述反向寡核苷酸(引入反向寡核苷酸之載體)直接投與體內之活體內方法，及活體外方法，其係自病患身體取出標的細胞，在身體外將基因帶入至細胞內，再將細胞移植回身體。

另一種亦可採用的方式是，將基因治療用之GFAT1L基因之反向寡核苷酸直接帶入細胞內，並使用核糖酶活化分子切割RNA鏈。

後述本發明基因治療藥劑特別可以糖尿病為標的，其中藥劑含有作為活性成分之載體(其併有與本發明相對GFAT1L基因序列之全部或片段反向寡核苷酸之基因)，及利用該載體將人類GFAT1L基因反向寡核苷酸帶入之細胞。然而，除了糖尿病外，亦可進行前述基因治療(處理)，以避免糖尿病併發症發生(諸如糖尿病性神經性病變、糖尿病性腎臟病變及糖尿病性視網膜病變)及遺傳標記。

可根據基因治療(處理)目標，適當的選擇欲將反向寡核苷酸帶入的標的細胞。除了骨骼肌組織及心臟組織外，標的細胞——確實表現GFAT的細胞——包括淋巴細胞、纖維母細胞、肝臟細胞及補血幹細胞。

有關將前述基因治療之反向寡核苷酸之引入方法包括利用病毒之方法及不利用病毒之方法。

五、發明說明 (35)

利用病毒的方法實例包括以反轉錄病毒載體為載體之方法，該方法係根據GFAT1L基因之反向寡核苷酸是正常細胞中表現之外來物質，其他病毒性載體實例包括腺病毒載體、HIV(人類免疫不全症病毒)載體、AAV(腺體相關病毒)、疱疹病毒、HSV(單純疱疹病毒)及EBV(非洲淋巴細胞瘤(Epstein-Barr)病毒)。

不使用病毒之方法實例包括磷酸鈣共同沉澱方法；膜融合脂小體方法，其中脂小體包括DNA及事先已利用UV線破壞去活化之融合Sendai病毒，以產生膜融合脂小體，所形成之脂小體直接與細胞膜融合，以便將DNA帶入至細胞內[Kato, K等人，J. Biol. Chem., 266, 22071-22074 (1991)]；利用包金質體DNA在高伏特電價下，將DNA帶入細胞內的方法[Yang, N.S.,等人，Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 9568-9572 (1990)]；裸錄DNA方法，其中直接將質體DNA注射至活體器官或標的組織內[Wolff, J.A.等人，Science, 247, 1465-1467 (1990)]；陽性脂小體方法，其中將基因包埋在陽性電價多脂層脂小體帶入細胞內[Kunio Yagi, Igaku no Ayumi, 第175冊，第9卷，635-637 (1995)]；及配位體-DNA複合物方法，其中DNA鏈結至可與受體(標的細胞中會表現)鍵結之配位體上，以便將基因帶入特定細胞內，而不會帶入其他的細胞內，並投用所形成之複合物[Frindeis等人，Trends Biotechnol., 11, 202 (1993)]；Miller等人，FASEB J., 9, 190 (1995)]。

前述配位體-DNA複合物方法實例包括以涎糖蛋白為配位

五、發明說明 (36)

體，以肝臟細胞表現之涎糖蛋白受體為標的之方法[Wu, 等人, J. Biol. Chem., 266, 14338 (1991); Ferkol 等人, FASEB J., 7, 1081-1091 (1993)]及以標的細胞強烈表現之運鐵蛋白受體為標的，以運鐵蛋白為配位體之方法[Wagner 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 3410 (1990)]。

本發明所採將基因帶入至細胞之方法亦包括前述生物及物理性基因引入之組合方法。此種組合性方法實例包括其中特定大小之質體DNA與對抗腺病毒六面體蛋白之聚離胺酸-共軛抗體組合。在此方法中，所形成之複合物連結至腺病毒載體上，並以所形成之三分子複合物轉植細胞，以便引入本發明反向寡核苷酸。在此方法中，當與腺病毒載體偶合之DNA破壞之前，會形成有效的鏈結作用、內源性包涵體及分解內小體。前述脂小體/DNA複合物可直接媒介活體內基因的引入。

製備併有本發明反向寡核苷酸之病毒載體方法及將反向寡核苷酸帶入至標的細胞及標的組織內之方法將於後文特別說明。

反轉錄病毒載體系統包括病毒性載體及輔細胞(包裝細胞)。所謂“輔細胞”係指該細胞會表現諸如反轉錄病毒之結構蛋白gag(病毒顆粒之結構蛋白質)、pol(反轉錄酶)或env(外套蛋白)，但不會形成病毒顆粒。該病毒性載體包括包裝訊息及LTR(長端重複)，但卻不含有病毒複製之結構蛋白(諸如gag、pol或env)。包裝訊息是種在組合病毒顆

五、發明說明 (37)

粒時的訊號，及併入選殖位置之篩選標幟(基因)(neo、hyg)及所要引入反向寡核苷酸(相對GFAT1L或其片段之整個反向寡核苷酸)取代病毒基因而重組至病毒內。為了獲取高效價病毒顆粒，限制插入的長度相當重要，盡可能短，並加寬包括部分gag基因之包裝訊息，並避免gag基因之ATG留滯其中。

利用移轉，將併有所要GFAT1L基因之寡核苷酸之載體DNA帶入至輔細胞中，輔細胞產生的病毒結構蛋白將載體基因RNA包裝起來，以便在輔細胞內形成病毒顆粒，並自輔細胞分泌出病毒顆粒。當重組病毒顆粒之病毒顆粒轉植至標的細胞後，病毒基因體RNA所反轉錄出DNA會併入至標的細胞細胞核內，以表現出插入載體上之反向基因。

為了增進引入基因的效率，可採用具有細胞吸附區域之纖維網蛋白片段、肝素-鍵結位置及共軛片段的方法[Hanenbergh, H.等人, Exp. Hemat., 23, 747 (1995)]。

前述反轉錄病毒載體系統所用載體實例包括源自老鼠白血病毒之反轉錄病毒[McLachlin, J.R.等人, Proc. Natl. Acad. Res. Molec. Biol., 38, 91-135 (1990)]。

採用腺病毒載體之方法將於後文詳述。根據Berkner, K.L. [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 158, 39-66 (1992)]; Setoguchi, Y., 等人, [Blood, 84, 2946-2953 (1994)]; Hiromi Kanegae 等人, [Jikken Igaku, 12, 28-34 (1994)] ; 或 Ketner, G. 等人 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 6186-6190 (1994)] 中所述之方法製備腺

五、發明說明 (38)

病毒載體。

例如，為了製備非生長腺病毒載體，先去除腺病毒E1及/或E3區域之起始基因，而後，用含有所要標的外部基因表現單位(包括標的引入反向寡核苷酸；例如本發明GFAT1L基因之反向寡核苷酸；反向寡核苷酸轉錄用之啟動子；及提供轉錄基因穩定性之poly-A)及部分腺病毒基因體DNA之質體載體及含有腺病毒基因體之質體同時轉植細胞(例如293細胞)，兩種類型的質體會進行同質重組以取代E1或基因表現單位，反之亦然，以便製備非生長腺病毒載體——一種包括所要GFAT1L基因之反向寡核苷酸。除此之外，將腺病毒基因體DNA併至黏接質體中以製備終蛋白質，其3'端加上腺病毒載體。另外，YAC載體可用以製備重組腺病毒載體。

簡要說明製備腺病毒相關病毒(AAV)載體。AAVs是種小病毒，常混入腺病毒之培養系統中。在AAVs中，證實有兩類：無須輔病毒即可在宿主細胞內以自我控制方式增殖的 *Parvoviridae*，及需要輔病毒執行複製之 *Dependoviridae*。AAVs是種具有廣泛宿主之普通病毒，可輕易轉植細胞。每個病毒基因體由4680個核苷酸的直鏈單股DNA組成，而每個端點的145個核苷酸具有特徵序列，名為ITR(端點逆向重複序列)，ITR係作為複製起始點，具有引子功能。除此之外，當AAV包裝至病毒顆粒及將AAV併入至宿主細胞染色體時，ITR是必須的。有關病毒蛋白質，基因體的左半邊形成非結構性蛋白，因此病毒蛋白編

五、發明說明 (39)

碼Rep—調節性蛋白質，負責複製作用及轉錄作用。

根據AAV併入染色體DNA的特性可製備重組AAV，以製備引入基因時所需的載體。更明確言之，在此方法中，製備插入至野生型AAV的5'及3'之間而併有所要反向寡核苷酸(GFAT1L基因反向寡核苷酸)之質體(AAV載體質體)，然每個端點的ITR仍然存在。相反地，病毒複製及形成病毒顆粒時所要的病毒蛋白是由其他輔助質體供給。必須提供此這兩種質體，因為質體並無一般核苷酸序列，且不會產生野生型病毒。其後，將這些質體以轉植方式引入至細胞(諸如293)中，而轉植細胞再以腺病毒轉植(當使用293細胞時，可用非生長型病毒)，以製備所要非生長型的重組AAV。因為所製備的重組AAV仍留置在細胞核中，故以冷凍解凍方式自相關細胞收集重組AAV，在56℃下加熱使混入其中的腺病毒失活。視情況分離重組AAV，並利用氯化銨之超高速離心法濃縮之。在前述方法中，可獲得基因引入的重組AAV。

根據例如Norio SHIMIZU等人[Cell Engineering, 14 (3), 280-287 (1995)]中所述方法製備EBV載體。

簡要說明製備併有本發明反向寡核苷酸之EBV載體方法
EB病毒(Epstein-Barr病毒：EBV)係屬於*Herpesviridae*病毒，在1964年首次由Epstein等人從源自Burkitt淋巴腫瘤培養細胞中分離出來[Kieff, E. 及 Liebowitz, D.: Virology, 第二版, Raven印行, 紐約, 1990, 1889-1920頁]。因為EBV具有轉型細胞的活性，為要構築引入

五、發明說明 (40)

基因的載體需先製備不具轉型活性之病毒，以下列的方式製備之。

明確言之，選殖將所要外來基因引入至標的DNA鄰近的EBV基因體。為選殖基因體，併入外來基因的DNA片段及藥劑抗性基因，以便形成製備重組病毒載體。其後，將製備重組病毒之載體轉質至EBV-陽性Akata細胞，並以適當的限制切割。以抗表面免疫球蛋白處理經由同質重組所形成之重組病毒，以刺激產生病毒，並與野生型Akata EBV一起收集。用病毒混合物轉植EBV陰性的Akata細胞，在藥劑存在下，篩選抗藥株，以獲取只有所要重組病毒，而不包括野生型EBV之Akata細胞。除此之外，重組病毒轉植之Akata細胞具有病毒之活性，故標的除組病毒載體可大量生產。

利用膜融合之脂小體引入基因之方法，可製備沒有利用重組病毒載體將所要反向寡核苷酸引入至標的細胞之非病毒載體。此方法係將活性膜脂小體與細胞膜融合，而將脂小體內成分直接引入至細胞中。

利用前述膜融合脂小體引入反向寡核苷酸係例如根據Nakanishi, M., 等人[Exp. Cell. Res., 159, 399-499 (1985)]；及將基因帶入動物組織，肽及蛋白藥劑傳送趨勢及未來展望 (Lee, V.H. 等人出版)，Harwood Academic Publishers GmbH. Amsterdam, 1995，第337-349頁]中所述方法進行。

簡要說明利用膜融合脂小體引入反向寡核苷酸之方法。

五、發明說明 (41)

明確言之，將UV線去活化基因之Sendai病毒及包括聚合體物質(諸如所要反向寡核苷酸及表現蛋白)之脂小體在37℃下融合。所形成之膜融合脂小體包括得自非融合脂小體之空洞(內部)及類似病毒外套之突出物(外部)，因此，膜融合脂小體具有類似假病毒的構造。經由蔗糖密度梯度離心法進一步純化膜融合脂小體，其後，於4℃下吸附在標的培養細胞或組織細胞上，將溫度上升至37℃，脂小體內的成分會帶入至細胞內，因此，所要的反向寡核苷酸會帶入至標的細胞內。所採用作為脂小體的脂肪較佳為合成的磷脂質，其含有50%(莫耳)的膽固醇及卵磷脂，且為負電價，及較佳形成直徑為300毫微米之單脂層脂小體。

為利用其他脂小體將反向寡核苷酸帶入至標的細胞內，可應用陽離子脂小體將反向寡核苷酸引入。此方法係根據Yagi等人[B.B.R.C., 196, 1042-1048 (1983)]所述之方法進行。此方法係根據質體及細胞兩者均為負電價，而脂小體內部及外部表面呈現正電價，利用電性，可增加質體的攝入，增加對細胞的相互反應。本說明書所採用的脂小體較佳者為正電價多脂層脂小體(多脂層大媒劑：MLV)，然而，製備質體及大單脂層脂小體(大單脂層媒劑：LUV)或小單脂層脂小體(大單脂層媒劑：SUV)之複合體亦可引入所要的反向寡核苷酸。

簡要說明製備包括陽性MLV質體之方法。明確言之，脂質TMAG (N-(α -三甲基胺基乙醯基)-十二醯基-D-麩胺酸氯)，DLPC(二月桂醯基磷脂酸膽鹼)及DOPE(二油醯基磷

五、發明說明 (42)

脂酸乙醇胺)溶解在氯仿中，製備含有此三種成分莫耳比例為1：2：2之溶液(脂質濃度為1 mM)，其後，含有總量脂質為1微莫耳之部分溶液置於Spitz試管中，利用旋轉蒸發器，於減壓下蒸發去除氯仿，以致備脂質薄膜。減壓下進一步去除所剩的氯仿，乾燥薄膜。而後，在脂質膜中加入含有基因引入之質體(20微克)之Dulbecco磷酸緩衝鹽溶液(加入Mg，Ca)(0.5毫升)，用氮氣吹氣。利用震盪混合器攪拌混合物2分鐘，以產生包埋陽性MLV質體懸浮液(含有所要反向寡核苷酸)。

所得包埋陽性MLV質體可用作為基因治療劑，例如，將併有標的反向寡核苷酸脂表現載體引入包埋至前述陽性MLV中，使DNA含量及脂小體脂肪含量分別控制在0.6微克及30毫微莫耳。所得脂質體包埋陽性MLV懸浮於磷酸緩衝食鹽溶液中(2微升)，將懸浮液每隔一日投與自病患所萃取之標的細胞，或投與病患組織。

“基因治療”定義如日本健康及福利部所定義“投與病患身體基因或經基因轉移之細胞，以治療疾病”，然，除了上述指引的定義外，根據本發明基因治療包括將反向寡核苷酸(特徵在於抑制GFAT表現之GFAT1L基因之反向DNA)帶入至前述標的細胞內，以治療糖尿病及其併發症。基因治療亦包括將標記基因或引入該標記基因之細胞帶入至人類身體內。

在本發明基因治療中，將所要基因帶入至標的細胞或組織之典型方法實例包括下列兩種方法。

五、發明說明 (43)

第一種方法是基因轉移方法，其中以併有標的反向寡核苷酸(GFAT1L基因之反向寡核苷酸)之病毒性載體(諸如腺病毒載體)直接轉植病患的標的細胞或組織。

另一種方式是第一種方法的變化。利用活體外方法，以併有標的反向寡核苷酸(GFAT1L基因之反向寡核苷酸)病毒性載體轉植源自病患的細胞，或將源自病患之細胞與含有病毒性載體之病毒產生細胞一起培養，以便將標的反向寡核苷酸引入至標的細胞中，後將細胞移植回病患身體內。

第二種方法是直接基因轉移方法(直接方法)，其中將併有反向寡核苷酸之適當動物細胞表現載體質體DNA直接注射至病患的標的位置；例如身體或骨骼肌。注射方法可為諸如HVJ脂小體方法、陽性脂小體方法、直接DNA注射法、電穿孔法或基因槍法。

當前述方法進行後，較佳進一步確認標的反向寡核苷酸(GFAT1L基因反向寡核苷酸)是否真的已被帶入至細胞內，特別是以試管內試驗，諸如載體基因cDNA恢復PCR或原位PCR。另一種方式是，較佳係以特定活性——移轉標的反向寡核苷酸(GFAT1L基因反向寡核苷酸)後所提供所要的治療效果——的增加或減少，及對標的細胞的影響來確認。不待言，當採用病毒性載體進行基因治療時，重要的是根據增殖病毒之PCR回覆試驗來確認有關所移轉反向寡核苷酸的安全性。

本發明亦提供一種藥劑組合物或藥劑配方(基因治療劑)

五、發明說明 (44)

，其包括作為活性成分用以移轉本發明反向寡核苷酸之有效療效含量載體，或帶有標的反向寡核苷酸(GFAT1L基因之反向寡核苷酸)之有效療效含量細胞，及適當非-毒性藥劑載劑或稀釋劑。

本發明前述藥劑組合物(藥劑配方)所用藥劑載劑的實例包括根據配方用途形式所採用之典型稀釋劑及媒劑。特別實例包括填充劑、膨脹劑、鍵結劑、濕潤劑、分散劑、表面活性劑、及潤滑劑，而載劑係根據所製備的投藥配方形式適當的選擇及使用。

配方投藥形式實例包括前述有關GFAT1L蛋白質抗體配方中所述者，及根據治療標的自各式形式中適當選擇。

例如，藥劑配方中包括包埋在脂小體內併有本發明反向寡核苷酸之載體，或經包括所要反向寡核苷酸之病毒性載體轉植之培養細胞。

這些配方可加至磷酸緩衝食鹽溶液(pH 7.4)中、Ringer溶液、注射用細胞內組合物液體等。另一種方式是，這些配方可與可增進基因移轉效率的物質組合投用，諸如魚精蛋白。

投用前述藥劑配方並無特別限制，係根據諸如配方形式、病患年齡、性別及其他狀況、及疾病的嚴重性而定的。

前述醫藥組合物中活性成分的含量及組合物劑量並無特別限制，其係根據所要的治療效果、投藥方式、治療期間、病患年齡及性別、及其他狀況來適當的彈性決定。

醫藥組合物可每日投藥，或每日劑量分次投藥。又本發

五、發明說明 (45)

明組合物可間歇性一至數週投藥。較佳者，是含可增進基因移轉之魚精蛋白或相似物質，或含有此種物質之組合物，與醫藥組合物一起組合投藥。

當採用根據本發明基因治療來治療糖尿病時，可適當組合前述的基因治療(組合式基因治療)。又，前述基因治療可與慣用的胰導素治療、營養療法等組合。然而，進行本發明基因治療時，包括治療的安全性，需參考NIH指引(重組DNA諮詢委員會，人體基因治療，4，365-389 (1993))。

根據本發明，藉製備生物樣品(諸如血液或血清)，萃取所需之核酸，及確認GFAT1L敏感基因的存在，以偵測GFAT1L基因—其引發細胞GFAT活性。又，根據本發明，細胞或組織中的GFAT活性含量及GFAT mRNA表現含量，及六碳糖胺生物合成途徑調節功能不全之進展或診斷的指數，可藉製備與六碳糖胺生物合成途徑功能不全之生物樣品，並偵測GFAT1L基因或其mRNA含量來決定。採用本發明此種方法可偵測到細胞或組織中GFAT活性含量及GFAT mRNA表現含量，及鑑定六碳糖胺生物合成途徑調節功能不全之進展或診斷的指數，及因此可了解所言功能不全的診斷(例如糖尿病)，決定糖尿病的治療效果，及糖尿病治療的預診。

根據偵測方法，根據自病患樣品(已事前確認呈現GFAT活性)所獲GFAT1L基因有關資訊，設計及製備DNA片段，用以篩選GFAT1L基因及/或增殖該基因。更明確言之，

五、發明說明 (46)

設計及製備作為菌斑雜化作用、菌落雜化作用、諾氏墨漬法等用探針的片段，或製備全部或部分GFAT1L DNA片段(業經聚合酶鏈結反應(PCR)以聚合酶增殖之核酸序列)以為探針用之片段。最後，第一步是製備具有與GFAT1L序列相同之序列的引子，所得引子作為篩選用之探針，與生物樣品(核酸樣品)反應，因此，可以確認具有GFAT1L序列的基因存在。可以各式幫助偵測標的序列的方法製備核酸樣品，諸如變性作用、限制酶切割作用、電泳、點墨漬法等。

從敏感性的觀點而言，PCR是較佳的篩選方法。PCR並無特別的限制，只要引子為GFAT1L片段即可，可採用慣用已知的方法(Science, 230, 1350-1354 (1985))或最近所開發之改良PCR(或將來可使用者) (“Jikken Igaku”特別議題，8(9) (1990), Yoshiyuki Sakaki等人出版，Yodosha印行；’Tanpakushitu, Kakusan, Koso” 35(17) (1990)，再版，Kyoritsu Shuppan K.K印行)。

作為引子用的DNA片段是化學合成之寡DNA，可利用自動DNA合成儀合成；例如DNA合成儀”Pharmacia KLB Gene Assembler Plus”(Pharmacia的產品)。所合成引子的長度(正向引子或反向引子)較佳約10至50個核苷酸，更佳者為15至30個核苷酸。在本說明書中，所合成的引子較佳是可與任何其他已知GFAT之DNA序列區別之序列。通常，前述篩選時所用的探針是標記探針，然而，探針可以未經標記，而係根據與標記配位體專一性鍵結以直接或

五、發明說明 (47)

間接方式偵測到。適當的標記類型及將探針或配位體標記化的適當方法是本發明技術範圍已知的，例如，可使用放射活性標記物質、生物素、螢光物質、化學冷光部分、酵素、抗體、或以已知方法(諸如切口轉譯作用、逢機鏈引作用或以激酶處理)將相似物質併入至探針或配位體上。

偵測目的所用之PCR稱之為RT-PCR，亦可採用各式的改良PCR方法。

更甚者，利用偵測樣品中GFAT1L基因的試劑套組可輕易及方便的進行本發明分析方法。

因此，本發明提供一種偵測GFAT1L的試劑套組，其特徵在於該套組含有前述GFAT1L DNA片段。

該試劑套組包括其可與SEQ ID NO: 2核苷酸序列全部或部分雜化之DNA片段，或其互補核苷酸序列。套組中可視情況含有其他元素，諸如標記試劑及PCR所需的試劑(例如Taq DNA聚合酶、去氧核苷酸三磷酸、引子等)。

標記試劑的實例包括化學修飾物質，諸如放射線同位素及磷核。DNA片段可事先與標記試劑共軛，除此之外，為了分析方便，試劑套組中可包括適當物質，諸如稀釋劑、標準抗體、緩衝液、清潔劑及反應終止溶液。

本發明亦提供一種利用前述分析方法診斷葡萄糖代謝疾病的方法，特別是六碳糖胺生物合成功能不全疾病；該方法所用之診斷試劑；及診斷套組。

當使用前述分析方法時，可直接或間接定序測試檢體中所得之GFAT1L，以幫助鑑定相關基因，例如與新

五、發明說明 (48)

GFAT1L基因相關的基因，其與野生型GFAT1L具有高度的相似性。

因此，本發明亦提供用以篩選測試檢體中人類GFAT1L相關基因之方法，該方法包括前述的分析方法及定序出測試檢體中GFAT1L DNA。

利用人類GFAT1L基因編碼之本發明SEQ ID NO：1聚肽，刪除、取代、或插入SEQ ID NO：1中胺基酸序列中的一至數個胺基酸，或其片段，可合成聚肽，或該聚肽之抗體，用以分析野生型GFAT1L及/或突變GFAT1L。

因此，本發明提供一種分析抗野生型GFAT1L抗體，及/或抗突變GFAT1L抗體的方法，與分析相對抗原之方法。利用本發明分析方法，根據野生型GFAT1L聚肽的改變可測出：GFAT活性的含量、葡萄糖調節功能不全的程度、六碳糖胺生物合成途徑功能不全的嚴重性、糖尿病的嚴重性及糖尿病併發症的嚴重性，諸如糖尿病潰瘍，糖尿病視網膜病變、糖尿病腎臟病變等。雖然利用前述技藝中慣用的技術定序GFAT1L可測出這些變化，但較佳使用抗體(多株抗體或單株抗體)，以偵測出GFAT1L聚肽間所存在的差異或GFAT1L聚肽的有無。在本發明分析方法的特別實例中，GFAT1L抗體會使GFAT1L蛋白質從人類收集之液態生物樣品(諸如血液或血清)中免疫沉澱，並於聚丙烯醯胺膠片進行西方墨漬法或免疫墨漬法時與GFAT1L聚肽反應。利用免疫組織化學技術，GFAT1L抗體亦可偵測到包埋於石蠟中或冷凍切片中的GFAT1L聚肽。製備及純化抗體

五、發明說明 (49)

的技術是技藝中所熟知的，因此可自這些技術選出適當者。

用於偵測野生型 GFAT1L 或其變體之較佳方法的特別實例包括根據三明治方法，利用單株抗體及/或多株抗體之酵素鏈結免疫吸附分析法(ELISA)、放射線免疫法(RIA)、免疫放射線分析法(IRMA)及免疫酵素分析法(IEMA)。

在本發明用以篩選候選化合物(作為抑制 GFAT 活性的藥劑)之篩選方法的一個具體實例中，是定量出 GFAT1L 蛋白質或其部分肽。簡而言之，對抗 GFAT1L 基因表現產物或 GFAT1L 蛋白質(此兩者後文統稱 GFAT1L 蛋白質)或其片段之抗體與含有候選化合物之試驗液體及標記 GFAT1L 蛋白質或其部分肽進行競爭反應，測定鍵結至抗體上之標記 GFAT1L 蛋白質或其部分肽之含量。

亦可以下列分析進行定量測定試驗液體中所含之 GFAT1L 蛋白質或部分肽：同時或依序將含有候選化合物之試驗液體與固定在載物體(carrier)之抗體及另一已標記且係對抗 GFAT1L 蛋白質之抗體反應。

根據另一種用以篩選抑制 GFAT1L 蛋白質或其部分肽之酵素活性(例如 GFAT 活性)化合物之可能方法，進行下列兩種情況反應，將受質與 GFAT1L 蛋白質或其部分肽反應，及兩種受質與試驗化合物與 GFAT1L 蛋白質或其部分肽反應，測定 GFAT1L 蛋白質或其部分肽的酵素活性，所得之結果與另一情況相互比較。

在上述方法中，受質並無特別限制，只要其可作為本發

五、發明說明 (50)

明蛋白質或GFAT1L蛋白質部分肽之受質即可，典型是採用果糖-6-磷酸或麩胺。當使用果糖-6-磷酸時，較佳是採用放射線同位素標記(例如 ^{14}C 、 ^3H 等)之果糖-6-磷酸。試驗化合物實例包括(但不侷限於)肽、蛋白質、非肽化合物、合成化合物、發效產物、細胞萃取物、植物萃取物、動物組織萃取物及血液。所提供的化合物可為新穎的化合物或已知的化合物。

在進行前述任何篩選方法時，將本發明蛋白質或GFAT1L蛋白質部分肽懸浮於適合篩選目的用的緩衝液中，以製備蛋白質或部分肽之樣品。任何pH約4至10(較佳約6至8)之緩衝液均可使用，諸如磷酸緩衝液、Tris-HCl緩衝液等，只要該緩衝液不會抑制本發明蛋白或GFAT1L蛋白質部分肽鍵結至受質上即可。

可以已知的方法測定本發明蛋白質或GFAT1L蛋白質部分肽之GFAT活性；例如根據Marshal等人(Journal of Biological Chemistry, 第266冊, 第8卷, 4706-4712 (1991)所揭示的方法。

例如，適當稀釋能表現GFAT1L之大腸桿菌細胞分解物(50微升)中加入200微升受質溶液(400 mM磷酸鈉緩衝液(pH 7.5)，50 mM氯化鉀，1.25 mM EDTA，0.3 mM APAD，6單位/毫升麩胺去氫酶(GDH)，0-6 mM麩胺，0-6 mM果糖-6-磷酸(F-6-P))，將所得之溶液置於96槽孔之微量盤中，在 37°C 下反應60分鐘，利用微量盤讀計測定在365毫微米的吸收值變化。根據所進行GFAT活性分析，

五、發明說明 (51)

GFAT所產生的麩胺會與麩胺去氫酶(GDH)進一步反應，在反應期間，同時產生APAD(輔酶)，APAD還原成APADH反應所伴隨的吸收值變化視為GFAT的活性。

另一種方式是以Smith等人所揭示的方法(*Analytical Biochemistry*, 98, 478-480, 1979)進行，此方法步驟如下。簡而言之，本發明蛋白質或GFAT1L蛋白質部分肽中加入含有12 μ M果糖-6-磷酸，5 μ M麩胺，及0.2 M磷酸緩衝液(pH 8.0)之混合物，所得之溶液保持在25℃下30分鐘，溶液中加入0.5 M HCl，讓反應在98℃下進行2小時，此後，加入2.5% NaNO₂及12.5% NH₄O₃NH₂，而後0.25% 2-甲基-2-苯并硫唑酮，而後加入0.5% FeCl₃，在650毫微米分析所得溶液之吸收值，以定量測定所產生之葡萄糖胺-6-磷酸。

在前述每個方法中，可以下述方法篩選藥劑候選化合物。例如，當未加入前述試驗化合物的情形與加入試驗化合物情形比較後，所測之GFAT活性被抑制約20%或更高者，較佳約30%或更高者，更佳者約50%或更高者，則所篩選之試驗化合物為可抑制本發明蛋白質或GFAT1L蛋白質部分肽之GFAT活性之化合物。

根據本發明，提供用以篩選抑制前述GFAT活性候選化合物之套組。

本發明篩選套組包括為其元素之本發明蛋白質或GFAT1L蛋白質部分肽。後文將說明本發明篩選套組之特定實例。

五、發明說明 (52)

1. 篩選套組I

[篩選試劑]

1) GFAT1L樣品：表現GFAT1-L之大腸桿菌細胞分解液(GFAT1L蛋白質之部分肽)

2) 含輔酶緩衝液：400 mM磷酸鈉緩衝液(pH 7.5)、50 mM氯化鉀、1.25 mM EDTA、0.3 mM APAD、6單位/毫升麩胺去氫酶(GDH)

3) 受質：0-6 mM果糖-6-磷酸、0-6 mM麩胺

偵測時，測定365毫微米的吸收值。

[分析方法] 將適當稀釋表現GFAT1-L之大腸桿菌細胞分解液(50微升)加至200微升受質溶液(400 mM磷酸鈉緩衝液(pH 7.5)、50 mM氯化鉀、1.25 mM EDTA、0.3 mM APAD、6單位/毫升麩胺去氫酶(GDH)、0-6 mM麩胺、0-6 mM果糖-6-磷酸(F-6-P))，所得之溶液置於96槽孔之微量盤中，在37℃下反應60分鐘，利用微量盤讀計，測定365毫微米的吸收值變化。

2. 篩選套組II

[篩選試劑]

1) 蛋白質樣品：本發明蛋白質(GFAT1L蛋白質部分肽)或其鹽類

2) 緩衝液：0.2 M磷酸鈉緩衝液(pH 8.0)

3) 受質：12 μ M果糖-6-磷酸、5 μ M麩胺

偵測時，測定650毫微米的吸收值。

[分析方法] 將試驗化合物加至含有12 μ M果糖-6-磷酸、

五、發明說明 (53)

5 μ M 麩胺、本發明蛋白質(或其鹽類)，及0.2 M 磷酸鈉緩衝液(pH 8.0)之反應混合物中，所得混合物在25℃下反應30分鐘，加入0.6 M HCl，在98℃下水解2小時，加入2.5% NaNO_2 及12.5% $\text{NH}_4\text{O}_3\text{NH}_2$ 之後再加入0.25% 2-甲基-2-苯并硫唑酮，其後加入0.5% FeCl_3 ，分析所得溶液650毫微米之吸收值。

利用本發明篩選方法或本發明篩選套組所獲之化合物或其鹽類係選自前述的試驗化合物(例如，肽、蛋白質、非肽化合物、合成化合物、發酵產物、細胞萃取物、植物萃取物、動物組織萃取物)及抑制本發明蛋白質的酵素活性(GFAT1L蛋白質部分肽)(例如GFAT活性)。這些化合物是新穎的化合物或已知的化合物。減輕低血糖症的候選化合物是種可促進本發明蛋白質(GFAT1L蛋白質部分肽)酵素活性(例如GFAT活性)之化合物。

此種化合物的鹽類之實例包括化合物與生理上可接受酸(諸如無機酸及有機酸)所形成的鹽類，或化合物與鹼(諸如鹼金屬)所形成的鹽類。酸加成鹽中的酸為生理上可接受的酸是較佳的。這些鹽類的實例包括(但不侷限於)化合物與無機酸(例如，氫氯酸、磷酸、氫溴酸、硫酸)及化合物與有機酸(例如，乙酸、甲酸、丙酸、反丁烯二酸、順丁烯二酸、琥珀酸、酒石酸、檸檬酸、蘋果酸、草酸、苯甲酸、甲烷磺酸，及苯磺酸)所形成的鹽類。

抑制本發明蛋白質(包括GFAT1L蛋白質部分肽；後文同義)酵素活性之化合物或其鹽類可作為糖尿病及糖尿病併發

五、發明說明 (54)

症的治療藥劑或預防藥劑。

促進本發明蛋白質酵素活性之化合物或其鹽類可作為低血糖症及低血糖症併發症的治療藥劑或預防藥劑。

根據本發明，可製備聚肽或結構類似物—諸如GFAT1L促進劑、GFAT1L拮抗劑、GFAT1L抑制劑—以開發可增進或阻礙活體內GFAT1L蛋白質，或使GFAT1L蛋白質衍生物成為更活性或穩定形式。以例如GFAT1L與其他蛋白質間所形成蛋白質複合物之三度結構，藉由方法來測定結構類似物，例如X-線結晶圖、電腦模型、或其組合。有關結構類似物的資訊亦可根據同質蛋白質的結構之蛋白模型獲知。

獲取更為活性或穩定形式之GFAT1L蛋白質衍生物的實例方法係丙胺酸篩選法。根據丙胺酸篩選法，丙胺酸取代某些胺基酸殘基，後測定其對肽活性的影響。因此，在肽相對胺基酸殘基所作相似的分析有助於測定肽活性或穩定性之重要區域。經由此方法，可設計出更為活性GFAT1L蛋白質衍生物或更為穩定之GFAT1L蛋白質衍生物。

利用功能分析法可分離標記-專一性抗體，並分析抗體的結晶結構。此方法特點是提供作為而後醫藥設計的藥引基礎。生產對抗功能性或醫藥活性抗體之抗-抗原決定子抗體可自化學合成或生物性合成肽之肽庫中鑑別或分離出肽。因此，所篩選出的肽預期亦可作為藥引。

因此，可設計及開發促進GFAT1L活性或穩定性及具有不同功能之藥劑，例如，抑制劑、促進劑，或拮抗劑。

五、發明說明 (55)

當獲得的GFAT1L蛋白質足夠量時，所選殖的GFAT1L序列可進行對GFAT1L蛋白質之分析研究，諸如X-線結晶法。又，SEQ ID NO：1胺基酸序列所形成之GFAT1L蛋白質可應用電腦模型技術，以取代X-線結晶法，或除了X-線結晶法外，另增電腦模型技術。

除此之外，根據本發明，可產生不含GFAT1L基因老鼠或含GFAT1L基因老鼠(突變老鼠)，而此種老鼠可用以鑑別在GFAT1L基因序列中影響前述各式GFAT1L活性的位置；換言之，也就是在活體內GFAT1L基因產物的功能或GFAT1L基因產物的變體。

所揭示的方法係利用基因同質重組作用修飾活體內基因的訊息，及其中一個實例方法係採用老鼠胚胎幹細胞(ES細胞)(Capecchi, M.R., Science, 244, 1288-1292 (1989))。

在本發明中，用以產生前述突變老鼠的方法已成為熟知技藝者間的例行性方法。以此種經適當改良過技術組合(揭示於"Jikken Igaku"特刊，14, (20), 1996; Testuo Noda 出版，Yodosha印行)修飾人類野生型GFAT1L基因或突變GFAT1L基因後，可輕易的產生突變老鼠。因此，可了解所設計及開發能促進GFAT1L活性或穩定性，並具有不同功能之藥劑，例如抑制劑、促進劑，或拮抗劑。

實例

利用下述實例可更詳細說明本發明。

實例1

五、發明說明 (56)

選殖GFAT1L及構築表現載體

為構築已知人類GFAT之表現載體(G. L. McKnight等人, J.Biol.Chem., 267, 25208-25212 (1992)), 根據人類GFAT cDNA之序列合成四種引子P1-P4。這些引子的核苷酸序列示於SEQ ID NO: 3-6。

P1核苷酸序列相對於SEQ ID NO: 2第34個至第66個核苷酸, P2核苷酸序列相對於SEQ ID NO: 2第16個至第48個核苷酸, P3核苷酸序列相對於SEQ ID NO: 2第1個至第30個核苷酸, P4核苷酸序列相對於SEQ ID NO: 2第2077個至第2097個核苷酸。為了增加在大腸桿菌細胞內的表現效率, 以增加密碼取代作用的效率, 在P1-P3下列位置處引入變異, 其稱為前進引子。P1: SEQ ID NO: 3之第6、9、12、13、15及18核苷酸處, P2: SEQ ID NO: 4之第7、9、18、24、27、30、31及33核苷酸處, P3: SEQ ID NO: 5之第22、32及34核苷酸處。

在P3相對於SEQ ID NO: 5第1至10核苷酸處引入部分的核苷酸序列, 以產生NdeI位置(CATATG), 其為插入pET載體時所需。

P4是逆向引子, 其包括緊接C-端胺基酸殘基後的XhoI位置(CTCGAG; 係SEQ ID NO: 6第1至11核苷酸的序列), 所設計的引子在XhoI位置處之前有一終止密碼(TAA)。

利用前述四種引子, 下列方法可構築在大腸桿菌細胞內表現出合成N-端胺基酸殘基之取代密碼的載體。

五、發明說明 (57)

利用引子 P4 及反轉錄酶，以人類骨骼肌 mRNA (購自 Clontech 公司) 為基礎，進行反轉錄作用之反應。人類骨骼肌 mRNA (2 微克/微升) 在 100°C 下變性 5 分鐘，後快速的置於冰上冷卻，在混合物中加入 Tris 氫氯酸 (pH=8.3 ; 50 mM)、氯化鉀 (40 mM)、氯化鎂 (6 mM)、1 mM DTT、引子 4 (0.1 mM)、BSA (0.1 毫克)、MMLV 反轉錄酶 (GIBCO BRL 公司產品：400 單位/2 微升) 及去離子水 (DDW)，使最終的體積微 50 微升，並讓混合物在 37°C 下反應 10 分鐘。

反應產物 (5 微升) 在 100°C 下變性 5 分鐘，後以下列的方式以引子 P1 及 P4 進行 PCR 反應。在反轉錄作用的產物 (5 微升) 中加入 10× 緩衝液 (5 微升)、2 mM 之 dNTPs 混合物 (5 微升)、兩種引子 (各為 0.4 μ M)、氯化鎂 (1 mM)、KOD 少量 (2.5 單位) 及 DDW，使最終體積微 50 微升。10× 緩衝液含有 Tris 氫氯酸 (pH=8.0 ; 1.2 mM)、氯化鉀 (100 mM)、硫酸銨 (60 mM)、Triton X-100 (1%) 及 BSA (0.1 毫克/毫升)。所得之混合物進行 30 次循環反應，每次循環包括 95°C 30 秒、65°C 2 秒及 74°C 60 秒；其後 74°C 5 分鐘。

所得產物 (5 微升) 以前述相似的條件進行 PCR，除了所用引子為 P2 及 P4。

所得產物 (5 微升) 以前述相似的條件進行 PCR，除了所用引子為 P3 及 P4。

最終產物選殖至 pET23b (Novagen 公司產品) 中，利用

五、發明說明 (58)

ABI377 DNA定序儀(PE-ABI公司產品)確定其DNA的序列。

最終的產物以酚/氯仿處理，並以乙醇沉澱之，其後溶解在TE緩衝液中。以限制酵素NdeI及XhoI切割DNA的兩端。

藉由鏈合作用，將經限制酵素NdeI及XhoI切割所得之DNA片段插入至pET23b載體中。

定序出所得基因的序列，發現其為新穎序列，該基因名為“GFAT1L基因”。

所得基因編碼區域之全長係為2097個核苷酸SEQ ID NO：2所組成，此鹼基序列編碼的胺基酸序列為699胺基酸殘基之SEQ ID NO：1，該基因是人類cDNA(全長：2097鹼基)，其編碼該胺基酸序列。

本發明GFAT1L基因證實為具有此序列之新穎基因，其為McKnight等人選殖之GFAT基因(McKnight, G. L.等人, J. Biol. Chem., 267, 25208-25212 (1992))的第684核苷酸及第685核苷酸位置處插入54個核苷酸，此GFAT1L基因編碼蛋白質之胺基酸序列在原胺基酸序列的第228胺基酸及第229胺基酸位置處多插入了18個胺基酸。

在下列所述試驗中，本發明分離新穎基因係為“GFAT1L基因”，而根據McKnight等人之人類GFAT基因係為“GFAT1S基因”。

實例2

利用RT-PCR研究不同器官中GFAT1L基因的表現型態

五、發明說明 (59)

，並比較GFAT1L基因與GFAT1S基因之表現型態。

以QUICK-Clone cDNA (Clontech公司產品；心臟、腦、肝臟、骨骼肌、小腸、腎臟、胰臟及脂肪)為試驗樣品。

合成並使用SEQ ID NO：7及8的引子。亦使用ExTaq (Takara Shuzo公司產品)。

先在95℃下進行PCR 1分鐘，其後進行40次循環反應，每次反應包括95℃ 30秒、55℃ 30秒，及72℃ 45秒。一部份反應產物在4%瓊脂糖膠上進行電泳，以得知每個基因的表現型態。

所得結果示於圖1中。

圖1中每行標示有說明，其相對於器官組織(括號中)如下：

標準品標記(標記)、心臟(心臟)、腦(腦)、肝臟(肝臟)、骨骼肌(骨骼肌)、腎臟(腎臟)、胰臟(胰臟)、小腸(小腸)及脂肪(脂肪)。

如圖1所示，GFAT1L基因在心臟及骨骼肌有強烈的表現，而在腦部有非常弱的表現，只有GFAT1S能在其他試驗器官中表現。

因此，咸發現本發明基因表現受控於組織專一性。

實例3

製備GFAT1L重組蛋白質

將人類GFAT1L基因或GFAT1S基因(為比較目的用)插入至pET23b載體(Novagen公司產品)中，並所得之載體

五、發明說明 (60)

轉型 BL21-CodonPlus(DE3)RIL (Stratagene 公司產品中)，將轉型細胞隔夜培養在 37°C 含有安皮西林培養液中，次日，將液態培養組織(50 毫升)加至含有安皮西林 LB 培養液(1 L)中，37°C 下再培養 90 分鐘，所得之混合物中加入 1M 異丙基 β -D-(-)-硫半乳糖基吡喃糖苷(IPTG: Wako 純化學公司產品: 2 毫升)，置於 20°C 下隔夜培養，誘發重組蛋白的表現。

所得液態培養液以 7000 rpm 速度離心 5 分鐘，以收集大腸桿菌細胞，用 0°C Dulbecco's PBS(-)(Nihon 醫藥公司產品; 50 毫升)清洗大腸桿菌細胞，其後懸浮於二硫蘇糖醇(DTT=5 mM)及含有甘油磷酸鈉緩衝液(pH 8.0; 50 mM)中，使最終體積為 40 毫升，懸浮液以超音波處理，以便將細胞打破。細胞分解液在 4°C 下以 30,000 rpm 速度離心 30 分鐘，去除不溶的物質。

在前述的方式中，可獲得含有所要蛋白質之澄清液，分裝澄清液(每毫升)，利用液態氮急速冷凍，保存在 -80°C 直至使用。

實例 4

研究 GFAT1L 及 GFAT1S 間特徵的差異

1 GFAT 活性分析方法

根據下述 Marshall 等人以微量盤(96 槽孔)光學法測定法方式(Journal of Biological Chemistry, 第 266 冊, 第 8 卷, 4706-4712 (1991))測定 GFAT 活性。GFAT 所產生的麩胺與麩胺去氫 (GDH)反應，在還原反應期間，輔酶

五、發明說明 (61)

APAD同時反應成APADH，APAD還原成APADH後所伴隨的吸收值改變視為GFAT的活性。

簡而言之，在適當稀釋之引入GFAT1L或GFAT1S基因之大腸桿菌細胞分解液(50微升)中加入含有磷酸鈉緩衝液(pH=7.5；40 mM)、氯化鉀(50 mM)、EDTA (1.25 mM)、APAD (0.3 mM)、GDH (6單位/毫升)、麩胺(0-6 mM)及果糖-6-磷酸(F-6-P：0-6 mM)之受質溶液(200微升)，讓混合物在37℃下反應60分鐘，以微量盤讀計測定反應後365毫微米之吸收值變化。

2. GFAT1L及GFAT1S間酵素行為的差異

為了研究GFAT1L及GFAT1S間酵素行為的差異，以麩胺及F-6-P為受質，測定Km值。Km值係根據酵素受質濃度(S)與酵素活性(反應速率(v))所求之S/v-S圖形及v-v/S圖形計算而得。利用S/v-S圖形，X軸與圖形線交叉處求得Km值(相對於“-Km”之交叉點)，而利用v-v/S圖形，Km值則是由圖線的斜率求得(斜率=-Km)。

因為已有報告指出UDP-N-乙醯基葡糖胺(UDP-GlcNAc)可抑制GFAT活性(Journal of Biological Chemistry第241冊，1705-1712 (1966))，因此亦測定其抑制型態。從圖形所得之圖線外觀測定之抑制型態與前述相似。

所得之結果示於圖2及3與表1中。

圖2顯示以F-6-P為受質時，UDP-GlcNAc抑制GFAT1S及GFAT1L的抑制型態，Y軸為酵素的反應速率v，而X軸為(反應速率(v))/(酵素受質的濃度(s))。

五、發明說明 (62)

在圖2中，左邊圖形是GFAT1S所得結果，而右邊圖形是GFAT1L所得的結果。在兩個圖形中，線(1)係未添加UDP-GlcNAc所得之結果，線(2)係添加UDP-GlcNAc (30 μ M)而線(3)係添加UDP-GlcNAc (100 μ M)所得之結果。

如圖2所示，GFAT1S及GFAT1L之 K_m 值分別為90 μ M及478 μ M，咸發現抑制GFAT活性的抑制型態分別是“競爭抑制”(GFAT1S情形)及“混合抑制”(GFAT1L情形)。

圖3顯示以麩胺為受質時，UDP-GlcNAc抑制GFAT1S及GFAT1L的抑制型態，Y軸為酵素的反應速率(v)，而X軸為(反應速率(v))/(酵素受質的濃度(s))比率。

在圖3中，左邊圖形是GFAT1S所得結果，而右邊圖形是GFAT1L所得的結果。在圖形中，線(1)係未添加UDP-GlcNAc所得之結果，線(2)係添加UDP-GlcNAc (10 μ M)而線(3)係添加UDP-GlcNAc (30 μ M)所得之結果，而線(4)則是添加UDP-GlcNAc (100 μ M)所得之結果。

如圖3所示，GFAT1S及GFAT1L之 K_m 值分別為822 μ M及804 μ M，咸發現抑制GFAT活性的抑制型態分別是“非競爭抑制”(GFAT1S情形)及“混合抑制”(GFAT1L情形)。

五、發明說明 (63)

表 1

		GFAT1S	GFAT1L
Km 值 (μ M)	F-6-P	78-118	458-478
	麩胺	761-822	804-812
抑制型態	麩胺	非競爭抑制	混合抑制
	F-6-P	競爭抑制	混合抑制

圖 2 及圖 3 及表 1 中顯示，當受質為 F-6-P 時，GFAT1S(約 100 μ M) 及 GFAT1L(約 500 μ M) 的 Km 值有明顯的差異，然以麩胺為受質時，GFAT1S(約 800 μ M) 及 GFAT1L(約 800 μ M) 的 Km 值則無明顯的差異。

UDP-GlcNAc 呈現的抑制型態如下：當 F-6-P 為受質時，是以競爭抑制型態抑制 GFAT1S，以同時發生競爭抑制及非競爭抑制之混合抑制型態抑制 GFAT1L；然以麩胺為受質時，係以非競爭抑制型態抑制 GFAT1S，而係同時發生非競爭抑制及其他的抑制之混合抑制型態抑制 GFAT1L。

從前述的結果，證實根據本發明 GFAT1L 及人類 GFAT 間酵素行為的下列差異，(1) 以 F-6-P 為受質時，本發明 GFAT1L 的 Km 值較人類 GFAT 者高約 5 倍；(2) UDP-GlcNAc 係以不同的型態抑制。

3. 研究 GFAT1L 對胰島素抗性的效應

已報告指出 GFAT 可影響活體外及活體內試驗之胰島素抗性，然而，利用本發明基因發現存在兩種 GFAT 次型；

五、發明說明 (64)

換言之，GFAT1L及人類GFAT (GFAT1S)。後文將討論GFAT1L或人類GFAT (GFAT1S)影響胰島素抗性的程度。

通常，健康人體之骨骼肌藉胰島素刺激後會約有70%血糖會代謝，相反地，咸報告第二型糖尿病患之骨骼肌中葡萄糖的利用性則低到30%，而其他器官組織中的葡萄糖利用性與健康人體中者相同(Journal of Clinical Investigation, 76 (1), 149-155 (1985))。因此，骨骼肌被視為具有顯著的胰島素抗性。咸發現本發明GFAT1L可在骨骼肌中表現，而GFAT1S則否，因此，本發明GFAT1L被視為可影響其顯著的胰島素抗性。

從GFAT1S及GFAT1L酵素行為的研究顯示，(1)以F-6-P為受質時，本發明GFAT1L的Km值較GFAT1S者高約5倍；(2)因為細胞內麩胺的濃度為4-5 mM，根據細胞內F-6-P濃度之GFAT活性，與先前報導(3)第II型糖尿病病患紅血球中F-6-P濃度為數10 μ M (Horm. Metabol. Res., 14, 233-236 (1982))，推測後文。

簡而言之，如圖4所示，報告中所指GFAT活性係根據F-6-P濃度推測，濃度與Km值相近時，GFAT1S維持穩定，而GFAT1L則很難活化。

圖4是GFAT1S及GFAT1L(GFAT活化狀態)之酵素反應曲線。Y軸為酵素反應速率(v)，而X軸為細胞內F-6-P濃度(μ M)。濃度較高時，有較多量的葡萄糖流入細胞內。圖4中，粗線係文獻報導中非胰島素依賴糖尿病病患紅血球中

五、發明說明 (65)

F-6-P濃度，而粗線箭頭所指為胰島素抗性。

除此之外，後述如下。以胰島素刺激後，細胞攝入葡萄糖會增加，此情況下，對GFAT1S而言，因為酵素反應達到Vmax，當葡萄糖再流入細胞內，GFAT活性會飽和，不會進一步活化。相反地，以本發明GFAT1L而言，當葡萄糖流入細胞內的含量增加時，GFAT會活化，於是代謝物會增加，因而會抑制葡萄糖轉送受體自細胞膜移送至細胞內，導致血糖的增加(假設GFAT1L的Vmax與GFAT1S者幾乎相同)。

因此，與GFAT1S比較，本發明GFAT1L被視為與胰島素抗性有關。因此，結論是本發明GFAT1L在胰島素抗性機制上扮演重要的角色。

工業應用

本發明提供GFAT1L基因，其編碼與人類GFAT同質之新穎人類蛋白質同質體。

本發明基因在骨骼肌及心臟中可高度表現，這些組織是糖代謝作用重要的組織，而該基因被視為可促進此種組織及週邊組織中GFAT的活性，或是糖解作用系統中六碳糖胺的生物合成途徑。除此之外，該基因被視為可避免葡萄糖轉送受體移送至細胞膜上，因此，因為該基因可有效的調節糖代謝系統中血糖的含量，分析該基因GFAT活性的表現程度可用以研究與該基因相關功能與糖代謝相關及疾病的關係。明確言之，該基因可用以基因診斷患有低血糖症或糖尿病之患者，並可用以研究對抗該基因或表現產物

五、發明說明 (66)

或反向DNA產物之抗體之醫藥應用。

利用本發明基因，可研究基因在各式組織之表現，及分析基因在活體中功能。

利用該基因，利用遺傳工程技術可大量生產該基因所編碼的GFAT1L蛋白質，所提供的蛋白質可研究GFAT1L活性及GFAT1L蛋白質的鍵結活性。

本發明蛋白質可用以闡明、診斷及治療與GFAT1L基因或其表現產物相關疾病(例如，與GFAT活性或糖解作用系統中調節六碳糖胺生物合成途徑之相關疾病；與低血糖症及血糖含量調節作用相關之疾病；低血糖症；糖尿病；及糖尿病併發症，諸如糖尿病腎臟病變、糖尿病視網膜病變及糖尿病神經病變)。

本發明亦提供含有本發明基因反向寡核苷酸之基因引入載體，該載體可作為基因治療用；含有進入細胞之GFAT1L反向寡核苷酸(活性成分)及載體或細胞之基因治療劑；及採用該治療劑的基因治療方法。

本發明亦提供含有活性成分之本發明基因之反向寡核苷酸、可鍵結至GFAT1L之抗體，或抗體片段之藥劑，該藥劑可預防骨骼肌(特別，是骨骼肌的平滑細胞)GFAT mRNA的表現，因此可用以治療諸如糖尿病及糖尿病併發症之疾病及病理病徵。

本發明亦提供一種篩選會抑制GFAT1L蛋白質酵素活性及GFAT1L基因表現產物之候選化合物，及可用以治療糖尿病的方法及套組。

五、發明說明 (67)

序列清單

<110> Otsuka醫藥有限公司

<120> 新穎酵素基因及其表現產物

<130> OP0036

<150> JP P2000-176631

<151> 2000-06-13

<150> JP P2000-290679

<151> 2000-09-25

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 699

<212> PRT

<213> 人類骨骼肌

<400> 1

Met	Cys	Gly	Ile	Phe	Ala	Tyr	Leu	Asn	Tyr	His	Val	Pro	Arg	Thr	Arg
1				5					10					15	
Arg	Glu	Ile	Leu	Glu	Thr	Leu	Ile	Lys	Gly	Leu	Gln	Arg	Leu	Glu	Tyr
		20						25					30		
Arg	Gly	Tyr	Asp	Ser	Ala	Gly	Val	Gly	Phe	Asp	Gly	Gly	Asn	Asp	Lys
		35					40					45			
Asp	Trp	Glu	Ala	Asn	Ala	Cys	Lys	Ile	Gln	Leu	Ile	Lys	Lys	Lys	Gly
	50					55				60					
Lys	Val	Lys	Ala	Leu	Asp	Glu	Glu	Val	His	Lys	Gln	Gln	Asp	Met	Asp
	65				70				75					80	
Leu	Asp	Ile	Glu	Phe	Asp	Val	His	Leu	Gly	Ile	Ala	His	Thr	Arg	Trp
			85					90					95		
Ala	Thr	His	Gly	Glu	Pro	Ser	Pro	Val	Asn	Ser	His	Pro	Gln	Arg	Ser
		100					105					110			
Asp	Lys	Asn	Asn	Glu	Phe	Ile	Val	Ile	His	Asn	Gly	Ile	Ile	Thr	Asn
	115					120					125				
Tyr	Lys	Asp	Leu	Lys	Lys	Phe	Leu	Glu	Ser	Lys	Gly	Tyr	Asp	Phe	Glu
	130				135					140					
Ser	Glu	Thr	Asp	Thr	Glu	Thr	Ile	Ala	Lys	Leu	Val	Lys	Tyr	Met	Tyr
	145				150				155				160		
Asp	Asn	Arg	Glu	Ser	Gln	Asp	Thr	Ser	Phe	Thr	Thr	Leu	Val	Glu	Arg
			165				170					175			
Val	Ile	Gln	Gln	Leu	Glu	Gly	Ala	Phe	Ala	Leu	Val	Phe	Lys	Ser	Val

- 70 -

五、發明說明 (68)

180	185	190
His Phe Pro Gly Gln Ala Val	Gly Thr Arg Arg Gly Ser Pro Leu Leu	
195	200	205
Ile Gly Val Arg Ser Glu His Lys Leu Ser Thr Asp His Ile Pro Ile		
210	215	220
Leu Tyr Arg Thr Ala Arg Thr Gln Ile Gly Ser Lys Phe Thr Arg Trp		
225	230	235
Gly Ser Gln Gly Glu Arg Gly Lys Asp Lys Lys Gly Ser Cys Asn Leu		
245	250	255
Ser Arg Val Asp Ser Thr Thr Cys Leu Phe Pro Val Glu Glu Lys Ala		
260	265	270
Val Glu Tyr Tyr Phe Ala Ser Asp Ala Ser Ala Val Ile Glu His Thr		
275	280	285
Asn Arg Val Ile Phe Leu Glu Asp Asp Asp Val Ala Ala Val Val Asp		
290	295	300
Gly Arg Leu Ser Ile His Arg Ile Lys Arg Thr Ala Gly Asp His Pro		
305	310	315
Gly Arg Ala Val Gln Thr Leu Gln Met Glu Leu Gln Gln Ile Met Lys		
325	330	335
Gly Asn Phe Ser Ser Phe Met Gln Lys Glu Ile Phe Glu Gln Pro Glu		
340	345	350
Ser Val Val Asn Thr Met Arg Gly Arg Val Asn Phe Asp Asp Tyr Thr		
355	360	365
Val Asn Leu Gly Gly Leu Lys Asp His Ile Lys Glu Ile Gln Arg Cys		
370	375	380
Arg Arg Leu Ile Leu Ile Ala Cys Gly Thr Ser Tyr His Ala Gly Val		
385	390	395
Ala Thr Arg Gln Val Leu Glu Glu Leu Thr Glu Leu Pro Val Met Val		
405	410	415
Glu Leu Ala Ser Asp Phe Leu Asp Arg Asn Thr Pro Val Phe Arg Asp		
420	425	430
Asp Val Cys Phe Phe Leu Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Leu		
435	440	445
Met Gly Leu Arg Tyr Cys Lys Glu Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile		
450	455	460
Thr Asn Thr Val Gly Ser Ser Ile Ser Arg Glu Thr Asp Cys Gly Val		
465	470	475
His Ile Asn Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val Ala Ser Thr Lys Ala Tyr		
485	490	495
Thr Ser Gln Phe Val Ser Leu Val Met Phe Ala Leu Met Met Cys Asp		
500	505	510
Asp Arg Ile Ser Met Gln Glu Arg Arg Lys Glu Ile Met Leu Gly Leu		
515	520	525
Lys Arg Leu Pro Asp Leu Ile Lys Glu Val Leu Ser Met Asp Asp Glu		
530	535	540
Ile Gln Lys Leu Ala Thr Glu Leu Tyr His Gln Lys Ser Val Leu Ile		

五、發明說明 (69)

545 550 555 560
 Met Gly Arg Gly Tyr His Tyr Ala Thr Cys Leu Glu Gly Ala Leu Lys
 565 570 575
 Ile Lys Glu Ile Thr Tyr Met His Ser Glu Gly Ile Leu Ala Gly Glu
 580 585 590
 Leu Lys His Gly Pro Leu Ala Leu Val Asp Lys Leu Met Pro Val Ile
 595 600 605
 Met Ile Ile Met Arg Asp His Thr Tyr Ala Lys Cys Gln Asn Ala Leu
 610 615 620
 Gln Gln Val Val Ala Arg Gln Gly Arg Pro Val Val Ile Cys Asp Lys
 625 630 635 640
 Glu Asp Thr Glu Thr Ile Lys Asn Thr Lys Arg Thr Ile Lys Val Pro
 645 650 655
 His Ser Val Asp Cys Leu Gln Gly Ile Leu Ser Val Ile Pro Leu Gln
 660 665 670
 Leu Leu Ala Phe His Leu Ala Val Leu Arg Gly Tyr Asp Val Asp Phe
 675 680 685
 Pro Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val Glu
 690 695

<210> 2

<211> 2097

<212> DNA

<213> 人類骨骼肌 mRNA

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (2097)

<400> 2

atg tgt ggt ata ttt gct tac tta aac tac cat gtt cct cga acg aga 48
 Met Cys Gly Ile Phe Ala Tyr Leu Asn Tyr His Val Pro Arg Thr Arg
 1 5 10 15
 cga gaa atc ctg gag acc cta atc aaa ggc ctt cag aga ctg gag tac 96
 Arg Glu Ile Leu Glu Thr Leu Ile Lys Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr
 20 25 30
 aga gga tat gat tct gct ggt gtg gga ttt gat gga ggc aat gat aaa 144
 Arg Gly Tyr Asp Ser Ala Gly Val Gly Phe Asp Gly Gly Asn Asp Lys
 35 40 45
 gat tgg gaa gcc aat gcc tgc aaa atc cag ctt att aag aag aaa gga 192
 Asp Trp Glu Ala Asn Ala Cys Lys Ile Gln Leu Ile Lys Lys Lys Gly
 50 55 60
 aaa gtt aag gca ctg gat gaa gaa gtt cac aag caa caa gal atg gat 240
 Lys Val Lys Ala Leu Asp Glu Glu Val His Lys Gln Gln Asp Met Asp
 65 70 75 80
 ttg gat ata gaa ttt gat gta cac ctt gga ata gct cat acc cgt tgg 288

五、發明說明 (70)

Leu Asp Ile Glu Phe Asp Val His Leu Gly Ile Ala His Thr Arg Trp	
85 90 95	
gca aca cat gga gaa ccc agt cct gtc aat agc cac ccc cag cgc tct	336
Ala Thr His Gly Glu Pro Ser Pro Val Asn Ser His Pro Gln Arg Ser	
100 105 110	
gat aaa aat aat gaa ttt atc gtt att cac aat gga atc atc acc aac	384
Asp Lys Asn Asn Glu Phe Ile Val Ile His Asn Gly Ile Ile Thr Asn	
115 120 125	
tac aaa gac ttg aaa aag ttt ttg gaa agc aaa ggc tat gac ttc gaa	432
Tyr Lys Asp Leu Lys Lys Phe Leu Glu Ser Lys Gly Tyr Asp Phe Glu	
130 135 140	
tct gaa aca gac aca gag aca att gcc aag ctc gtt aag tat atg tat	480
Ser Glu Thr Asp Thr Glu Thr Ile Ala Lys Leu Val Lys Tyr Met Tyr	
145 150 155 160	
gac aat cgg gaa agt caa gat acc agc ttt act acc ttg gtg gag aga	528
Asp Asn Arg Glu Ser Gln Asp Thr Ser Phe Thr Thr Leu Val Glu Arg	
165 170 175	
gtt atc caa caa ttg gaa ggt gct ttt gca ctt gtg ttt aaa agt gtt	576
Val Ile Gln Gln Leu Glu Gly Ala Phe Ala Leu Val Phe Lys Ser Val	
180 185 190	
cat ttt ccc ggg caa gca gtt ggc aca agg cga ggt agc cct ctg ttg	624
His Phe Pro Gly Gln Ala Val Gly Thr Arg Arg Gly Ser Pro Leu Leu	
195 200 205	
att ggt gta cgg agt gaa cat aaa ctt tct act gat cac att cct ata	672
Ile Gly Val Arg Ser Glu His Lys Leu Ser Thr Asp His Ile Pro Ile	
210 215 220	
ctc tac aga aca gct agg act cag att gga tca aaa ttc aca cgg tgg	720
Leu Tyr Arg Thr Ala Arg Thr Gln Ile Gly Ser Lys Phe Thr Arg Trp	
225 230 235 240	
gga tca cag gga gaa aga ggc aaa gac aag aaa gga agc tgc aat ctc	768
Gly Ser Gln Gly Glu Arg Gly Lys Asp Lys Lys Gly Ser Cys Asn Leu	
245 250 255	
tct cgt gtg gac agc aca acc tgc ctt ttc ccg gtg gaa gaa aaa gca	816
Ser Arg Val Asp Ser Thr Thr Cys Leu Phe Pro Val Glu Glu Lys Ala	
260 265 270	
gtg gag tat tac ttt gct tct gat gca agt gct gtc ata gaa cac acc	864
Val Glu Tyr Tyr Phe Ala Ser Asp Ala Ser Ala Val Ile Glu His Thr	
275 280 285	
aat cgc gtc atc ttt ctg gaa gat gat gat gtt gca gca gla gtg gat	912
Asn Arg Val Ile Phe Leu Glu Asp Asp Asp Val Ala Ala Val Val Asp	
290 295 300	
gga cgt ctt tct atc cat cga att aaa cga act gca gga gat cac ccc	960
Gly Arg Leu Ser Ile His Arg Ile Lys Arg Thr Ala Gly Asp His Pro	
305 310 315 320	
gga cga gct gtg caa aca ctc cag atg gaa ctc cag cag atc atg aag	1008
Gly Arg Ala Val Gln Thr Leu Gln Met Glu Leu Gln Gln Ile Met Lys	

五、發明說明 (71)

325	330	335	
ggc aac ttc agt tca ttt atg cag aag gaa ata ttt gag cag cca gag			1056
Gly Asn Phe Ser Ser Phe Met Gln Lys Glu Ile Phe Glu Gln Pro Glu			
340	345	350	
tct gtc gtg aac aca atg aga gga aga gtc aac ttt gat gac tat act			1104
Ser Val Val Asn Thr Met Arg Gly Arg Val Asn Phe Asp Asp Tyr Thr			
355	360	365	
gtg aat ttg ggt ggt ttg aag gat cac ata aag gag atc cag aga tgc			1152
Val Asn Leu Gly Gly Leu Lys Asp His Ile Lys Glu Ile Gln Arg Cys			
370	375	380	
cgg cgt ttg att ctt att gct tgt gga aca agt tac cat gct ggt gla			1200
Arg Arg Leu Ile Leu Ile Ala Cys Gly Thr Ser Tyr His Ala Gly Val			
385	390	395	400
gca aca cgt caa gtt ctt gag gag ctg act gag ttg cct gtg atg gtg			1248
Ala Thr Arg Gln Val Leu Glu Glu Leu Thr Glu Leu Pro Val Met Val			
405	410	415	
gaa cta gca agt gac ttc ctg gac aga aac aca cca gtc ttt cga gat			1296
Glu Leu Ala Ser Asp Phe Leu Asp Arg Asn Thr Pro Val Phe Arg Asp			
420	425	430	
gat gtt tgc ttt ttc ctt agt caa tca ggt gag aca gca gat act ttg			1344
Asp Val Cys Phe Phe Leu Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Leu			
435	440	445	
atg ggt ctt cgt tac tgt aag gag aga gga gct tta act gtg ggg atc			1392
Met Gly Leu Arg Tyr Cys Lys Glu Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile			
450	455	460	
aca aac aca gtt ggc agt tcc ata tca cgg gag aca gat tgt gga gtt			1440
Thr Asn Thr Val Gly Ser Ser Ile Ser Arg Glu Thr Asp Cys Gly Val			
465	470	475	480
cat att aat gct ggt cct gag att ggt gtg gcc agt aca aag gct tat			1488
His Ile Asn Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val Ala Ser Thr Lys Ala Tyr			
485	490	495	
acc agc cag ttt gla tcc ctt gtg atg ttt gcc ctt atg atg tgt gat			1536
Thr Ser Gln Phe Val Ser Leu Val Met Phe Ala Leu Met Met Cys Asp			
500	505	510	
gat cgg atc tcc atg caa gaa aga cgc aaa gag atc atg ctt gga ttg			1584
Asp Arg Ile Ser Met Gln Glu Arg Arg Lys Glu Ile Met Leu Gly Leu			
515	520	525	
aaa cgg ctg cct gat ttg att aag gaa gla ctg agc atg gat gac gaa			1632
Lys Arg Leu Pro Asp Leu Ile Lys Glu Val Leu Ser Met Asp Asp Glu			
530	535	540	
att cag aaa cta gca aca gaa ctt tat cat cag aag tca gtt ctg ata			1680
Ile Gln Lys Leu Ala Thr Glu Leu Tyr His Gln Lys Ser Val Leu Ile			
545	550	555	560
atg gga cga ggc tat cat tat gct act tgt ctt gaa ggg gca ctg aaa			1728
Met Gly Arg Gly Tyr His Tyr Ala Thr Cys Leu Glu Gly Ala Leu Lys			
565	570	575	

五、發明說明 (72)

atc aaa gaa att act tat atg cac tct gaa ggc atc ctt gct ggt gaa 1776
 ile Lys Glu Ile Thr Tyr Met His Ser Glu Gly Ile Leu Ala Gly Glu
 580 585 590

ttg aaa cat ggc cct ctg gct ttg gtg gat aaa ttg atg cct gig atc 1824
 Leu Lys His Gly Pro Leu Ala Leu Val Asp Lys Leu Met Pro Val Ile
 595 600 605

atg atc atc atg aga gat cac act tat gcc aag tgt cag aat gct ctt 1872
 Met Ile Ile Met Arg Asp His Thr Tyr Ala Lys Cys Gln Asn Ala Leu
 610 615 620

cag caa gtg gtt gct cgg cag ggg cgg cct gtg gta att tgt gat aag 1920
 Gln Gln Val Val Ala Arg Gln Gly Arg Pro Val Val Ile Cys Asp Lys
 625 630 635 640

gag gat act gag acc att aag aac aca aaa aga acg atc aag gig ccc 1968
 Glu Asp Thr Glu Thr Ile Lys Asn Thr Lys Arg Thr Ile Lys Val Pro
 645 650 655

cac tca gtg gac tgc ttg cag ggc att ctg agc gtg atc cct tta cag 2016
 His Ser Val Asp Cys Leu Gln Gly Ile Leu Ser Val Ile Pro Leu Gln
 660 665 670

ttg ctg gct ttc cac ctt gct gtg ctg aga ggc tat gat gtt gat ttc 2064
 Leu Leu Ala Phe His Leu Ala Val Leu Arg Gly Tyr Asp Val Asp Phe
 675 680 685

cca cgg aat ctt gcc aaa tct gtg act gta gag 2097
 Pro Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val Glu
 690 695

<210> 3
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 引子 P1

<400> 3
 gtccgcgta ctgcctgga aatcctggag acc 33

<210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 引子 P2

<400> 4
 gcttacciga actaccacgt tccgcglacl cgl 33

<210> 5
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 引子 P3

五、發明說明 (73)

<400> 5	
tttttttcat atgtgttgga tctttgctta cctgaactac	40
<210> 6	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 引子 P4	
<400> 6	
ccctcgagtt actctacagt cacagatttg gc	32
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 引子	
<400> 7	
agccctctgt tgalitggtgt	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 引子	
<400> 8	
tccaatcigga ggtttgcac	20

裝
訂
線

四、中文發明摘要(發明之名稱：新穎酵素基因及其表現產物)

本發明揭示一種包括編碼SEQ ID NO：1胺基酸序列所組成的聚肽之基因；該基因表現產生之基因表現產物；包括該基因的重組表現載體；帶有該重組表現載體之宿主細胞(轉型細胞)；由SEQ ID NO：1胺基酸序列所組成之蛋白質；包含以前述基因或蛋白質為活性成分之治療或預防低血糖症的組合物；及能夠鍵結至該蛋白質的抗體。利用本發明基因或其表現產物，可闡述糖尿病的病理學，及經由新穎的作用機制，開發出治療及預防糖尿病的藥劑。

英文發明摘要(發明之名稱：NOVEL ENZYME GENE AND EXPRESSION PRODUCT THEREOF)

The present invention is drawn to a gene comprising a polynucleotide encoding a polypeptide composed of an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1; a gene expression product produced through expression of the gene; a recombinant expression vector including the gene; a host cell (transformant) harboring the recombinant expression vector; a protein composed of an amino acid having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1; a therapeutic or preventive composition for hypoglycemia containing as an active ingredient the above-mentioned gene or protein; and an antibody capable of binding to the protein. Through use of the gene or an expression product thereof of the present

四、中文發明摘要(發明之名稱: 新穎酵素基因及其表現產物)

英文發明摘要(發明之名稱: NOVEL ENZYME GENE AND EXPRESSION
PRODUCT THEREOF)

invention, it is possible to elucidate the pathology of diabetes and develop drugs for treatment and prevention of diabetes via a new action mechanism.

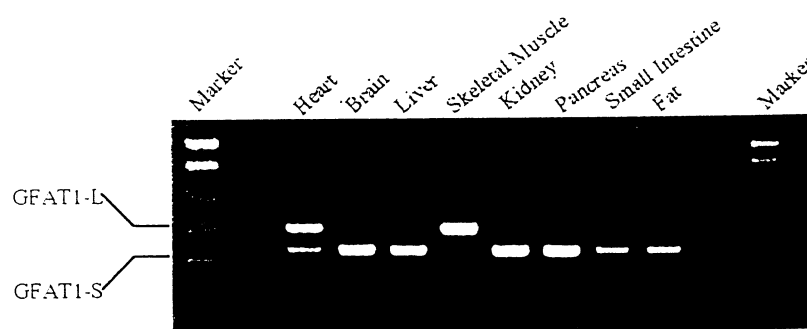


圖 1

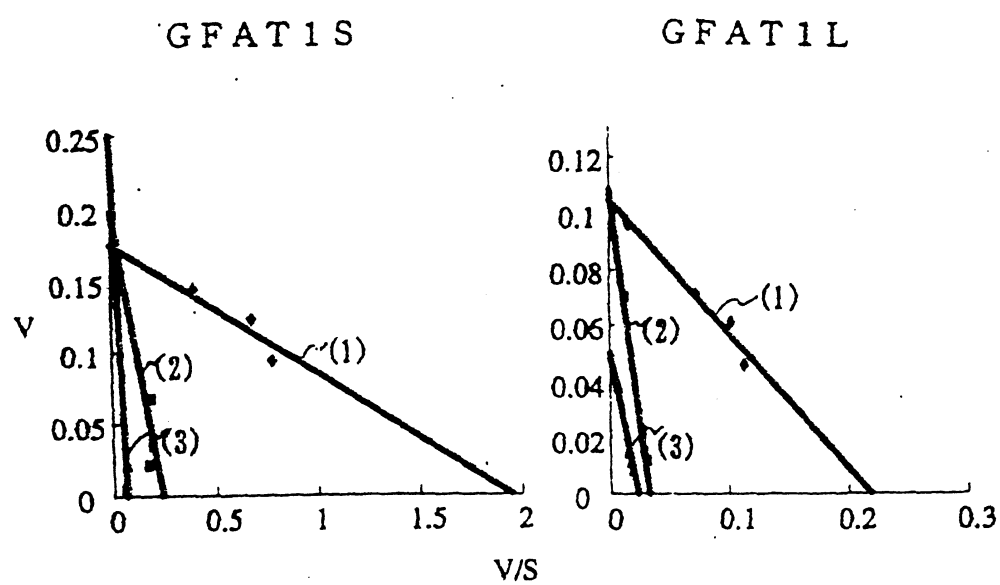


圖 2

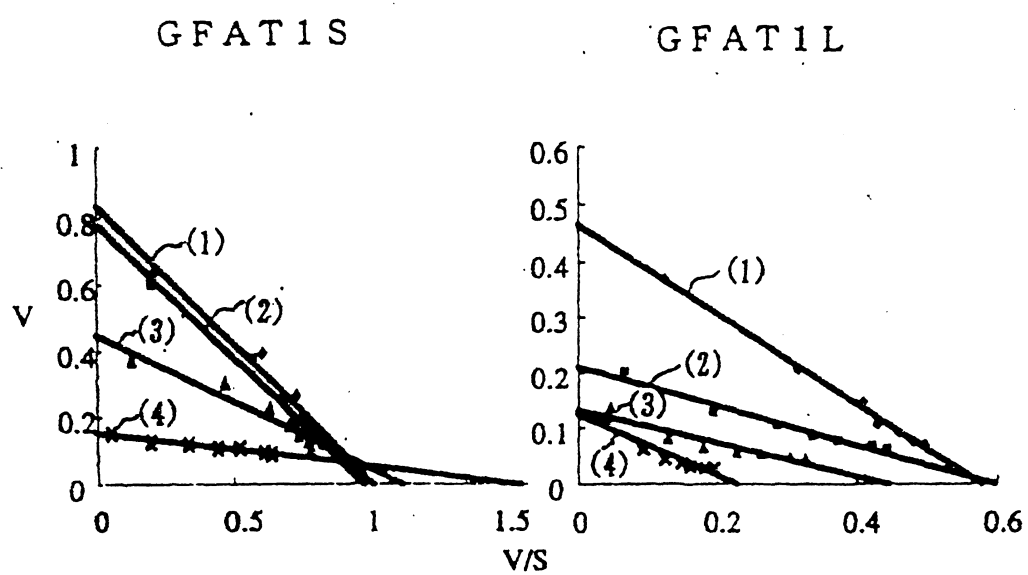
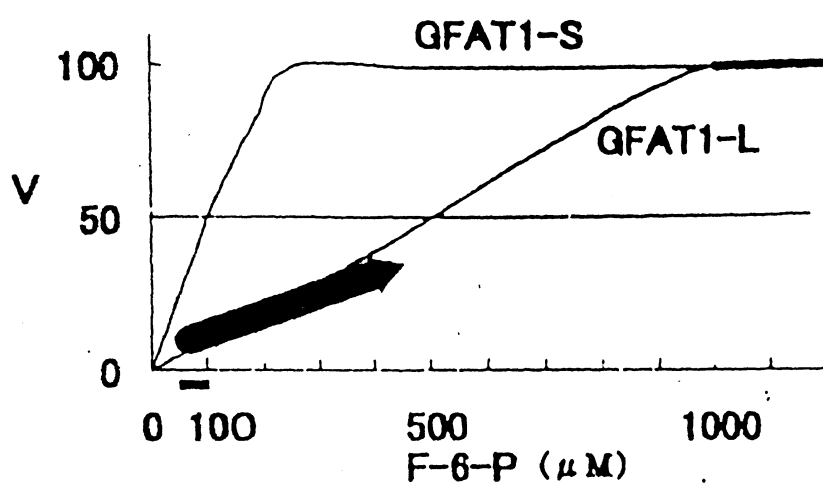


圖 3



六、申請專利範圍

1. 一種基因，其係包含下列(a)或(b)之聚核苷酸或彼等之互補股，其係可於心臟或骨骼肌高度表現：
 - (a) 編碼SEQ ID NO：1胺基酸序列所組成的聚肽之聚核苷酸；
 - (b) 編碼由與上述SEQ ID NO：1胺基酸序列具有98%以上相似度之胺基酸序列所組成之聚肽之聚核苷酸。
2. 一種基因，其包括下列(a)或(b)之聚核苷酸或彼等之互補股，其係可於心臟或骨骼肌高度表現：
 - (a) 由SEQ ID NO：2核苷酸序列所組成之聚核苷酸或其互補股；或
 - (b) 高度嚴苛條件下，可與由SEQ ID NO：2之第685~738聚核苷酸雜化的聚核苷酸。
3. 一種如SEQ ID NO：2所示之鹼基序列之基因。
4. 一種表現申請專利範圍第2或3項之基因所產生之基因表現產物。
5. 一種重組表現載體之製造方法，其特徵在於該重組載體包含申請專利範圍第2或3項之基因。
6. 一種宿主細胞之製造方法，其特徵在於該宿主細胞帶有申請專利範圍第5項之重組表現載體。
7. 一種轉形體之製造方法，其特徵在於該轉體係經申請專利範圍第5項之重組表現載體轉形。
8. 一種具有下列(a)及(b)之特徵之GFAT1L蛋白質，其係可於心臟或骨骼肌高度表現：

六、申請專利範圍

- (a) 由SEQ ID NO：1之胺基酸序列所組成之蛋白質；
- (b) 由與上述(a)胺基酸序列具有98%上之相似度之胺基酸序列所組成之蛋白質。

9.一種由SEQ ID NO：1之胺基酸序列所組成之蛋白質。