

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第4423038号
(P4423038)

(45) 発行日 平成22年3月3日(2010.3.3)

(24) 登録日 平成21年12月11日(2009.12.11)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

G O 1 N 33/15 (2006.01)

G O 1 N 33/15 Z

G O 1 N 33/50 (2006.01)

G O 1 N 33/50 Z

C O 7 K 14/435 (2006.01)

C O 7 K 14/435

請求項の数 3 (全 93 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|-----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2003-551302 (P2003-551302) | (73) 特許権者 | 504029617 |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年10月3日 (2002.10.3) | | セローノ ジェネティクス インスティテ |
| (65) 公表番号 | 特表2005-511088 (P2005-511088A) | | ュート ソシエテ アノニム |
| (43) 公表日 | 平成17年4月28日 (2005.4.28) | | フランス国, 91000 エブリー, ルー |
| (86) 国際出願番号 | PCT/IB2002/004598 | | ト ナショナル 7 |
| (87) 国際公開番号 | W02003/050281 | (74) 代理人 | 100094145 |
| (87) 国際公開日 | 平成15年6月19日 (2003.6.19) | | 弁理士 小野 由己男 |
| 審査請求日 | 平成17年8月12日 (2005.8.12) | (72) 発明者 | シュマコフ, イリヤ |
| (31) 優先権主張番号 | 60/327, 725 | | フランス, エフ-77000 ボーラー |
| (32) 優先日 | 平成13年10月5日 (2001.10.5) | | ペニル, ルー デラ ヌー, 691 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (72) 発明者 | ゲラシメンコ, オクサナ |
| 前置審査 | | | フランス, エフ-91160, ギフ-シュ |
| | | | ール-イヴェット, アヴェニュー ドゥ |
| | | | ジェネラル レクレ, 160 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 G Z I P ポリヌクレオチドおよびポリペプチドならびにその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H L A クラス I 重鎖に対して相同性を有するポリペプチドへの A P M 1 ポリペプチド又は A P M 1 ポリペプチド断片の結合を阻害するアンタゴニストをスクリーニングする方法であって、

a) 試験化合物の存在下又は非存在下で、配列番号：4 による A P M 1 ポリペプチド又は配列番号：4 の 1 0 8 ~ 2 4 4 のアミノ酸を含む A P M 1 ポリペプチド断片を、配列番号：2 の 2 1 ~ 2 9 8 のアミノ酸又は配列番号：3 の 1 8 ~ 2 9 5 のアミノ酸を含む H L A クラス I 重鎖に対して相同性を有するポリペプチドに接触させ、

b) 試験化合物の存在下又は非存在下で、配列番号：4 による A P M 1 ポリペプチド又は配列番号：4 の 1 0 8 ~ 2 4 4 のアミノ酸を含む A P M 1 ポリペプチド断片への、配列番号：2 の 2 1 ~ 2 9 8 のアミノ酸又は配列番号：3 の 1 8 ~ 2 9 5 のアミノ酸を含む H L A クラス I 重鎖に対して相同性を有するポリペプチドの結合を検出することを含むスクリーニング方法。

【請求項 2】

H L A クラス I 重鎖に対して相同性を有するポリペプチドが、

a) 配列番号：2 の 1 0 1 ~ 2 7 2、1 2 1 ~ 2 9 8、5 9 ~ 2 4 2、2 2 1 ~ 2 9 8、1 4 5 ~ 2 9 8、2 2 1 ~ 2 4 2、2 1 ~ 2 9 8、2 0 3 ~ 2 9 8、2 0 9 ~ 2 9 8、1 8 0 ~ 2 5 1、1 9 2 ~ 2 5 1、2 0 4 ~ 2 5 1、2 2 1 ~ 2 5 1、2 1 ~ 2 4 6、2 1 ~ 2 5 0 位のアミノ酸、または

b) 配列番号: 3の98~269、118~295、56~239、218~295、142~295、218~239、18~295、200~295、206~295、177~248、189~248、201~248、218~248、18~243、18~247位のアミノ酸を含む断片である請求項1の方法。

【請求項3】

試験化合物が抗体、タンパク質またはペプチドである請求項1又は2の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、代謝研究の分野、特に体重を減らすのに有効であり、かつ代謝関連疾患および障害を治療するのに有用である、化合物の発見に関する。本発明の方法によって治療されると考えられる代謝関連疾患または障害としては、限定されないが、高脂質血症、アテローム性動脈硬化症、糖尿病および高血圧症が挙げられる。

【背景技術】

【0002】

以下の説明は、本発明の理解を助けることを意図するものであり、本発明に対して従来技術であることを意図するものでもないし、認めるものでもない。

【0003】

肥満症は、深刻であり、広範な、かつ増加しつつある公衆衛生問題である。米国では、人口の20%が肥満であり、欧州では、それよりわずかに低い割合が肥満である (Friedman (2000) Nature 404: 632-634)。肥満症は、高血圧症、循環器疾患、糖尿病および癌ならびに呼吸器合併症および変形性関節症のリスクの増大と関連する (Kopelman (2000) Nature 404: 635-643)。少し体重を減らすだけでも、これらの関連する病状が改善される。

【0004】

環境、食事、年齢および運動を含む生活習慣因子が肥満症において役割を果たすことは今もなお認められているが、双生児研究、家族集積性の分析および養子研究すべてから、肥満症は大部分、遺伝因子によるところが大きい (Barsh et al (2000) Nature 404: 644-651)。ますます多くの代謝関連遺伝子が同定されているという事実が、これらの研究と一致している。さらに広範に研究されている遺伝子の一部としては、レプチン (ob) およびその受容体 (db)、プロオピオメラノコルチン (Pomc)、メラノコルチン-4-受容体 (Mcr)、アグーチタンパク質 (A^y)、カルボキシペプチダーゼ E (fat)、5-ヒドロキシトリプタミン受容体 2C (Htr2c)、necientベースのヘリックス・ループ・ヘリックス 2 (Nhlh2)、プロホルモンコンバーター 1 (PCSK1)、および tubby タンパク質 (tubby) をコードする遺伝子が挙げられる (review'd in Barsh et al (2000) Nature 404: 644-651)。

【発明の開示】

【0005】

本発明は、GENSETZAG 相互作用タンパク質 (GZIP) に基づく。本発明は、GZIP ポリペプチドおよび生物活性を有するその断片をコードする、GZIP ポリヌクレオチドおよびその断片を包含する。本発明は、前記 GZIP ポリペプチドおよびその断片もまた包含する。GZIP 生物活性ポリペプチド断片は、APM1 結合部位 (ABS) のすべてまたは一部を含むことが好ましい。ABS のすべてまたは一部を含有する GZIP ポリペプチド断片は、APM1 の球状 C1q 相同性領域 (gAPM1) と結合する。ヒトおよび他の動物における体重減少、体重増加の予防および血中グルコースレベルの制御に対する有用性を含む、本明細書に述べられるそれらの増加した生物活性の点から、生物活性 GZIP ポリペプチドは単独で、または gAPM1 ポリペプチドと組み合わせて、インビトロおよびインビボでの予想外の効果を有する。さらに詳細には、GZIP ポリペプチドと gAPM1 ポリペプチドとの組み合わせでの生物活性は、この2種類のポリペプチド単独で期待される効果よりも大きな効果を有する。これらの効果には、エピネフリンの投

10

20

30

40

50

与、「イントラリピッド (intralipid)」の静脈内注射、または高脂肪試験食の投与によって生じる高い遊離脂肪酸レベルの減少、ならびに筋細胞における脂肪酸酸化の増加、グルコースレベルの減少、エネルギー消費の調節、インスリンに対する抵抗性および高脂肪/高ショ糖食を摂取する哺乳動物における体重減少が含まれる。

【0006】

GZIPは、HLAクラスI重鎖との相同性を有する42kDa糖タンパク質である。GZIPのゲノム構造は、HLAクラスI重鎖の構造と類似しており、Zn-2糖タンパク質(ZAG)ポリペプチドのドメイン構造を反映する。GZIPポリペプチドは、ドメイン構造：(シグナルペプチド)-(1ドメイン)-(2ドメイン)-(3ドメイン)を有する。GZIPの1および2ドメインは、脂肪酸に対する結合溝を確立する。GZIPの3ドメインは、APM1の球状C1q相同性領域(gAPM1)に対する結合部位を含有する。このAPM1結合部位(ABS)は、ベイト(bait)としてgAPM1を用いた2ハイブリッドスクリーニングアッセイにおいて、プレイ(pre)として取り出される重複GZIP cDNAクローンによって表された(実施例15参照)。これらの結果に基づいて、GZIPは直接または間接的に、2つのシグナル(たった1つだけでなく)をその標的細胞に送達し、例えば一方は結合した脂肪酸を介して送達され、もう一方は結合したgAPM1を介して送達されと考えられる。GZIPポリペプチドまたはポリペプチド断片およびAPM1ポリペプチドまたはポリペプチド断片は共に合わせて、個々のポリペプチドまたはポリペプチド断片のみによって示される効果に基づいて予想外の生物学的効果を有する。

【0007】

このように、本発明は、GZIPポリペプチド、多量体(例えば、ヘテロ多量体またはホモ多量体)をインビトロもしくはインビボで形成するGZIPポリペプチド、前記GZIPポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記GZIPポリヌクレオチドを含むベクター、および前記GZIPポリヌクレオチドの細胞組換え体に、ならびに前記GZIPポリペプチドを含む薬学的かつ生理学的に許容される組成物、および体重を減らすため、または代謝関連疾患および障害を治療するために前記薬学的かつ生理学的に許容されるGZIP組成物を投与する方法に関する。代謝関連活性のアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためのアッセイもまた、本発明の一部である。

【0008】

第1の態様において、本発明は、脂質分配(lipid partitioning)、脂質代謝、およびインスリン様活性を有する精製、単離、または組換えGZIPポリペプチドを特徴とする。好ましいGZIPポリペプチド断片は、完全長GZIPポリペプチドと同じまたはそれよりも高い活性を有し、前記活性は、脂質分配、脂質代謝、およびインスリン様活性からなる群からも選択される。

【0009】

好ましい実施形態において、前記ポリペプチド断片は、配列番号：2の、少なくとも6個から298個以下の連続するアミノ酸、または配列番号：3の少なくとも6個から295個以下の連続するアミノ酸を含む、から本質的になる、またはからなる。

【0010】

他の好ましい実施形態において、予想外の活性を有するGZIPポリペプチド断片は、配列番号：2の101~272、121~298、59~242、221~298、145~298、221~242、21~298、21~202、21~208、203~298、209~298、180~251、192~251、204~251、221~251、21~246、21~250位のアミノ酸から選択される。

【0011】

他の好ましい実施形態では、予想外の活性を有するGZIPポリペプチド断片は、配列番号3の98~269、118~295、56~239、218~295、142~295、218~239、18~295、18~199、18~205、200~295、206~295、177~248、189~248、201~248、218~248、1

10

20

30

40

50

8～243、18～247位のアミノ酸から選択される。

【0012】

他の好ましい実施形態では、予想外の活性を有するGZIPポリペプチド断片は、配列番号：2の101～272、121～298、59～242、221～298、145～298、221～242、21～298、21～202、21～208、203～298、209～298、21～246、21～250位のアミノ酸から選択される。

【0013】

他の好ましい実施形態では、予想外の活性を有するGZIPポリペプチド断片は、98～269、118～295、56～239、218～295、142～295、218～239、18～295、18～199、18～205、200～295、206～295、18～243、18～247位のアミノ酸から選択される。

10

【0014】

他のさらに好ましい実施形態において、前記ポリペプチド断片は、配列番号：2または3における同定されたポリペプチド配列の相当する連続するアミノ酸と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のアミノ酸配列を含む。

【0015】

本発明はさらに：(a)配列番号：2または3の完全長GZIPポリペプチド；(b)N末端のMetが存在しない、配列番号：2または3の完全長GZIPポリペプチド；(c)シグナルペプチドを欠く、配列番号：2または3の成熟GZIPポリペプチド；(d)配列番号：2または3のGZIPポリペプチドであって、配列番号：2または3それぞれの、6～298または295（完全長）のうちのいずれか1つの整数個の長さであるGZIPポリペプチド；(e)配列番号：2または3のGZIPポリペプチドの、エピトープ保有断片；(f)(a)～(e)のポリペプチドのいずれかの対立遺伝子変異ポリペプチド；からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、からなる、またはから本質的になる、精製または単離ポリペプチドを提供する。

20

【0016】

本発明はさらに、生物活性を有する、または生物機能性ドメイン（1つまたは複数）を含む断片など、上記の(a)～(f)のポリペプチドの断片を提供する。

【0017】

他の非常に好ましい実施形態において、GZIPポリペプチドは、APM1結合部位の一部または全部で構成される精製、単離、または組換えGZIP断片を含む、から本質的になる、またはからなる。

30

【0018】

前記GZIPポリペプチド断片は、配列番号：2の215～248位のアミノ酸の少なくとも6個の連続するアミノ酸、または配列番号：3の212～245位のアミノ酸の少なくとも6個の連続するアミノ酸を含む、から本質的になる、またはからなることが好ましい。

【0019】

他の好ましい実施形態では、予想外の活性を有するGZIPポリペプチド断片は、配列番号：2の101～272、121～298、59～242、221～298、145～298、221～242、21～298、21～202、21～208、203～298、209～298、180～251、192～251、204～251、221～251、21～246、21～250位のアミノ酸から選択される。

40

【0020】

他の好ましい実施形態では、予想外の活性を有するGZIPポリペプチド断片は、配列番号：3の98～269、118～295、56～239、218～295、142～295、218～239、18～295、18～199、18～205、200～295、206～295、177～248、189～248、201～248、218～248、18～243、18～247位のアミノ酸から選択される。

50

【 0 0 2 1 】

他の好ましい実施形態において、予想外の活性を有する G Z I P ポリペプチド断片は、配列番号： 2 のおよそ 1 0 1 ~ 2 7 2、1 2 1 ~ 2 9 8、5 9 ~ 2 4 2、2 2 1 ~ 2 9 8、1 4 5 ~ 2 9 8、2 2 1 ~ 2 4 2、2 1 ~ 2 9 8、2 1 ~ 2 0 2、2 1 ~ 2 0 8、2 0 3 ~ 2 9 8、2 0 9 ~ 2 9 8、2 1 ~ 2 4 6、2 1 ~ 2 5 0 位のアミノ酸から選択される。

【 0 0 2 2 】

他の好ましい実施形態において、予想外の活性を有する G Z I P ポリペプチド断片は、配列番号： 3 の 9 8 ~ 2 6 9、1 1 8 ~ 2 9 5、5 6 ~ 2 3 9、2 1 8 ~ 2 9 5、1 4 2 ~ 2 9 5、2 1 8 ~ 2 3 9、1 8 ~ 2 9 5、1 8 ~ 1 9 9、1 8 ~ 2 0 5、2 0 0 ~ 2 9 5、2 0 6 ~ 2 9 5、1 8 ~ 2 4 3、1 8 ~ 2 4 7 位のアミノ酸から選択される。一方、前記 G Z I P 断片は、配列番号： 2 の 2 1 ~ 2 5 0 位の相当するアミノ酸と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一の、または配列番号： 3 の 1 8 ~ 2 4 7 位の相当するアミノ酸と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一のアミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなる。

【 0 0 2 3 】

関連する実施形態において、本発明の G Z I P ポリペプチドは、A P M 1 ポリペプチドと結合することができる。前記 A P M 1 ポリペプチドは、配列番号： 4 の少なくとも 6 個から 2 4 4 個以下の連続するアミノ酸を含む、から本質的になる、またはからなることが好ましい。

【 0 0 2 4 】

さらに好ましくは、本発明の G Z I P ポリペプチドは、本明細書において「g A P M 1」と呼ばれる、A P M 1 ポリペプチドの球状 C l q 相同性領域と結合することができる。

【 0 0 2 5 】

他の好ましい実施形態では、G Z I P と結合することができる A P M 1 ポリペプチド断片は、配列番号： 4 の 1 8 ~ 2 4 4、9 3 ~ 2 4 4、1 0 1 ~ 2 4 4、1 0 8 ~ 2 4 4 位のアミノ酸から選択される。A P M 1 および g A P M 1 ポリペプチド、およびその断片は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開番号：W O 0 1 / 5 1 6 4 5 に記述されている。

【 0 0 2 6 】

さらに好ましい実施形態において、G Z I P ポリペプチドは：(i) 遊離脂肪酸、(i i) グルコース、または(i i i) トリグリセリドの循環(血中、血清中または血漿中)レベル(濃度)を下げることができる。遊離脂肪酸レベルを下げる活性、グルコースレベルを下げる活性、またはトリグリセリドレベルを下げる活性を示す、本発明のさらに好ましいポリペプチドは、同じモル濃度で完全長 G Z I P ポリペプチドと同じまたはそれより高い活性を有し、同じ一過性活性およびそれより高い一過性活性を有するか、または持続活性を有する。

【 0 0 2 7 】

さらに好ましい実施形態では、生物活性を有する G Z I P ポリペプチド断片は、(i) 遊離脂肪酸、(i i) グルコース、または(i i i) トリグリセリドの循環(血中、血清中または血漿中)レベル(濃度)を下げることができ、A P M 1 ポリペプチド断片と組み合わせ用いられる前記 G Z I P ポリペプチド断片は、G Z I P ポリペプチド断片または A P M 1 ポリペプチド断片を単独で含む組成物の予想される効果よりも高い生物学的効果(例えば、遊離脂肪酸レベルを下げる活性)を生じる。前記 A P M 1 断片は、C l q 相同性領域の全部または一部を含有することが好ましい。

【 0 0 2 8 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、筋肉脂質または遊離脂肪酸の酸化を有意に促進するポリペプチドである。さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、筋肉脂質または遊離脂肪酸の酸化を有意に促進するポリペプチドである。

【 0 0 2 9 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、前記ポリペプチドの存在下にて分化された C 2 C 1 2 細胞に、未処理細胞と比較して、少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、3 5 %、または 4 0 % を超えるオレイン酸エステル (oleate) の酸化を生じさせるポリペプチドである。

【 0 0 3 0 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、肝細胞系 (好ましくは、B P R C L マウス肝細胞 (A T C C C R L - 2 2 1 7)) におけるレプチンの取り込みを増加させるポリペプチドである。

【 0 0 3 1 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、高脂肪食が原因の、食後の血漿遊離脂肪酸の増加を有意に低減するポリペプチドである。

【 0 0 3 2 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、高脂肪食の結果として、ケトンの体内産生を有意に低減するか、または無くすポリペプチドである。

【 0 0 3 3 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、骨格筋細胞におけるグルコースの取り込みを増加させるポリペプチドである。

【 0 0 3 4 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、脂肪細胞におけるグルコースの取り込みを増加させるポリペプチドである。

【 0 0 3 5 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、神経細胞におけるグルコースの取り込みを増加させるポリペプチドである。

【 0 0 3 6 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、赤血球におけるグルコースの取り込みを増加させるポリペプチドである。

【 0 0 3 7 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、脳におけるグルコースの取り込みを増加させるポリペプチドである。

【 0 0 3 8 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、食事の後、特に高糖質食後の血漿グルコースの食後増加を有意に低減するポリペプチドである。

【 0 0 3 9 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、食事の後、特に高脂肪食または高糖質食後の血漿グルコースの食後増加を有意に防ぐポリペプチドである。

【 0 0 4 0 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、インスリン感受性を高めるポリペプチドである。

【 0 0 4 1 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチド断片は、耐糖能障害からインスリン抵抗性への進行を阻害するポリペプチドである。

【 0 0 4 2 】

さらに好ましい G Z I P ポリペプチドは、インビトロまたはインビボで多量体 (例えば、ヘテロ多量体またはホモ多量体) を形成するポリペプチドである。好ましい多量体はホモ二量体またはホモ三量体である。他の好ましい多量体は、少なくとも 4、6、8、9、10 または 12 個の G Z I P ポリペプチドサブユニットを含むホモ多量体である。他の好ましい多量体は、本発明の G Z I P ポリペプチドを含むヘテロ多量体である。さらに他の好ましい多量体は、本発明の G Z I P ポリペプチドおよび A P M 1 ポリペプチドを含むヘテロ多量体である。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

さらに好ましい実施形態は、本発明の G Z I P ポリペプチドの 1 つを含む、異種ポリペプチドを包含する。

【 0 0 4 4 】

第 2 の態様において、本発明は、本明細書に記載の前記 G Z I P ポリペプチドをコードする、精製、単離、または組換えポリヌクレオチド、またはその補体 (complement) を特徴とする。本発明のさらに好ましい実施形態は、哺乳動物ゲノム配列、遺伝子、またはその断片を含む、またはからなる組換え、精製または単離ポリヌクレオチドである。一態様において、その配列は、ヒト、マウスまたは他の哺乳動物に由来する。

【 0 0 4 5 】

好ましい態様において、ゲノム配列は、配列番号： 1 に記載のポリヌクレオチド配列のいずれか 1 つの、少なくとも 1 2、1 5、1 8、2 0、2 2、2 5、3 0、3 5、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、5 0 0、7 5 0、1 0 0 0、1 2 5 0、1 5 0 0、または 1 6 0 0 ヌクレオチドの隣接スパンを含む、単離、精製、または組換えポリヌクレオチド、あるいはその補体を含み、前記隣接スパンは、配列番号： 1 の C 1 q 相同性領域の相当するヌクレオチド配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一のヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態において、そのポリヌクレオチドは、DNA、RNA、DNA/RNA ハイブリッド、一本鎖、および二本鎖である。

【 0 0 4 6 】

第 3 の態様において、本発明は、第 2 の態様に記載の前記ポリヌクレオチドを含む、から本質的になる、またはからなる、組換えベクターを特徴とする。

【 0 0 4 7 】

第 4 の態様において、本発明は、第 3 の態様に記載の前記組換えベクターを含む、から本質的になる、またはからなる、組換え細胞を特徴とする。さらなる実施形態は、本発明のポリヌクレオチドの宿主細胞組換え体を包含する。

【 0 0 4 8 】

第 5 の態様において、本発明は、本明細書に記載される前記 G Z I P ポリペプチド、および、二者択一的に薬学的または生理学的に許容される賦形剤を含む、から本質的になる、またはからなる、薬学的または生理学的に許容される組成物を特徴とする。関連する実施形態において、本発明は、本明細書に記載の前記 G Z I P ポリペプチド、本明細書に記載の前記 A P M 1 ポリペプチド、代わりに、薬学的または生理学的に許容される賦形剤を含む、から本質的になる、またはからなる、薬学的または生理学的に許容される組成物を特徴とする。

【 0 0 4 9 】

第 6 の態様において、本発明は、体重を減らす、体脂肪量を下げる、または除脂肪筋肉を増加させる方法であって、体重を減らす必要のある個体に、本明細書に記載の前記薬学的または生理学的に許容される組成物を提供または投与することを含む方法の特徴とする。

【 0 0 5 0 】

好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物で処置される、体重を減らす、体脂肪量を下げる、または除脂肪筋肉を増加させる必要がある前記個体の同定は、前記個体由来の臨床試料における G Z I P 単一ヌクレオチド多型 (SNP) を遺伝子型判定するか、または G Z I P ポリペプチドもしくは mRNA レベルを測定することを含む。

【 0 0 5 1 】

他の好ましい実施形態では、前記薬学的または生理学的に許容される組成物で処置される、体重を減らす必要がある前記個体の同定は、前記個体由来の臨床試料における G Z I P 単一ヌクレオチド多型 (SNP) を遺伝子型判定し、A P M 1 SNP を遺伝子型判定するか、または G Z I P および A P M 1 ポリペプチドもしくは mRNA レベルを測定する

10

20

30

40

50

ことを含む。前記臨床試料は、血漿、尿、および唾液からなる群から選択されることが好ましい。好ましくは、本発明のGZIPポリペプチド断片が個体に投与され、健康な、非肥満の患者と比較して、完全長のいずれか1つまたはすべてのGZIPポリペプチドまたは自然にタンパク分解性切断されたGZIP断片の血中、血清中または血漿中レベルが少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%低減される。

【0052】

第7の態様において、本発明は、代謝関連疾患または障害を予防または治療する方法であって、かかる治療が必要な個体に、本発明の前記薬学的または生理学的に許容される組成物を提供または投与することを含む方法の特徴とする。

10

【0053】

好ましい実施形態では、前記薬学的または生理学的に許容される組成物で処置される、かかる治療が必要な前記個体の同定は、前記個体由来の臨床試料におけるGZIP単一クレオチド多型(SNP)を遺伝子型判定するか、またはGZIPポリペプチドもしくはmRNAレベルを測定することを含む。

【0054】

その他の好ましい実施形態では、前記薬学的または生理学的に許容される組成物で処置される、かかる治療が必要な前記個体の同定は、GZIP SNPおよびAPM1 SNPを遺伝子型判定するか、またはGZIPポリペプチドおよびAPM1ポリペプチドもしくはmRNAレベルを測定することを含む。前記臨床試料は、血液、血清、血漿、尿、および唾液からなる群から選択されることが好ましい。前記代謝関連疾患または障害は、肥満症、耐糖能障害、インスリン抵抗性、アテローム性動脈硬化症、アテローム性疾患、心疾患、高血圧症、脳卒中、X症候群、インスリン非依存性糖尿病、およびII型糖尿病からなる群から選択される。本発明の方法によって治療されるII型糖尿病に関連する合併症としては、微小血管障害(microangiopathic lesions)、眼球病変および腎臓障害が挙げられる。心疾患としては、限定されないが、心不全、冠状動脈不、および高血圧症が挙げられる。本発明の化合物によって治療される、他の代謝関連障害としては、高脂質血症および高尿酸血症が挙げられる。本発明のさらに他の代謝関連疾患または障害には、悪液質、るいそう、AIDSに関連する体重減少、癌に関連する体重減少、食欲不振および食欲亢進が挙げられる。好ましい実施形態において、前記個体は、哺乳動物、好ましくはヒトである。

20

30

【0055】

好ましい態様において、本発明の実施形態は、GZIPポリペプチドを含む組成物を個体に提供または投与する工程を含む、個体において目的の生物学的応答を引き起こす、または誘導する方法であって、前記生物学的応答が：

(a) 遊離脂肪酸の循環(血中、血清中または血漿中)レベル(濃度)を調節する応答であって、前記調節が好ましくは低下させることである応答；

(b) グルコースの循環(血中、血清中または血漿中)レベル(濃度)を調節する応答であって、前記調節が好ましくは低下させることである応答；

(c) トリグリセリドの循環(血中、血清中または血漿中)レベル(濃度)を調節する応答であって、前記調節が好ましくは低下させることである応答；

40

(d) 筋肉脂質または遊離脂肪酸の酸化を促進する応答；

(c) 肝臓または肝細胞におけるレプチンの取り込みを調節する応答であって、前記調節が好ましくは増加させることである応答；

(e) 高脂肪食が原因の血漿遊離脂肪酸の食後増加を調節する応答であって、前記調節が好ましくは減少させることである応答；

(f) 高脂肪食の結果としてケトンの体内産生を調節する応答であって、前記調節が好ましくは、減少または無くすことである応答；

(g) インスリンに対する細胞または組織感受性、特に筋肉、脂肪、肝臓もしくは脳の感受性を増加させる応答；

50

(h) 耐糖能障害からインスリン抵抗性への進行を抑制する応答；からなる群から選択され、かつさらに、前記生物学的応答が、同じモル濃度でインスリンのみで引き起こされる、もしくは誘導される生物学的応答よりも有意に高い、または少なくとも10%、20%、30%、35%、40%、50%、75%、100%または500%高い、方法を包含する。

【0056】

さらに好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、インスリン治療と組み合わせて、インスリン非依存性糖尿病（NIDDM、II型糖尿病）を有する一部のヒトにおいて血中グルコースを制御する方法として用いることができる。本発明の実施形態はさらに、個体において目的の生物学的応答を引き起こす、または誘導する方法であって：本発明のGZIPポリペプチドおよび本発明のAPMIポリペプチドを含有する組成物を個体に提供または投与する工程を含む方法を包含する。

10

【0057】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、インスリン治療と組み合わせて、インスリン依存性糖尿病（IDDM、I型糖尿病）を有する一部のヒトにおいて血中グルコースを制御する方法として用いることができる。

【0058】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、インスリン治療と組み合わせて、インスリン非依存性糖尿病（NIDDM、II型糖尿病）を有する一部のヒトにおいて体重を制御する方法として用いることができる。

20

【0059】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、インスリン治療と組み合わせて、インスリン依存性糖尿病（IDDM、I型糖尿病）を有する一部のヒトにおいて体重を制御する方法として用いることができる。

【0060】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、単独で、インスリン治療と組み合わせることなく、インスリン非依存性糖尿病（NIDDM、II型糖尿病）を有する一部のヒトにおいて血中グルコースを制御する方法として用いることができる。

30

【0061】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、単独で、インスリン治療と組み合わせることなく、インスリン依存性糖尿病（IDDM、I型糖尿病）を有する一部のヒトにおいて血中グルコースを制御する方法として用いることができる。

【0062】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、単独で、インスリン治療と組み合わせることなく、インスリン非依存性糖尿病（NIDDM、II型糖尿病）を有する一部のヒトにおいて体重を制御する方法として用いることができる。

40

【0063】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、単独で、インスリン治療と組み合わせることなく、インスリン依存性糖尿病（IDDM、I型糖尿病）を有する一部のヒトにおいて体重を制御する方法として用いることができる。

【0064】

さらなる好ましい実施形態において、インスリン分泌促進薬（好ましくは、経口型）またはインスリン感受性改善薬（好ましくは経口型）と組み合わせて、患者の体重またはグルコース制御を改善するために、本発明をNIDDM患者の補足的治療で用いることがで

50

きる。その経口用インスリン分泌促進薬は、1、1 - ジメチル - 2 - (2 - モルホリノフェニル) グアニジンフマレート (B T S 6 7 5 8 2)、またはトルブタミド、トラザミド、クロルプロパミド、グリベンクラミド、グリメピリド、グリピジドおよびグリダジド (glidazide) から選択されるスルホニル尿素であることが好ましい。そのインスリン感受性改善薬は、メトホルミン、シグリタゾン、トログリタゾンおよびピオグリタゾンから選択されることが好ましい。

【 0 0 6 5 】

本発明はさらに、単独で、インスリン分泌促進薬またはインスリン感受性改善薬なしで、N I D D M 患者の体重またはグルコースの制御を改善する方法を提供する。

【 0 0 6 6 】

さらなる好ましい実施形態において、インスリン分泌促進薬 (好ましくは、経口型) またはインスリン感受性改善薬 (好ましくは経口型) と組み合わせて、患者の体重またはグルコース制御を改善するために、本発明を I D D M 患者の補足的治療に用いることができる。そのインスリン分泌促進薬は、1、1 - ジメチル - 2 - (2 - モルホリノフェニル) グアニジンフマレート (B T S 6 7 5 8 2)、またはトルブタミド、トラザミド、クロルプロパミド、グリベンクラミド、グリメピリド、グリピジドおよびグリダジド (glidazide) から選択されるスルホニル尿素であることが好ましい。そのインスリン感受性改善薬は、メトホルミン、シグリタゾン、トログリタゾンおよびピオグリタゾンから選択されることが好ましい。

【 0 0 6 7 】

本発明は、インスリン分泌促進薬またはインスリン感受性改善薬なしで、単独で、I D D M 患者の体重またはグルコース制御を改善する方法を提供する。

【 0 0 6 8 】

さらなる好ましい実施形態において、本発明は、例えば同時に、別々に、もしくは逐次に使用される個々の投与量単位の形でインスリン分泌促進薬またはインスリン感受性改善薬と共に、付随的にまたは同時に投与される (分泌促進薬の前もしくは後、または感受性改善薬の前もしくは後)。したがって、本発明はさらに、第 5 の態様に記載の薬学的または生理学的に許容される組成物の組成物と、N I D D M または I D D M 患者における体重またはグルコース制御の改善のために、同時に、別々に、または逐次に使用するための併用製剤 (combined preparation) としてのインスリン分泌促進薬またはインスリン感受性改善薬とを提供する。

【 0 0 6 9 】

さらなる好ましい実施形態では、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明はさらに、インスリン感受性改善薬として使用する方法を提供する。

【 0 0 7 0 】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、インスリン治療と組み合わせて、インスリン非依存性糖尿病 (N I D D M、I I 型糖尿病) を有する一部のヒトにおいてインスリン感受性を改善する方法として使用することができる。

【 0 0 7 1 】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、インスリン治療と組み合わせて、インスリン依存性糖尿病 (I D D M、I 型糖尿病) を有する一部のヒトにおいてインスリン感受性を改善する方法として使用することができる。

【 0 0 7 2 】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、インスリン治療なしで、インスリン非依存性糖尿病 (N I D D M、I I 型糖尿病) を有する一部のヒトにおいてインスリン感受性を改善する方法として使用することができる。

【 0 0 7 3 】

第 8 の態様において、本発明は、本明細書に記載の G Z I P ポリペプチドを作製する方法であって、タンパク分解切断、組換え方法論および人工合成からなる群から選択される方法の特徴とする。

【 0 0 7 4 】

第 9 の態様において、本発明は、組換え G Z I P ポリペプチド断片または完全長 G Z I P ポリペプチドを作製する方法であって、その乳が前記組換え G Z I P ポリペプチド断片または完全長タンパク質を含有する、遺伝子導入、非ヒト哺乳動物を提供する工程と、前記非ヒト哺乳動物の乳から、前記組換え G Z I P ポリペプチド断片または前記完全長 G Z I P ポリペプチドを精製する工程とを含む方法を提供する。一実施形態において、前記非ヒト哺乳動物は、雌ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、またはマウスである。他の実施形態では、その方法は、前記乳から組換え完全長 G Z I P ポリペプチドを精製する工程を含み、前記タンパク質をインビトロで切断して、目的の G Z I P ポリペプチド断片を得る工程をさらに含む。

【 0 0 7 5 】

第 1 0 の態様において、本発明は、本発明のポリペプチドに特異的に結合することができる、精製または単離された抗体を特徴とする。この実施形態の一態様において、その抗体は、配列番号： 2 または 3 に記載のポリペプチド配列の 1 つの配列の、少なくとも 6 個の連続するアミノ酸、少なくとも 8 個の連続するアミノ酸、または少なくとも 1 0 個の連続するアミノ酸を含む G Z I P ポリペプチドに結合することができる。この実施形態の第 2 の態様において、その抗体は、配列番号： 4 に記載のポリペプチド配列の 1 つの配列の、少なくとも 6 個の連続するアミノ酸、少なくとも 8 個の連続するアミノ酸、または少なくとも 1 0 個の連続するアミノ酸を含む A P M 1 ポリペプチドに結合することができる。

【 0 0 7 6 】

第 1 1 の態様において、本発明は、代謝関連疾患および障害の治療のための、あるいは体重を減少または増加させるための、本明細書に記載のポリペプチドの使用を特徴とする。前記代謝関連疾患および障害は、肥満症、インスリン抵抗性、アテローム性動脈硬化症、アテローム性疾患、心疾患、高血圧症、脳卒中、X 症候群、インスリン非依存性糖尿病、および I I 型糖尿病からなる群から選択されることが好ましい。本発明の方法によって治療される I I 型糖尿病に関連する合併症としては、微小血管障害、眼球病変および腎臓障害が挙げられる。心疾患としては、限定されないが、心不全、冠状動脈不、および高血圧症が挙げられる。本発明の化合物によって治療される、他の代謝関連障害としては、高脂質血症および高尿酸血症が挙げられる。本発明のさらに他の代謝関連疾患または障害には、悪液質、るいそう、A I D S に関連する体重減少、癌に関連する体重減少、食欲不振および食欲亢進が挙げられる。好ましい実施形態において、前記個体は、哺乳動物、好ましくはヒトである。関連する実施形態において、本発明は、代謝関連疾患および障害の治療のための、あるいは体重を減少または増加させるための、本明細書に記載のポリペプチドの使用を特徴とし、本発明のポリペプチドのいずれも、前記治療のためのいずれかの組み合わせに包含または除外されることが可能である。

【 0 0 7 7 】

第 1 2 の態様では、本発明は、ヒトまたは動物の体を治療する方法において使用される、本明細書に記載のポリペプチドを提供する。関連する実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物の体を治療する方法において使用される、本明細書に記載のポリペプチドを提供し、本発明のポリペプチドのいずれも、前記治療のためのいずれかの組み合わせに包含または除外されることが可能である。

【 0 0 7 8 】

第 1 3 の態様では、本発明は、本発明の前記薬学的または生理学的に許容される組成物または本明細書に記載のポリペプチドを、個体に提供する工程を含む、美容の目的で体重を減少させる方法の特徴とする。前記のように体重を減少させるためには、前記個体は、少なくとも 2 0 から 2 5 以下の B M I を有することが好ましい。あるいは、体重を増加させるために、前記個体は、少なくとも 1 5 から 2 0 以下の B M I を有することが好ましい

10

20

30

40

50

。

【 0 0 7 9 】

第 1 4 の態様において、本発明は、体重を減少させるため、あるいは代謝関連疾患もしくは障害の治療または予防のために用いられる、第 5 の態様に記載の薬学的または生理学的に許容される組成物を特徴とする。前記代謝関連疾患および障害は、肥満症、耐糖能障害、インスリン抵抗性、アテローム性動脈硬化症、アテローム性疾患、心疾患、高血圧症、脳卒中、X 症候群、インスリン非依存性糖尿病、および I I 型糖尿病からなる群から選択されることが好ましい。本発明の方法によって治療される I I 型糖尿病に関連する合併症としては、微小血管障害、眼球病変および腎臓障害が挙げられる。心疾患としては、限定されないが、心不全、冠状動脈不、および高血圧症が挙げられる。本発明の化合物によって治療される、他の代謝関連障害としては、高脂質血症および高尿酸血症が挙げられる。本発明のさらに他の代謝関連疾患または障害としては、悪液質、るいそう、A I D S に関連する体重減少、癌に関連する体重減少、食欲不振および食欲亢進が挙げられる。

10

【 0 0 8 0 】

好ましい実施形態において、前記個体は、哺乳動物、好ましくはヒトである。

【 0 0 8 1 】

好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物で治療すべき前記個体の同定は、前記個体由来の臨床試料における G Z I P 単一ヌクレオチド多型 (S N P) を遺伝子型判定するか、または G Z I P ポリペプチドもしくは m R N A レベルを測定することを含む。

20

【 0 0 8 2 】

他の好ましい実施形態では、前記薬学的または生理学的に許容される組成物で治療すべき前記個体の同定は、前記個体由来の臨床試料における、G Z I P 単一ヌクレオチド多型 (S N P) および A P M 1 単一ヌクレオチド多型 (S N P) を遺伝子型判定するか、または G Z I P ポリペプチドおよび A P M 1 ポリペプチドもしくは m R N A レベルを測定することを含む。前記臨床試料は、血液、血清、血漿、尿、および唾液からなる群から選択されることが好ましい。

【 0 0 8 3 】

第 1 5 の態様において、本発明は、美容の目的で、体重を減らすため、体脂肪量を下げ、除脂肪体重を増加させるために使用される、本明細書に記載の薬学的または生理学的に許容される組成物を特徴とする。

30

【 0 0 8 4 】

第 1 6 の態様では、本発明は、本明細書に記載の前記薬学的または生理学的に許容される組成物、または本明細書に記載のポリペプチドを個体に提供する工程を含む、インスリン抵抗性を治療する方法を特徴とする。

【 0 0 8 5 】

第 1 7 の態様において、本発明は、肥満であるか、または空腹時高インスリン血症であるか、その両方である、正常耐糖能 (N G T) を有する個体を治療する方法における本明細書に記載の薬学的または生理学的に許容される組成物を特徴とする。

【 0 0 8 6 】

さらなる好ましい実施形態において、本発明は、妊娠糖尿病の個体を治療する方法における、本明細書に記載の薬学的または生理学的に許容される組成物を特徴とする。妊娠糖尿病とは、妊娠期間、通常妊娠の 2 番目もしくは 3 番目の三半期中に発症する糖尿病を意味する。

40

【 0 0 8 7 】

さらなる好ましい実施形態において、本発明は、空腹時血糖異常 (I F G) の個体を治療する方法における、本明細書に記載の薬学的または生理学的に許容される組成物を特徴とする。空腹時血糖異常 (I F G) とは、個体における空腹時血漿グルコースレベルが高いが、顕性糖尿病とは診断されない、つまり血漿グルコースレベルが 1 2 6 m g / d l 未満および 1 1 0 m g / d l 以下である症状である。

50

【 0 0 8 8 】

さらなる好ましい実施形態において、本発明は、個体において耐糖能障害（ I G T ）を治療および予防する方法における、本明細書に記載の薬学的または生理学的に許容される組成物を特徴とする。 I G T を低減または予防する、つまりインスリン抵抗性を正常化するための療法および方法を提供することによって、 N I D D M の進行を遅らせる、または防ぐことができる。さらに、インスリン抵抗性を低減または防ぐための療法および方法を提供することによって、本発明は、インスリン抵抗性症候群の発症を低減または予防する方法を提供する。

【 0 0 8 9 】

さらなる好ましい実施形態では、本発明は、多嚢胞性卵巣症候群（ P C O S ）を有する対象を治療する方法において、本明細書に記載の薬学的または生理学的に許容される組成物を特徴とする。 P C O S は、閉経前の女性の最も多い疾患の中の 1 つであり、この集団の 5 ～ 1 0 % が罹患している。インスリン感受性改善薬、例えばトログリタゾンは、 P C O S に有効であることが示されており、特にインスリン作用、インスリン分泌の障害、卵巣のステロイド産生および線維素溶解が、インスリン抵抗性のヒトなどにおいて改善される (Ehrman et al. (1997) J Clin Invest 100: 1230)。したがって、本発明は、インスリン抵抗性を低減し、血中グルコースを正常化する方法であって、したがって、 P C O S を治療または予防する方法を提供する。

10

【 0 0 9 0 】

さらなる好ましい実施形態において、本発明は、インスリン抵抗性を有する対象を治療する方法において、本明細書に記載の薬学的または生理学的に許容される組成物を特徴とする。

20

【 0 0 9 1 】

さらなる好ましい実施形態において、インスリン抵抗性を有する対象は、インスリン抵抗性を低減または治療するために本発明の方法によって治療される。インスリン抵抗性は感染症および癌と関連する場合も多いため、本発明の方法によるインスリン抵抗性の予防または低減によって、感染症および癌を予防または低減することができる。

【 0 0 9 2 】

さらなる好ましい実施形態において、本発明の方法を用いて、例えばインスリン抵抗性を発症するリスクが高いことが分かっている対象においてインスリン抵抗性の発症が予防される。

30

【 0 0 9 3 】

このように、上述の試験または当技術分野で公知の他の試験のいずれかを用いて、対象がインスリン抵抗性であるかどうかを決定することが可能であり、次いで、その患者を本発明の方法に従って治療し、インスリン抵抗性を低減または治療させることができる。あるいは、本発明の方法は、例えばインスリン抵抗性を発症するリスクが高いことが分かっている対象において、インスリン抵抗性の発症を防ぐために用いることもできる。

【 0 0 9 4 】

第 1 8 の態様において、本発明は、本発明の A P M 1 ポリペプチドの、本発明の G Z I P ポリペプチドへの結合をブロックする 1 種または複数種のアンタゴニストについて、化合物をスクリーニングする方法において、 G Z I P ポリペプチド断片を使用する方法を特徴とする。

40

【 0 0 9 5 】

好ましい実施形態では、前記化合物は、限定されないが、低分子量の有機または無機化合物、タンパク質、ペプチド、炭水化物、または脂質から選択される。任意に、前記化合物は、配列番号： 2 の 2 2 1 ～ 2 4 2 位のアミノ酸または配列番号： 3 の 2 1 8 ～ 2 3 9 位のアミノ酸から選択される G Z I P ポリペプチド断片である。

【 0 0 9 6 】

第 1 9 の態様において、本発明は、 G Z I P 活性の 1 種または複数種のアンタゴニストについて、化合物をスクリーニングする方法において、 G Z I P ポリペプチド断片を使用

50

する方法を特徴とし、前記活性は、限定されないが、脂質分配、脂質代謝、およびインスリン様活性から選択される。

【0097】

好ましい実施形態において、前記化合物は、制限されないが、低分子量の有機または無機化合物、タンパク質、ペプチド、炭水化物、または脂質から選択される。任意に、前記化合物は、配列番号：2の221～242位のアミノ酸または配列番号：3の218～239位のアミノ酸から選択されるGZIPポリペプチド断片である。

【0098】

第20の態様において、本発明は、本発明のポリペプチドのN末端にシグナルペプチドを付加する方法であって、前記シグナルペプチドが前記ポリペプチドの分泌を促進する役割を果たす方法を特徴とする。前記シグナルペプチドは、配列番号：2の1～20位のアミノ酸または配列番号：3の1～17位のアミノ酸から選択されることが好ましい。

10

【0099】

上記のおよび本明細書に開示される方法の好ましい態様において、個体に投与されるGZIPポリペプチドまたはポリヌクレオチドの量は、GZIPポリペプチドの循環（血中、血清中、または血漿中）レベル（濃度）をそれらの正常レベル（非肥満個体でのレベル）に導くのに十分な量である。「正常レベル」は、すべての循環GZIPポリペプチド（完全長GZIPタンパク質およびその断片）の総濃度、またはすべての循環タンパク分解性切断されたGZIPポリペプチドのみの濃度として特定することができる。

【0100】

20

上記のおよび本明細書に開示される方法のさらなる好ましい態様において、減量は、部分的または全体的に、a)皮下脂肪組織、またはb)内臓（大網）脂肪組織のいずれかの量の減少によるものである。

【0101】

上記のおよび本明細書に開示される組成物の好ましい態様では、その組成物が、GZIPポリペプチドが単独で投与された場合に予想される効果よりも、APM1ポリペプチド断片、インスリン、インスリン分泌促進薬またはインスリン感受性改善薬のいずれか1つと組み合わせた場合のほうが高い生物学的効果を生じるように、本発明の組成物はさらに、APM1ポリペプチド断片、インスリン、インスリン分泌促進薬またはインスリン感受性改善薬を含み得る。

30

【0102】

上記のおよび本明細書に開示される組成物の好ましい態様では、本明細書に記載のGZIPポリペプチド断片で構成される組成物はさらに、GZIPポリペプチドが単独で投与された場合に予想される効果よりも、APM1ポリペプチド断片、インスリン、インスリン分泌促進薬またはインスリン感受性改善薬のいずれか1つと組み合わせた場合のほうが、生物学的効果が高くなるように、APM1ポリペプチド断片、インスリン、インスリン分泌促進薬またはインスリン感受性改善薬で構成することができる。さらなる実施形態において、前記生物学的機能としては、限定されないが、遊離脂肪酸レベルを下げる活性、グルコースレベルを下げる活性、トリグリセリドレベルを下げる活性、脂肪分解の促進、筋肉脂質または遊離脂肪酸の酸化の促進、肝細胞系におけるレプチン取り込みの増加、高脂肪食が原因の血漿遊離脂肪酸またはグルコースの食後増加の有意な低減、高脂肪食の結果としてのケトンの体内産生の有意な低減または解消、骨格筋細胞、脂肪細胞、赤血球もしくは脳におけるグルコースの取り込みの増加、インスリン感受性の増加、耐糖能障害からインスリン抵抗性への進行の抑制、体重の減少、体脂肪量の低下、除脂肪筋量の増加、代謝関連疾患もしくは障害の予防または治療、インスリン依存性糖尿病もしくはインスリン非依存性糖尿病の一部のヒトにおける血中グルコースの制御、インスリン抵抗性の治療またはインスリン抵抗性の発症の予防が挙げられる。

40

本発明の詳細な説明

本発明をより詳細に説明する前に、本明細書において本発明を説明するために用いられる用語の意味および範囲を説明かつ定義するために、以下に定義を示す。

50

【0103】

本明細書において同義で用いられる、「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」および核酸には、RNA、DNA、または単鎖もしくは二重鎖状の複数のヌクレオチドのRNA/DNAハイブリッド配列が含まれる。その用語は、少なくとも1つの修飾：例としてであり、限定されないが（a）交互（alternative）結合基、（b）プリン類似体、（c）ピリミジンの類似体、または（d）類似糖を含む、「修飾ヌクレオチド」を包含する。類似の結合基の例としては、プリン、ピリミジン、および糖が挙げられる。例えば、国際公開番号：WO95/04064を参照のこと。本発明のポリヌクレオチド配列は、合成、組換え、エクスピボ産生、またはそれらの組み合わせを含む、公知のいずれかの方法によって、ならびに当技術分野で公知のいずれかの精製方法を用いて作製することができる。

10

【0104】

ポリヌクレオチドコンストラクト、組換えポリヌクレオチドおよび組換えポリペプチドという用語は、当技術分野でのそれらの使用と一貫して、本明細書において用いられる。「上流」および「下流」という用語もまた、当技術分野でのそれらの使用と一貫して使用される。「塩基対」および「ワトソン-クリック型塩基対」という用語は、本明細書において同義で、かつ当技術分野でのそれらの使用と一貫して使用される。同様に、「相補的」、「その補体」、「補体」、「相補的ポリヌクレオチド」、「相補的核酸」および「相補的ヌクレオチド配列」という用語は、本明細書において同義で、かつ当技術分野でのそれらの使用と一貫して使用される。

20

【0105】

「精製（された）」という用語は、限定されないが、他の核酸、炭水化物、脂質およびタンパク質（ポリヌクレオチドの合成に使用される酵素など）を含む他の化合物から分離された、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドベクターを説明するために本明細書において使用される。「精製（された）」という用語は、例えば、共有結合で閉環したポリヌクレオチドの、線状ポリヌクレオチドからの分離、またはその逆もまた意味し得る。試料の少なくとも約50%、60%、75%、または90%が単一ポリヌクレオチド配列を含有する場合に、ポリヌクレオチドは実質的に純粋である。場合によっては、これは、コンフォメーション（線状に対して共有結合閉環）間の決定を含む。実質的に純粋なポリペプチドまたはポリヌクレオチドは通常、核酸試料の約50、60、70、80、90、95、99%重量/重量を構成する。ポリヌクレオチドの純度または均一性は、試料のアガロースゲルもしくはポリアクリルアミドゲル電気泳動などの当技術分野で公知の数多くの手段によって、続いて、ゲルを染色し、単一のポリヌクレオチドバンドを可視化することによって示すことができる。特定の目的のために、HPLCまたは当技術分野でよく知られている他の手段によって、高い分解能を得ることができる。

30

【0106】

同様に、「精製（された）」という用語は、限定されないが、核酸、脂質、炭水化物および他のタンパク質を含む他の化合物から単離された、本発明のポリペプチドを説明するために本明細書において使用される。いくつかの好ましい実施形態において、試料のポリペプチド分子の少なくとも約50%、60%、75%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%が単一アミノ酸配列を有する場合に、ポリペプチドは実質的に純粋である。いくつかの好ましい実施形態において、実質的に純粋なポリペプチドは通常、タンパク質試料の約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または99.5%重量/重量を構成する。ポリペプチドの純度または均一性は、試料のアガロースゲルもしくはポリアクリルアミドゲル電気泳動などの当技術分野で公知の数多くの手段によって、続いて、ゲルを染色し、単一のポリヌクレオチドバンドを可視化することによって示される。特定の目的のために、HPLCまたは当技術分野でよく知られている他の手段によって、高い分解能を得ることができる。

40

【0107】

50

さらに、本明細書で使用される「精製（された）」という用語は、完全な精製を必要とするわけではなく；むしろ、それらは相対的な定義として意図される。少なくとも1桁、好ましくは2桁または3桁、さらに好ましくは4桁または5桁のオーダーに、出発物質または天然物質を精製することが特に企図される。あるいは、精製は、異種ポリヌクレオチド（DNA、RNAまたは両方）またはポリペプチドに対する「最低」純度%として表される。好ましい実施形態として、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、異種ポリヌクレオチドおよびポリペプチドに対してそれぞれ、少なくとも；純度10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、96%、98%、99%、または100%である。さらに好ましい実施形態として、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、異種ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対して、任意の位～小数点以下第3位の範囲の「最低」純度、90%～100%（例えば、少なくとも99.995%の純度）を有する。さらに、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの純度は、担体溶液以外のすべての物質および化合物に対するパーセンテージ（上述のように）で表される。小数点以下第3位までの各数字は、純度の個々の種類として主張することが可能である。

【0108】

「単離（された）」という用語は、その物質がその元の環境（例えば、それが天然に存在する場合には自然環境）から取り出されることを必要とする。例えば、生体動物に存在する天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されないが、自然体系において共存する物質の一部またはすべてから区別される同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離される。かかるポリヌクレオチドはベクターの一部であることが可能であり、またはかかるポリヌクレオチドもしくはポリペプチドは組成物の一部であることが可能であり、さらにベクターまたは組成物はその自然環境の一部ではないという点から単離することが可能である。

【0109】

具体的には、「単離（された）」の定義から：天然の染色体（染色体拡散など）、人工染色体ライブラリー、ゲノムライブラリー、および核酸のインビトロ標本として、あるいはその宿主細胞が異質インビトロ標本であるか、または単一コロニーの異質集団としてプレーティングされた、トランスフェクト/形質転換された宿主細胞標本として存在するcDNAライブラリーは除外される。具体的には、5'ESTが、ベクター分子中の核酸インサート数の5%未満（またはその代わりに、1%、2%、3%、4%、10%、25%、50%、75%、または90%、95%、または99%）を占める、上記のライブラリーも除外される。さらに具体的には、全細胞のゲノムDNAまたは全細胞のRNA標本（機械的に切断または酵素で消化される前記全細胞標本を含む）は除外される。さらに具体的には、インビトロ標本としての、または電気泳動（そのプロットトランスファーを含む）によって分離された異種混合物としての上記全細胞標本は除外され、本発明のポリヌクレオチドは、電気泳動媒体において異種ポリヌクレオチドからさらに分離されていない（例えば、アガロースゲルまたはナイロンプロットにおいて異種バンド集合から単一バンドを切り出すことによるさらなる分離）。

【0110】

「プライマー」という用語は、標的ヌクレオチド配列に相補的であり、かつ標的ヌクレオチド配列とハイブリダイズさせるために使用される特定のオリゴヌクレオチド配列を意味する。プライマーは、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、または逆転写酵素によって触媒されるヌクレオチド重合の開始点として働く。

【0111】

「プローブ」という用語は、試料に存在する特定のポリヌクレオチド配列を同定するのに使用することができる、定義された核酸セグメント（またはヌクレオチド類似体セグメント、例えば以下に定義されるPNA）を示し、前記核酸セグメントは、同定されるべき特定のポリヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。

【0112】

「ポリペプチド」という用語は、ポリマーの長さに関係なく、アミノ酸のポリマーを意味する。したがって、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質がポリペプチドの定義内に含まれる。この用語はまた、ポリペプチドの発現後の修飾を指定しない、または除外する。例えば、グリコシル基、アセチル基、リン酸基、脂質基等の共有結合を含むポリペプチドは、「ポリペプチド」という用語によって特別に包含される。アミノ酸の1種または複数種の類似体（例えば、非天然アミノ酸、無関係の生体系に天然にのみ存在するアミノ酸、哺乳類系からの修飾アミノ酸など）を含有するポリペプチド、置換結合ならびに当技術分野で公知の他の修飾を有するポリペプチド、天然と非天然のどちらも定義内に含まれる。

【0113】

理論によって制限されることなく、本発明の化合物/ポリペプチドは、肝臓組織と末梢組織との間の食事性脂質の分配(partitioning)を調節することができ、したがって、肝臓および末梢組織間の食事性脂質の分配に関わる疾患が治療されると考えられる。「末梢組織」という用語は、筋肉および脂肪組織を含むことを意味する。好ましい実施形態において、本発明の化合物/ポリペプチドは、食事性脂質を筋肉へ分配する。代替の好ましい実施形態では、食事性脂質は脂肪組織に分配される。他の好ましい実施形態では、食事性脂質は肝臓に分配される。さらに他の好ましい実施形態において、本発明の化合物/ポリペプチドは、筋肉による食事性脂質、好ましくは遊離脂肪酸(FFA)の酸化を増加または減少させる。食事性脂質としては、限定されないが、トリグリセリドおよび遊離脂肪酸が挙げられる。

【0114】

食事性脂質の分配に関わると考えられる好ましい疾患としては、肥満症および肥満症関連疾患および障害、例えば、肥満症、耐糖能障害、インスリン抵抗性、アテローム性動脈硬化症、アテローム性疾患、心疾患、高血圧症、脳卒中、X症候群、インスリン非依存性糖尿病(NIDDMまたはII型糖尿病)およびインスリン依存性糖尿病(IDDMまたはI型糖尿病)が挙げられる。本発明の方法によって治療されるはずの糖尿病関連合併症としては、微小血管障害、眼球病変、網膜症、神経障害、および腎臓障害が挙げられる。心疾患としては、限定されないが、心不全、冠状動脈不、および高血圧症が挙げられる。本発明の化合物によって治療される、他の肥満症関連障害としては、高脂血症および高尿酸血症が挙げられる。本発明のさらに他の肥満症関連疾患または障害には、悪液質、るいそう、AIDSに関連する体重減少、癌に関連する体重減少、食欲不振および食欲亢進が挙げられる。

【0115】

本明細書において使用される場合、「異種」という用語は、本発明のGZIPポリペプチドをコードするGZIPポリペプチドまたはポリヌクレオチド以外のいずれかのポリペプチドまたはポリヌクレオチドを示すことが意図される。

【0116】

「を含む」、「からなる」、および「から本質的になる」という用語は、それらの標準的な意味に従って定義される。M.P.E.P.に示される定義された意味は、当技術分野における定義された意味を統制し、統制連邦巡回(controlling Federal Circuit)の判例法に示される定義された意味は、M.P.E.P.に示される意味を統制する。これを念頭において、本出願全体にわたり、それぞれの用語と関連する特定の意味を付けるために、用語を互いに置き換えることができる。

【0117】

本発明の特定のポリヌクレオチドの「宿主細胞組換え体」という用語は、前記細胞中に天然に見出されない、ある方法で前記ポリヌクレオチドを含有するように人工的に改変された宿主細胞を意味する。例えば、前記宿主細胞に、本発明の前記ポリヌクレオチドを一過的または安定的にトランスフェクトまたは形質導入することができる。

【0118】

本明細書において使用される、「生物活性」、「生物学的応答」および「生物学的効果

10

20

30

40

50

」という用語には、限定されないが、遊離脂肪酸レベルを下げる活性、グルコースレベルを下げる活性、トリグリセリドレベルを下げる活性、脂肪分解の促進、筋肉脂質または遊離脂肪酸の酸化の促進、肝細胞系におけるレプチン取り込みの増加、高脂肪食が原因の血漿遊離脂肪酸またはグルコースの食後増加の有意な低減、高脂肪食の結果としてのケトンの体内産生の有意な低減または解消、骨格筋細胞、脂肪細胞、赤血球もしくは脳におけるグルコースの取り込みの増加、インスリン感受性の増加、耐糖能障害からインスリン抵抗性への進行の抑制、体重の減少、体脂肪量の低下、除脂肪筋量の増加、代謝関連疾患もしくは障害の予防または治療、インスリン非依存性糖尿病もしくはインスリン依存性糖尿病の一部のヒトにおける血中グルコースの制御、インスリン抵抗性の治療、インスリン抵抗性発症の予防、および本明細書で述べられる他の活性が含まれる。

10

【0119】

本明細書において使用される、「肥満（症）」という用語は、体重のWHO分類で定義されている(Kopelman (2000) Nature 404: 635643)。標準以下はBMI 18.5未満であり（細い）；健康なのはBMI 18.5～24.9（標準）であり；グレード1の過体重は、BMI 25.0～29.9であり（太り過ぎ）；グレード2の過体重は、BMI 30.0～39.0（肥満）であり；グレード3の過体重は、BMI 40.0以上である。BMIは、肥満度指数（病的肥満）であり、 kg/m^2 である。腹囲を用いて代謝合併症のリスクを示すことも可能であり、男性の場合には、腹囲94cm以上であれば、リスクが高く、102cm以上であれば、かなりリスクが高いことを示す。女性の場合も同様に、腹囲88cm以上であれば、リスクが高く、88cm以上であれば、かなりリスクが高いことを示す。腹囲（cm）は、肋骨下線と骨盤上線の間で測定される。肥満のほかの測定としては、限定されないが、キャリパーを用いた皮下脂肪厚（cm）の測定である皮下脂肪厚測定、および除脂肪部分が本来電解質溶液であることから、体脂肪部分よりも良く電流を流すという原理に基づく、バイオインピーダンスが挙げられ；末端にわたりにかけられる弱電流（インピーダンス）に対する抵抗の測定によって、経験的に導き出された式を用いて、体脂肪の推定値が得られる。

20

【0120】

本明細書において使用される、「糖尿病」という用語は、限定されないが、以下のリスト：糖尿病の症状（例えば、多尿、多飲、多食）に加えて、200mg/dl以上の随時血漿グルコースレベル（随時血漿グルコースレベルは、飲食のタイミングにかかわらず、1日の任意の時点で定義される）；126mg/dl以下の8時間空腹時血漿グルコースレベル；水に溶解した無水グルコース75gを経口投与して2時間後の、200mg/dl以上の血漿グルコースレベル；が含まれる方法のうちのいずれかで行われる糖尿病の通常の診断を包含するように意図される。

30

【0121】

本明細書において使用される、「耐糖能障害（IGT）」という用語は、明白なNIDDMと正常耐糖能（NGT）との中間であるインスリン抵抗性と関連する病状を示すように意図される。IGT集団は、耐糖能正常のヒトと比べて、高い割合で、NIDDMに進行することが知られている(Sad et al., New Engl J Med 1988; 319: 1500-6)。したがって、IGTを低減または防ぐ、つまりインスリン抵抗性を正常化する治療法および方法を提供することによって、NIDDMへの進行を遅らせるか、または防ぐことができる。IGTは、食後2時間後の血漿グルコースレベルにより評価される、罹患患者の食後グルコース応答が異常であることが、決定される手順によって診断される。この試験では、一定量のグルコースが患者に与えられ、血中グルコースレベルが、一定の間隔で、通常最初の2時間は30分毎、その後は1時間毎に測定される。「正常」または非IGT個体において、グルコースレベルは、最初の2時間の間に140mg/dl未満のレベルに上昇し、次いで急速に低下する。IGT個体においては、血中グルコースレベルはより高く、低下レベルはより遅い速度である。

40

【0122】

本明細書において使用される、「インスリン抵抗性症候群」という用語は、早発性アテ

50

ローム硬化型血管疾患などの高血圧症および冠動脈疾患（C A D）両方の発症において重要な役割を果たす一連の現象を開始させるインスリン抵抗性を補おうとする試みから生じる異常性のクラスターを包含するように意図される。上昇した血漿トリグリセリドおよび低下したH D L - コレステロール濃度、C A Dと関連することが知られている症状もまた、インスリン抵抗性と関連することが報告されている。したがって、インスリン抵抗性を低減または予防するための治療法および方法を提供することによって、本発明は、インスリン抵抗性症候群の出現を低減または予防する方法を提供する。

【 0 1 2 3 】

本明細書において使用される、「多嚢胞性卵巣症候群（P C O S）」という用語は、アンドロゲン過剰症、慢性無排卵症、インスリン作用の障害、インスリン分泌の障害、卵巣のステロイド産生および線維素溶解によって特徴付けられる、閉経前の女性の病原学的に指定されていない疾患であり、この集団の5 ~ 1 0 %が発症する疾患を意味するように意図される。P C O Sの女性はインスリン抵抗性である場合が多く、3 0代および4 0代でグルコース不耐性またはN I D D Mを発症するリスクが高い(Dunaif et al. (1996) J Clin Endocrinol Metab 81: 3299)。アンドロゲン過剰症もまた、妖精症および脂肪萎縮性糖尿病によるA型症候群から、これらの症状が閉経前の女性に生じた場合のB型症候群まで、多種多様の異なるインスリン抵抗性状態の特徴である。高インスリン血症はそれ自体が、アンドロゲン過剰症を生じさせることが示唆されている。インスリン感受性改善薬、例えばトログリタゾンP C O Sに有効であり、特に、インスリン抵抗性のヒトなどにおいて、インスリン作用の障害、インスリン分泌の障害、卵巣のステロイド産生および線維素溶解が改善される(Ehrman et al. (1997) J Clin Invest 100: 1230)ことが示されている。

【 0 1 2 4 】

本明細書において使用される、「インスリン抵抗性」という用語は、限定されないが：静脈内の耐糖能試験または空腹時インスリンレベルの測定を含む、数多くの方法のいずれかによって行われるインスリン抵抗性の通常の診断を包含するように意図される。空腹時インスリンレベルの高さとインスリン抵抗性の程度との間には格別の相関性があることがよく知られている。したがって、正常耐糖能（N G T）の個体がインスリン抵抗性を有するかどうかを同定する目的のために、インスリン抵抗性の代理マーカーとして高い空腹時インスリンレベルを用いることが可能である。これを行うためのもう1つの方法は、The New England Journal of Medicine, No. 3, pp. 1188 (1995)に開示されているアプローチに従うこと、つまり治療群に入れるための最初の基準として肥満の対象を選択することである。一部の肥満の対象は耐糖能障害（I G T）を有するが、他の対象は正常耐糖能（N G T）を有する。本質的にすべての肥満の対象はインスリン抵抗性である、つまりN G Tの肥満の対象でさえインスリン抵抗性であることから、それらは空腹時高インスリン血症を有する。したがって、本発明による治療の標的は、肥満であるか、または空腹時高インスリン血症を有する、またはその両方である、N G T個体として定義することができる。

【 0 1 2 5 】

インスリン抵抗性の診断は、オイグリセミック・グルコースクランプ試験法を用いて行うこともできる。この試験は、一定のインスリン注入および可変速度のグルコース注入の同時投与を伴う。3 ~ 4時間継続する試験中、血漿グルコース濃度は、5 ~ 1 0分毎にグルコースレベルを測定し、次いで血漿グルコースレベルが変化しないように可変速度のグルコース注入を調節することによって、正常血糖レベルで一定に保たれる。これらの環境下にて、血流へのグルコース流入速度は、体内の全体的なグルコース処理速度に等しい。基本状態でのグルコース処理速度（インスリン注入なし）とインスリン注入状態でのグルコース処理速度との差は、インスリンにより仲介されるグルコース取り込みを表す。正常な個体において、インスリンは、全体的な体内グルコース処理を活発かつ大きく増加させるが、N I D D M対象においては、インスリンのこの効果は大きく鈍り、通常のわずか2 0 ~ 3 0 %である。I G TまたはN G Tを有するインスリン抵抗性の対象において、イン

スリンにより促進されたグルコース処理の速度は、正常とN I D D Mとのほぼ半分である。例えば、安定状態の血漿インスリン濃度約 1 0 0 u U / m l (生理学的レベル)では、正常な個体におけるグルコース処理速度は約 7 m g / k g / 分である。N I D D Mの対象では、約 2 . 5 m g / k g / 分であり、I G Tを有する患者(またはN G Tを有するインスリン抵抗性の対象)では、約 4 ~ 5 m g / k g / 分である。これは再現性が高く、正確な試験であり、これらの分類内で患者を区別することができる。対象のインスリン抵抗性が高くなるにつれて、空腹時インスリンレベルが上昇することも知られている。空腹時インスリンレベルの高さと、オイグリセミック・グルコースクランプ試験法によって測定されるインスリン抵抗性の程度との間には格別の正の相関性があり、したがって、これによって、インスリン抵抗性の代わりの測定として、空腹時インスリンレベルを使用することが理由付けされる。

10

【 0 1 2 6 】

「肝臓組織と末梢組織との間の食事性脂質の分配に作用する物質」という言い方は、上述のように肝臓組織と末梢組織との間の食事性脂質の分配を調節する、本発明の化合物またはポリペプチドを意味する。その作用物質は、筋肉による、食事性脂質、好ましくは遊離脂肪酸(F F A)の酸化を増加または減少させることが好ましい。好ましくは、その作用物質は、個体の重量を減少または増加させるか、あるいは肥満症関連疾患および障害、例えば、肥満症、耐糖能障害、インスリン抵抗性、アテローム性動脈硬化症、アテローム性疾患、心疾患、高血圧症、脳卒中、X症候群、インスリン非依存性糖尿病(N I D D MまたはI I 型糖尿病)およびインスリン依存性糖尿病(I D D MまたはI 型糖尿病)を治

20

【 0 1 2 7 】

「肝臓組織と末梢組織との間の食事性脂質の分配に作用する物質に対する応答」という言い方は、限定されないが、個体における、化合物を代謝する能力、プロドラッグを活性

30

【 0 1 2 8 】

「肝臓組織と末梢組織との間の食事性脂質の分配に作用する物質に対する副作用」という言い方は、薬物の主な薬理作用の拡大から生じる治療の有害作用、または固有宿主因子との薬物の相互作用から生じる特異体質の有害反応を意味する。「肝臓組織と末梢組織との間の食事性脂質の分配に作用する物質に対する副作用」には、制限されないが、皮膚科学的、血液学的もしくは肝臓学的毒性などの有害反応が含まれ、さらに、胃および腸管の潰瘍化、血小板機能障害、腎損傷、腎炎、大量の水様性鼻漏が分泌される血管運動神経性鼻炎、血管神経性浮腫、および気管支喘息ないし喉頭浮腫、および気管支収縮、低血圧、およびショックが含まれる。

40

【 0 1 2 9 】

本明細書において使用される、「G Z I P 関連疾患および障害」という用語は、G Z I P の異常機能を含む、またはG Z I P レベルもしくは活性を調節することにより治療または予防することが可能である、いずれかの疾患または障害を意味する。「G Z I P の異常機能」には、限定されないが、G Z I P の発現の異常なレベル(増加または減少したレベルではあるが、好ましくは増加したレベル)、G Z I P の異常な活性(増加または減少)、およびリガンドもしくは結合パートナーとの異常な相互作用(増加または減少)が含まれる。「異常」とは、正常細胞、組織、または患者において見られる、あるいは疾患発症前に細胞、組織、または患者に既に見られる活性のタイプまたはレベルからの変化を意味

50

する。好ましい実施形態では、これらのGZIP関連疾患および障害としては、上述の肥満症および代謝関連疾患および障害が挙げられる。

【0130】

「美容的な処置」という用語は、その個体が臨床的に肥満でない、または臨床的に細い場合に、個体の体重を増加または減少させる本発明の化合物またはポリペプチドでの処置を含む。したがって、これらの個体は、臨床的に肥満のカットオフ値未満（ 25 kg/m^2 未満）であり、臨床的に細いカットオフ値を超える（ 18.5 kg/m^2 を超える）肥満度指数（BMI）を有する。さらに、これらの個体は健康である（例えば、本発明の代謝関連疾患または障害を持たない）ことが好ましい。「美容的な処置」とは、状況によっては、脂肪組織のさらに局在的な増加、例えば、具体的にはウエストもしくはヒップ周り、またはヒップおよび太腿周りの増加または減少を包含することも意味する。脂肪組織のこれらの局在的な増加または減少は、例えば、ウエストまたはヒップサイズの増加または減少によって同定することができる。

10

【0131】

本明細書において使用される、「予防（防ぐ）」という用語は、肥満症に関連する異常性の物理的な発現を防ぐために、疾患または病状の臨床症状の発症前に化合物、またはGZIPを投与することを意味する。

【0132】

本明細書において使用される、「治療（処置）」という用語は、臨床症状の発症後に化合物を投与することを意味する。

20

【0133】

本明細書において使用される、「治療（処置）の必要のある」という用語は、介護者（例えば、ヒトの場合には、医師、看護師、ナースプラクティショナー等；非ヒト哺乳動物などの動物の場合には獣医師）により下される、個体または動物が治療からの恩恵を必要とするか、または治療からの恩恵を受けるであろうという判断を意味する。この判断は、介護者の専門知識の域にあるが、本発明の化合物によって治療可能である病状の結果として、個体または動物が病気である、または病気であるだろうという知識を含む、様々な因子に基づいて下される。

【0134】

「治療（処置）が必要である」と考える」という用語は、個体が上記の「美容的な治療（処置）」で記述される美容的な理由のために体重を減らすことを望むという亜臨床的な決定を意味する。他の実施形態において「治療（処置）が必要である」と考える」という用語は、動物の飼い主が動物の美容的な治療に対して下す決定を意味し得る。

30

【0135】

本明細書において使用される、「個体」または「患者」は、哺乳動物、好ましくはマウス、ラット、他のげっ歯類、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、もしくは霊長類、最も好ましくはヒトを含む、いずれかの動物を意味する。

【0136】

本明細書において使用される、「非ヒト動物」とは、鳥類、さらに一般的には哺乳動物、好ましくは霊長類、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ロバ、ウマ、ネコ、イヌ、ウサギもしくはげっ歯類、さらに好ましくはラットもしくはマウスを含む、いずれかの非ヒト脊椎動物を意味する。「動物」と「哺乳動物」のどちらも、「非ヒト」という用語が前述されていない限り、特にヒトの対象を含む。

40

【0137】

本発明者らは、GZIPポリペプチドは、レプチン、インスリンまたはグルカゴンには影響しないが、高脂肪／高ショ糖食を与えたマウスにおいて、血漿遊離脂肪酸、グルコース、およびトリグリセリドの食後応答を有意に低減することができる」と考える。さらに、GZIPポリペプチドは、インビトロおよびエキスピボで筋肉の遊離脂肪酸の酸化を調節し、好ましくは酸化を高めると考えられる。さらに、本発明のGZIPポリペプチドは、高脂肪／高ショ糖食を与えられたマウスにおいて体重増加を調節すると考えられる。また

50

さらに、本発明のGZIPポリペプチドをAPM1ポリペプチド断片と組み合わせて使用して、GZIPポリペプチド断片またはAPM1ポリペプチド断片を単独で含有する組成物の予想される効果よりも高い生物学的効果（例えば、遊離脂肪酸レベルを下げる活性）を得ることができる。

【0138】

本発明は、遊離脂肪酸（FFA）の分配における、およびエネルギー・ホメオスタシスを制御する重要な新しいツールとしての、GZIPポリペプチドの使用を包含する。循環から脂質を有意に除去し、FFA酸化を生じさせることができる組織の中で、量的に筋肉が最も重要であると考えられる。

本発明の好ましい実施形態

I. 本発明のGZIPポリペプチド

インビトロおよびインビボで測定可能な活性を有するGZIPポリペプチドが同定されている。これらの活性には、限定されないが、高脂肪/高ショ糖食を与えたマウスにおける血漿遊離脂肪酸、グルコース、およびトリグリセリドの調節、好ましくは低減（実施例6）、インビトロおよびエキスピボでの筋肉の遊離脂肪酸酸化の変化、好ましくは増加（実施例10）、高脂肪/高ショ糖食のマウスの持続的な体重減少が含まれる。インビトロおよびインビボでのGZIPポリペプチド活性についての他のアッセイもまた、提供され（例えば、実施例2～14）、当業者によって同等なアッセイを設計することができる。

【0139】

「GZIPポリペプチド」という用語は、「完全長」ポリペプチドと「完全長」GZIPポリペプチド断片のどちらも含む（上記の種それぞれは特に指定されているが）。

【0140】

本明細書において使用される、「インタクトな」または「完全長」GZIPポリペプチドは、N末端メチオニンからC末端終止コドンまでのGZIPポリペプチドの完全長ポリペプチド配列を意味する。インタクトな、または完全長GZIPポリペプチドの例は、配列表に記載されている。

【0141】

本明細書において使用される、「代謝関連活性」という用語は、GZIPポリペプチドに関する、本明細書に記載の活性の少なくとも1種、好ましくはすべてを意味する。これらの活性を決定するアッセイは、本明細書に提供されており（例えば、実施例2～14）、同等なアッセイを当業者により設計することができる。任意に、「代謝関連活性」は、脂質分配、脂質代謝、およびインスリン様活性、またはこれらの分類のうちの1つに入る活性からなる群から選択することができる。「脂質分配」活性とは、脂肪組織、肝臓、および筋肉を含む主な組織群の中での食事性脂質の位置に影響を及ぼす能力を意味する。本発明者らは、本発明のGZIPポリペプチドは、筋肉、肝臓または脂肪組織への脂質の分配において役割を果たすと考え、「脂質代謝」活性とは、脂質の代謝に影響を及ぼす能力を意味する。本発明のGZIPポリペプチドは、血漿中の遊離脂肪酸のレベルに影響を及ぼす能力、ならびに遊離脂肪酸酸化の実験による筋肉における脂質代謝を調節する、好ましくは増加する能力、かつ血漿および筋肉中のトリグリセリドのレベルに一過的に影響を及ぼす能力を有すると本発明者らは考える。「インスリン様」活性とは、血漿中のグルコースレベルを調節するポリペプチドの能力を意味する。GZIPポリペプチドはインスリンレベルに有意に影響を与えないが、インスリンの効果と同様にグルコースレベルには影響を与えると、本発明者らは考える。これらの効果は、インタクトな(完全長)GZIPポリペプチドの存在下では様々であり、または完全長GZIPポリペプチドと比較して、GZIPポリペプチド断片の存在下では有意に高い。

【0142】

本明細書に使用される「有意に高い」とは、同じアッセイにおける未処理細胞と比較して、代謝関連アッセイにおけるGZIPポリペプチドの活性の比較を意味する。本明細書に使用される「有意に高い」とは、当業者によって通常決定されるように統計学的に有意であることを意味する。例えば、データは通常、平均±SEMとして計算され、p値<0

10

20

30

40

50

．05は、統計学的に有意であると見なされる。統計的解析は通常、各研究において適切な、対応のないスチューデントt検定または対応のあるスチューデントt検定を用いて行われる。未処理細胞と比較して、本発明のGZIPポリペプチドの存在の結果としての活性の有意な変化の例には、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、または75%の、所定のパラメーターの増加または減少が含まれる。測定可能なパラメーターの必ずしもすべてではなく、1つまたは複数が、未処理細胞と比較して、GZIPポリペプチドの存在下にて有意に変化するだろう。

【0143】

代表的な「代謝関連アッセイ」を実施例に示す。これらのアッセイとしては、限定されないが、食後応答を測定する方法、遊離脂肪酸の酸化を測定する方法、および体重調節 (weight modulation) を測定する方法が挙げられる。好ましい実施形態において、食後の応答が、非ヒト動物、好ましくはマウスにおいて測定される。好ましい実施形態では、食事性脂質、好ましくは遊離脂肪酸またはトリグリセリドの変化が測定される。他の実施形態において、他の生理学的パラメーター、限定されないが、グルコース、インスリン、およびレプチンのレベルなどが測定される。他の好ましい実施形態では、遊離脂肪酸の酸化は、インビトロまたはエキスピボにて細胞において、好ましくは、非ヒト動物、好ましくはマウスの筋細胞または組織において測定される。さらに他の好ましい実施形態において、体重調節は、高脂肪/高ショ糖食のヒトもしくは非ヒト動物、好ましくはげっ歯類 (ラットもしくはマウス)、霊長類、イヌ、ネコまたはブタにおいて測定される。任意に、「代謝関連活性」には、本明細書において明確に同定されていない他の活性が含まれる。一般に、肥満症および代謝研究の分野に関連する「測定可能なパラメーター」は、遊離脂肪酸レベル、遊離脂肪酸の酸化、トリグリセリドレベル、グルコースレベル、インスリンレベル、レプチンレベル、食物摂取、体重、レプチンおよびリポタンパク質結合、取り込みおよび分解および脂肪分解促進受容体 (LSR) の発現からなる群から選択される。

【0144】

これらの代謝関連アッセイにおいて、好ましいGZIPポリペプチドは、食後高脂血症、遊離脂肪酸レベル、リグリセリドレベル、グルコースレベル、遊離脂肪酸の酸化、および体重からなる群から選択される測定可能なパラメーターのうちの少なくとも1つの有意な変化を生じさせるだろう。一方、好ましいGZIPポリペプチドは、LSR活性の増加、レプチン活性の増加およびリポタンパク質活性の増加からなる群から選択される測定可能なパラメーターのうちの少なくとも1つの有意な変化を生じさせるだろう。「LSR」活性とは、細胞表面上の、または特定のコンフォメーションにおけるLSRの発現、ならびにレプチンおよびリポタンパク質に結合し、それらを取り込み、分解するその能力を意味する。「レプチン」活性とは、LSRによるその結合、取り込みおよび分解、ならびに血液脳関門を通過するその輸送、およびLSRが必ずしも仲介因子ではない、または単なる仲介因子である場合の、潜在的なこれらの存在を意味する。同様に、「リポタンパク質」活性とは、LSRによるその結合、取り込みおよび分解、ならびにLSRが必ずしも仲介因子ではない、または単なる仲介因子である場合の、これらの存在を意味する。

【0145】

本発明は、特に単離、精製または組換えGZIPポリペプチドに関する。本発明のGZIPポリペプチドは、美容的処置として、または代謝関連疾患および障害の治療もしくは予防に、体重を減少または増加させるのに (GZIPポリペプチドのアンタゴニストを用いて) 有効である。GZIPポリペプチドは、特に、GZIPポリペプチド活性のアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニングアッセイにおいても有用である。そのGZIPポリペプチド活性は、APM1ポリペプチド、特にgAPM1ポリペプチドに結合するGZIPの能力であることが好ましい。

【0146】

完全長GZIPポリペプチドは、

1. 配列番号: 2の1~20位または配列番号: 3の1~17位のアミノ酸からのN末

10

20

30

40

50

端の推定シグナル配列；

2. 2ドメインと共に、遊離脂肪酸の結合溝を構成する、配列番号：2のおよそ21～112位または配列番号：3のおよそ18～109位のアミノ酸からの1ドメイン；

3. 2ドメインと共に、遊離脂肪酸の結合溝を構成する、配列番号：2のおよそ113～204位または配列番号：3のおよそ110～201位のアミノ酸からの2ドメイン；

4. APM1結合部位を含む、配列番号：2のおよそ205～298位または配列番号：3のおよそ202～295位のアミノ酸からの3ドメイン；を含む、少なくとも4つの異なる領域で構成される。

【0147】

本発明は特に、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開番号：WO01/51645に記載の、本発明のGZIPポリペプチドと結合することができる、単離、精製、または組換えAPM1ポリペプチドに関する。

【0148】

完全長APM1ポリペプチドは、

1. 配列番号4の1～17位のアミノ酸からのN末端の推定シグナル配列；

2. 配列番号：4の18～41位のアミノ酸からの非反復領域；

3. 配列番号：4の42～107位のアミノ酸からのコラーゲン様領域；

4. 配列番号：4の108～244位のアミノ酸からの球状領域；を含む、少なくとも4つの異なる領域で構成される。

【0149】

本明細書において使用される、「APM1ポリペプチド」という用語は、N末端メチオニンからC末端終止コドンまでの、いずれかのAPM1ポリペプチドの完全長ポリペプチド配列を意味する。インタクトな、または完全長APM1ポリペプチドの例は、配列番号：4に示されている。本明細書において使用される、「APM1ポリペプチド断片」という用語は、「肥満症関連活性」を有する「インタクトな」または「完全長」APM1ポリペプチドの断片を意味する。「gAPM1ポリペプチド」および「gAPM1ポリペプチド断片」という用語は同義で使用され、球状領域のみのポリペプチド断片を意味し、したがって、「APM1ポリペプチド断片」よりも狭い意味の用語である。

【0150】

本発明のGZIPポリペプチドは、単離状態で提供されることが好ましく、一部または実質的に精製される。GZIPポリペプチドのいずれか1つの組換えにより作製された種類は、Smithら((1988) Gene 67 (1) : 31-40)によって記述されている一工程法によって、または本明細書に記載されている、もしくは当技術分野で公知の方法によって実質的に精製することができる。本発明のポリペプチドは、当技術分野で公知のタンパク質精製方法によって本発明のポリペプチドに対して作られた抗体を用いて、天然源または組換え源から精製することもできる。

【0151】

GZIPポリペプチドの部分的精製またはGZIPポリペプチドの選択を含む、本発明のGZIPポリペプチドの作製もまた、具体的に企図される。これらの未精製調製物は、断片を完全に精製する前であるが、おそらくさらに数回の精製工程を用いた、GZIPポリペプチドを発現する細胞の濃縮の結果であると考えられる。GZIPポリペプチドを発現する細胞は、ペレット中に存在し、例えばそれらは溶解されるか、または未精製ポリペプチドは凍結乾燥される。

【0152】

GZIPポリペプチド断片は、少なくとも6個の連続するアミノ酸から、完全長GZIPポリペプチドより1アミノ酸短い長さまでの、任意の整数のアミノ酸数の長さであり得る。このように、配列番号：2のポリペプチドに関しては、GZIPポリペプチドは、例えば任意の整数個の6～297位の連続するアミノ酸であり得る。「整数」という用語は、本明細書においてその数学的意味で使用され、したがって、代表的な整数としては、限

10

20

30

40

50

定されないが：6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296または297が挙げられる。

【0153】

上述の各GZIPポリペプチド断片はさらに、N末端およびC末端位置の点から指定することができる。例えば、少なくとも6個の連続するアミノ酸から、配列番号：2の完全長ポリペプチドより1アミノ酸短い断片が、配列番号：2の任意のインタクトなかつ連続する完全長ポリペプチド配列上で占め得るN末端およびC末端位置のあらゆる組み合わせが、本発明に包含される。したがって、6個の連続するアミノ酸の断片は、配列番号：2の1～6、2～7、3～8、4～9、5～10、6～11、7～12、8～13、9～14、10～15、11～16、12～17、13～18、14～19、15～20、16～21、17～22、18～23、19～24、20～25、21～26、22～27、23～28、24～29、25～30、26～31、27～32、28～33、29～34、30～35、31～36、32～37、33～38、34～39、35～40、36～41、37～42、38～43、39～44、40～45、41～46、42～47、43～48、44～49、45～50、46～51、47～52、48～53、49～54、50～55、51～56、52～57、53～58、54～59、55～60、56～61、57～62、58～63、59～64、60～65、61～66、62～67、63～68、64～69、65～70、66～71、67～72、68～73、69～74、70～75、71～76、72～77、73～78、74～79、75～80、76～81、77～82、78～83、79～84、80～85、81～86、82～87、83～88、84～89、85～90、86～91、87～92、88～93、89～94、90～95、91～96、92～97、93～98、94～99、95～100、96～101、97～102、98～103、99～104、100～105、101～106、102～107、103～108、104～109、105～110、106～1

1 1、1 0 7 ~ 1 1 2、1 0 8 ~ 1 1 3、1 0 9 ~ 1 1 4、1 1 0 ~ 1 1 5、1 1 1 ~ 1
 1 6、1 1 2 ~ 1 1 7、1 1 3 ~ 1 1 8、1 1 4 ~ 1 1 9、1 1 5 ~ 1 2 0、1 1 6 ~ 1
 2 1、1 1 7 ~ 1 2 2、1 1 8 ~ 1 2 3、1 1 9 ~ 1 2 4、1 2 0 ~ 1 2 5、1 2 1 ~ 1
 2 6、1 2 2 ~ 1 2 7、1 2 3 ~ 1 2 8、1 2 4 ~ 1 2 9、1 2 5 ~ 1 3 0、1 2 6 ~ 1
 3 1、1 2 7 ~ 1 3 2、1 2 8 ~ 1 3 3、1 2 9 ~ 1 3 4、1 3 0 ~ 1 3 5、1 3 1 ~ 1
 3 6、1 3 2 ~ 1 3 7、1 3 3 ~ 1 3 8、1 3 4 ~ 1 3 9、1 3 5 ~ 1 4 0、1 3 6 ~ 1
 4 1、1 3 7 ~ 1 4 2、1 3 8 ~ 1 4 3、1 3 9 ~ 1 4 4、1 4 0 ~ 1 4 5、1 4 1 ~ 1
 4 6、1 4 2 ~ 1 4 7、1 4 3 ~ 1 4 8、1 4 4 ~ 1 4 9、1 4 5 ~ 1 5 0、1 4 6 ~ 1
 5 1、1 4 7 ~ 1 5 2、1 4 8 ~ 1 5 3、1 4 9 ~ 1 5 4、1 5 0 ~ 1 5 5、1 5 1 ~ 1
 5 6、1 5 2 ~ 1 5 7、1 5 3 ~ 1 5 8、1 5 4 ~ 1 5 9、1 5 5 ~ 1 6 0、1 5 6 ~ 1
 6 1、1 5 7 ~ 1 6 2、1 5 8 ~ 1 6 3、1 5 9 ~ 1 6 4、1 6 0 ~ 1 6 5、1 6 1 ~ 1
 6 6、1 6 2 ~ 1 6 7、1 6 3 ~ 1 6 8、1 6 4 ~ 1 6 9、1 6 5 ~ 1 7 0、1 6 6 ~ 1
 7 1、1 6 7 ~ 1 7 2、1 6 8 ~ 1 7 3、1 6 9 ~ 1 7 4、1 7 0 ~ 1 7 5、1 7 1 ~ 1
 7 6、1 7 2 ~ 1 7 7、1 7 3 ~ 1 7 8、1 7 4 ~ 1 7 9、1 7 5 ~ 1 8 0、1 7 6 ~ 1
 8 1、1 7 7 ~ 1 8 2、1 7 8 ~ 1 8 3、1 7 9 ~ 1 8 4、1 8 0 ~ 1 8 5、1 8 1 ~ 1
 8 6、1 8 2 ~ 1 8 7、1 8 3 ~ 1 8 8、1 8 4 ~ 1 8 9、1 8 5 ~ 1 9 0、1 8 6 ~ 1
 9 1、1 8 7 ~ 1 9 2、1 8 8 ~ 1 9 3、1 8 9 ~ 1 9 4、1 9 0 ~ 1 9 5、1 9 1 ~ 1
 9 6、1 9 2 ~ 1 9 7、1 9 3 ~ 1 9 8、1 9 4 ~ 1 9 9、1 9 5 ~ 2 0 0、1 9 6 ~ 2
 0 1、1 9 7 ~ 2 0 2、1 9 8 ~ 2 0 3、1 9 9 ~ 2 0 4、2 0 0 ~ 2 0 5、2 0 1 ~ 2
 0 6、2 0 2 ~ 2 0 7、2 0 3 ~ 2 0 8、2 0 4 ~ 2 0 9、2 0 5 ~ 2 1 0、2 0 6 ~ 2
 1 1、2 0 7 ~ 2 1 2、2 0 8 ~ 2 1 3、2 0 9 ~ 2 1 4、2 1 0 ~ 2 1 5、2 1 1 ~ 2
 1 6、2 1 2 ~ 2 1 7、2 1 3 ~ 2 1 8、2 1 4 ~ 2 1 9、2 1 5 ~ 2 2 0、2 1 6 ~ 2
 2 1、2 1 7 ~ 2 2 2、2 1 8 ~ 2 2 3、2 1 9 ~ 2 2 4、2 2 0 ~ 2 2 5、2 2 1 ~ 2
 2 6、2 2 2 ~ 2 2 7、2 2 3 ~ 2 2 8、2 2 4 ~ 2 2 9、2 2 5 ~ 2 3 0、2 2 6 ~ 2
 3 1、2 2 7 ~ 2 3 2、2 2 8 ~ 2 3 3、2 2 9 ~ 2 3 4、2 3 0 ~ 2 3 5、2 3 1 ~ 2
 3 6、2 3 2 ~ 2 3 7、2 3 3 ~ 2 3 8、2 3 4 ~ 2 3 9、2 3 5 ~ 2 4 0、2 3 6 ~ 2
 4 1、2 3 7 ~ 2 4 2、2 3 8 ~ 2 4 3、2 3 9 ~ 2 4 4、2 4 0 ~ 2 4 5、2 4 1 ~ 2
 4 6、2 4 2 ~ 2 4 7、2 4 3 ~ 2 4 8、2 4 4 ~ 2 4 9、2 4 5 ~ 2 5 0、2 4 6 ~ 2
 5 1、2 4 7 ~ 2 5 2、2 4 8 ~ 2 5 3、2 4 9 ~ 2 5 4、2 5 0 ~ 2 5 5、2 5 1 ~ 2
 5 6、2 5 2 ~ 2 5 7、2 5 3 ~ 2 5 8、2 5 4 ~ 2 5 9、2 5 5 ~ 2 6 0、2 5 6 ~ 2
 6 1、2 5 7 ~ 2 6 2、2 5 8 ~ 2 6 3、2 5 9 ~ 2 6 4、2 6 0 ~ 2 6 5、2 6 1 ~ 2
 6 6、2 6 2 ~ 2 6 7、2 6 3 ~ 2 6 8、2 6 4 ~ 2 6 9、2 6 5 ~ 2 7 0、2 6 6 ~ 2
 7 1、2 6 7 ~ 2 7 2、2 6 8 ~ 2 7 3、2 6 9 ~ 2 7 4、2 7 0 ~ 2 7 5、2 7 1 ~ 2
 7 6、2 7 2 ~ 2 7 7、2 7 3 ~ 2 7 8、2 7 4 ~ 2 7 9、2 7 5 ~ 2 8 0、2 7 6 ~ 2
 8 1、2 7 7 ~ 2 8 2、2 7 8 ~ 2 8 3、2 7 9 ~ 2 8 4、2 8 0 ~ 2 8 5、2 8 1 ~ 2
 8 6、2 8 2 ~ 2 8 7、2 8 3 ~ 2 8 8、2 8 4 ~ 2 8 9、2 8 5 ~ 2 9 0、2 8 6 ~ 2
 9 1、2 8 7 ~ 2 9 2、2 8 8 ~ 2 9 3、2 8 9 ~ 2 9 4、2 9 0 ~ 2 9 5、2 9 1 ~ 2
 9 6、2 9 2 ~ 2 9 7、2 9 3 ~ 2 9 8 位からなる群から選択される位置を占め得る。

【 0 1 5 4 】

同様に、配列番号：2における12個のアミノ酸から298個のアミノ酸のサイズの他の断片すべてによって占められる位置が、本発明に包含される。したがって、12個の連続するアミノ酸の断片は、配列番号：2の1~12、2~13、3~14、4~15、5~16、6~17、7~18、8~19、9~20、10~21、11~22、12~23、13~24、14~25、15~26、16~27、17~28、18~29、19~30、20~31、21~32、22~33、23~34、24~35、25~36、26~37、27~38、28~39、29~40、30~41、31~42、32~43、33~44、34~45、35~46、36~47、37~48、38~49、39~50、40~51、41~52、42~53、43~54、44~55、45~56、46~57、47~58、48~59、49~60、50~61、51~62、52~63、53~64、54~65、55~66、56~67、57~68、58~69、59

~ 7 0、6 0 ~ 7 1、6 1 ~ 7 2、6 2 ~ 7 3、6 3 ~ 7 4、6 4 ~ 7 5、6 5 ~ 7 6、
 6 6 ~ 7 7、6 7 ~ 7 8、6 8 ~ 7 9、6 9 ~ 8 0、7 0 ~ 8 1、7 1 ~ 8 2、7 2 ~ 8
 3、7 3 ~ 8 4、7 4 ~ 8 5、7 5 ~ 8 6、7 6 ~ 8 7、7 7 ~ 8 8、7 8 ~ 8 9、7 9
 ~ 9 0、8 0 ~ 9 1、8 1 ~ 9 2、8 2 ~ 9 3、8 3 ~ 9 4、8 4 ~ 9 5、8 5 ~ 9 6、
 8 6 ~ 9 7、8 7 ~ 9 8、8 8 ~ 9 9、8 9 ~ 1 0 0、9 0 ~ 1 0 1、9 1 ~ 1 0 2、9
 2 ~ 1 0 3、9 3 ~ 1 0 4、9 4 ~ 1 0 5、9 5 ~ 1 0 6、9 6 ~ 1 0 7、9 7 ~ 1 0 8
 、9 8 ~ 1 0 9、9 9 ~ 1 1 0、1 0 0 ~ 1 1 1、1 0 1 ~ 1 1 2、1 0 2 ~ 1 1 3、1
 0 3 ~ 1 1 4、1 0 4 ~ 1 1 5、1 0 5 ~ 1 1 6、1 0 6 ~ 1 1 7、1 0 7 ~ 1 1 8、1
 0 8 ~ 1 1 9、1 0 9 ~ 1 2 0、1 1 0 ~ 1 2 1、1 1 1 ~ 1 2 2、1 1 2 ~ 1 2 3、1
 1 3 ~ 1 2 4、1 1 4 ~ 1 2 5、1 1 5 ~ 1 2 6、1 1 6 ~ 1 2 7、1 1 7 ~ 1 2 8、1
 1 8 ~ 1 2 9、1 1 9 ~ 1 3 0、1 2 0 ~ 1 3 1、1 2 1 ~ 1 3 2、1 2 2 ~ 1 3 3、1
 2 3 ~ 1 3 4、1 2 4 ~ 1 3 5、1 2 5 ~ 1 3 6、1 2 6 ~ 1 3 7、1 2 7 ~ 1 3 8、1
 2 8 ~ 1 3 9、1 2 9 ~ 1 4 0、1 3 0 ~ 1 4 1、1 3 1 ~ 1 4 2、1 3 2 ~ 1 4 3、1
 3 3 ~ 1 4 4、1 3 4 ~ 1 4 5、1 3 5 ~ 1 4 6、1 3 6 ~ 1 4 7、1 3 7 ~ 1 4 8、1
 3 8 ~ 1 4 9、1 3 9 ~ 1 5 0、1 4 0 ~ 1 5 1、1 4 1 ~ 1 5 2、1 4 2 ~ 1 5 3、1
 4 3 ~ 1 5 4、1 4 4 ~ 1 5 5、1 4 5 ~ 1 5 6、1 4 6 ~ 1 5 7、1 4 7 ~ 1 5 8、1
 4 8 ~ 1 5 9、1 4 9 ~ 1 6 0、1 5 0 ~ 1 6 1、1 5 1 ~ 1 6 2、1 5 2 ~ 1 6 3、1
 5 3 ~ 1 6 4、1 5 4 ~ 1 6 5、1 5 5 ~ 1 6 6、1 5 6 ~ 1 6 7、1 5 7 ~ 1 6 8、1
 5 8 ~ 1 6 9、1 5 9 ~ 1 7 0、1 6 0 ~ 1 7 1、1 6 1 ~ 1 7 2、1 6 2 ~ 1 7 3、1
 6 3 ~ 1 7 4、1 6 4 ~ 1 7 5、1 6 5 ~ 1 7 6、1 6 6 ~ 1 7 7、1 6 7 ~ 1 7 8、1
 6 8 ~ 1 7 9、1 6 9 ~ 1 8 0、1 7 0 ~ 1 8 1、1 7 1 ~ 1 8 2、1 7 2 ~ 1 8 3、1
 7 3 ~ 1 8 4、1 7 4 ~ 1 8 5、1 7 5 ~ 1 8 6、1 7 6 ~ 1 8 7、1 7 7 ~ 1 8 8、1
 7 8 ~ 1 8 9、1 7 9 ~ 1 9 0、1 8 0 ~ 1 9 1、1 8 1 ~ 1 9 2、1 8 2 ~ 1 9 3、1
 8 3 ~ 1 9 4、1 8 4 ~ 1 9 5、1 8 5 ~ 1 9 6、1 8 6 ~ 1 9 7、1 8 7 ~ 1 9 8、1
 8 8 ~ 1 9 9、1 8 9 ~ 2 0 0、1 9 0 ~ 2 0 1、1 9 1 ~ 2 0 2、1 9 2 ~ 2 0 3、1
 9 3 ~ 2 0 4、1 9 4 ~ 2 0 5、1 9 5 ~ 2 0 6、1 9 6 ~ 2 0 7、1 9 7 ~ 2 0 8、1
 9 8 ~ 2 0 9、1 9 9 ~ 2 1 0、2 0 0 ~ 2 1 1、2 0 1 ~ 2 1 2、2 0 2 ~ 2 1 3、2
 0 3 ~ 2 1 4、2 0 4 ~ 2 1 5、2 0 5 ~ 2 1 6、2 0 6 ~ 2 1 7、2 0 7 ~ 2 1 8、2
 0 8 ~ 2 1 9、2 0 9 ~ 2 2 0、2 1 0 ~ 2 2 1、2 1 1 ~ 2 2 2、2 1 2 ~ 2 2 3、2
 1 3 ~ 2 2 4、2 1 4 ~ 2 2 5、2 1 5 ~ 2 2 6、2 1 6 ~ 2 2 7、2 1 7 ~ 2 2 8、2
 1 8 ~ 2 2 9、2 1 9 ~ 2 3 0、2 2 0 ~ 2 3 1、2 2 1 ~ 2 3 2、2 2 2 ~ 2 3 3、2
 2 3 ~ 2 3 4、2 2 4 ~ 2 3 5、2 2 5 ~ 2 3 6、2 2 6 ~ 2 3 7、2 2 7 ~ 2 3 8、2
 2 8 ~ 2 3 9、2 2 9 ~ 2 4 0、2 3 0 ~ 2 4 1、2 3 1 ~ 2 4 2、2 3 2 ~ 2 4 3、2
 3 3 ~ 2 4 4、2 3 4 ~ 2 4 5、2 3 5 ~ 2 4 6、2 3 6 ~ 2 4 7、2 3 7 ~ 2 4 8、2
 3 8 ~ 2 4 9、2 3 9 ~ 2 5 0、2 4 0 ~ 2 5 1、2 4 1 ~ 2 5 2、2 4 2 ~ 2 5 3、2
 4 3 ~ 2 5 4、2 4 4 ~ 2 5 5、2 4 5 ~ 2 5 6、2 4 6 ~ 2 5 7、2 4 7 ~ 2 5 8、2
 4 8 ~ 2 5 9、2 4 9 ~ 2 6 0、2 5 0 ~ 2 6 1、2 5 1 ~ 2 6 2、2 5 2 ~ 2 6 3、2
 5 3 ~ 2 6 4、2 5 4 ~ 2 6 5、2 5 5 ~ 2 6 6、2 5 6 ~ 2 6 7、2 5 7 ~ 2 6 8、2
 5 8 ~ 2 6 9、2 5 9 ~ 2 7 0、2 6 0 ~ 2 7 1、2 6 1 ~ 2 7 2、2 6 2 ~ 2 7 3、2
 6 3 ~ 2 7 4、2 6 4 ~ 2 7 5、2 6 5 ~ 2 7 6、2 6 6 ~ 2 7 7、2 6 7 ~ 2 7 8、2
 6 8 ~ 2 7 9、2 6 9 ~ 2 8 0、2 7 0 ~ 2 8 1、2 7 1 ~ 2 8 2、2 7 2 ~ 2 8 3、2
 7 3 ~ 2 8 4、2 7 4 ~ 2 8 5、2 7 5 ~ 2 8 6、2 7 6 ~ 2 8 7、2 7 7 ~ 2 8 8、2
 7 8 ~ 2 8 9、2 7 9 ~ 2 9 0、2 8 0 ~ 2 9 1、2 8 1 ~ 2 9 2、2 8 2 ~ 2 9 3、2
 8 3 ~ 2 9 4、2 8 4 ~ 2 9 5、2 8 5 ~ 2 9 6、2 8 6 ~ 2 9 7、2 8 7 ~ 2 9 8 位か
 らなる群から選択される位置を占め得る。

【 0 1 5 5 】

同様に、配列番号：2における50個のアミノ酸から298個のアミノ酸のサイズの他の断片すべてによって占められる位置が、本発明に包含される。したがって、50個の連続するアミノ酸の断片は、配列番号：2の1~50、2~51、3~52、4~53、5~54、6~55、7~56、8~57、9~58、10~59、11~60、12~6

10

20

30

40

50

1、13～62、14～63、15～64、16～65、17～66、18～67、19
 ～68、20～69、21～70、22～71、23～72、24～73、25～74、
 26～75、27～76、28～77、29～78、30～79、31～80、32～8
 1、33～82、34～83、35～84、36～85、37～86、38～87、39
 ～88、40～89、41～90、42～91、43～92、44～93、45～94、
 46～95、47～96、48～97、49～98、50～99、51～100、52～
 101、53～102、54～103、55～104、56～105、57～106、5
 8～107、59～108、60～109、61～110、62～111、63～112
 、64～113、65～114、66～115、67～116、68～117、69～1
 18、70～119、71～120、72～121、73～122、74～123、75
 ～124、76～125、77～126、78～127、79～128、80～129、
 81～130、82～131、83～132、84～133、85～134、86～13
 5、87～136、88～137、89～138、90～139、91～140、92～
 141、93～142、94～143、95～144、96～145、97～146、9
 8～147、99～148、100～149、101～150、102～151、103
 ～152、104～153、105～154、106～155、107～156、108
 ～157、109～158、110～159、111～160、112～161、113
 ～162、114～163、115～164、116～165、117～166、118
 ～167、119～168、120～169、121～170、122～171、123
 ～172、124～173、125～174、126～175、127～176、128
 ～177、129～178、130～179、131～180、132～181、133
 ～182、134～183、135～184、136～185、137～186、138
 ～187、139～188、140～189、141～190、142～191、143
 ～192、144～193、145～194、146～195、147～196、148
 ～197、149～198、150～199、151～200、152～201、153
 ～202、154～203、155～204、156～205、157～206、158
 ～207、159～208、160～209、161～210、162～211、163
 ～212、164～213、165～214、166～215、167～216、168
 ～217、169～218、170～219、171～220、172～221、173
 ～222、174～223、175～224、176～225、177～226、178
 ～227、179～228、180～229、181～230、182～231、183
 ～232、184～233、185～234、186～235、187～236、188
 ～237、189～238、190～239、191～240、192～241、193
 ～242、194～243、195～244、196～245、197～246、198
 ～247、199～248、200～249、201～250、202～251、203
 ～252、204～253、205～254、206～255、207～256、208
 ～257、209～258、210～259、211～260、212～261、213
 ～262、214～263、215～264、216～265、217～266、218
 ～267、219～268、220～269、221～270、222～271、223
 ～272、224～273、225～274、226～275、227～276、228
 ～277、229～278、230～279、231～280、232～281、233
 ～282、234～283、235～284、236～285、237～286、238
 ～287、239～288、240～289、241～290、242～291、243
 ～292、244～293、245～294、246～295、247～296、248
 ～297、249～298位からなる群から選択される位置を占め得る。

【0156】

同様に、配列番号：2における100個のアミノ酸から298個のアミノ酸のサイズの
 他の断片すべてによって占められる位置が、本発明に包含される。したがって、100個
 の連続するアミノ酸の断片は、配列番号：2の1～100、2～101、3～102、4
 ～103、5～104、6～105、7～106、8～107、9～108、10～10

9、11～110、12～111、13～112、14～113、15～114、16～115、17～116、18～117、19～118、20～119、21～120、22～121、23～122、24～123、25～124、26～125、27～126、28～127、29～128、30～129、31～130、32～131、33～132、34～133、35～134、36～135、37～136、38～137、39～138、40～139、41～140、42～141、43～142、44～143、45～144、46～145、47～146、48～147、49～148、50～149、51～150、52～151、53～152、54～153、55～154、56～155、57～156、58～157、59～158、60～159、61～160、62～161、63～162、64～163、65～164、66～165、67～166、68～167、69～168、70～169、71～170、72～171、73～172、74～173、75～174、76～175、77～176、78～177、79～178、80～179、81～180、82～181、83～182、84～183、85～184、86～185、87～186、88～187、89～188、90～189、91～190、92～191、93～192、94～193、95～194、96～195、97～196、98～197、99～198、100～199、101～200、102～201、103～202、104～203、105～204、106～205、107～206、108～207、109～208、110～209、111～210、112～211、113～212、114～213、115～214、116～215、117～216、118～217、119～218、120～219、121～220、122～221、123～222、124～223、125～224、126～225、127～226、128～227、129～228、130～229、131～230、132～231、133～232、134～233、135～234、136～235、137～236、138～237、139～238、140～239、141～240、142～241、143～242、144～243、145～244、146～245、147～246、148～247、149～248、150～249、151～250、152～251、153～252、154～253、155～254、156～255、157～256、158～257、159～258、160～259、161～260、162～261、163～262、164～263、165～264、166～265、167～266、168～267、169～268、170～269、171～270、172～271、173～272、174～273、175～274、176～275、177～276、178～277、179～278、180～279、181～280、182～281、183～282、184～283、185～284、186～285、187～286、188～287、189～288、190～289、191～290、192～291、193～292、194～293、195～294、196～295、197～296、198～297、199～298位からなる群から選択される位置を占め得る。

【0157】

さらに、配列番号：3における、6番目のアミノ酸～最後から2番目のアミノ酸の連続するアミノ酸の断片によって占められる位置、または12番目のアミノ酸～最後から2番目のアミノ酸の連続するアミノ酸の断片によって占められる位置、または50番目のアミノ酸～最後から2番目のアミノ酸の連続するアミノ酸の断片によって占められる位置、または100番目の～最後から2番目のアミノ酸の連続するアミノ酸の断片によって占められる位置もまた本発明に包含され、本明細書における実施例に基づいてすぐに考えることもでき、したがって、不必要に明細書を長くするためだけにそれぞれに列挙しない。

【0158】

代わりとして、本発明のGZIPポリペプチドは、式「n～c」（nおよびcを含む）によって示され；「n」は、ポリペプチドのN末端最高アミノ酸位置に等しく（配列表によって定義される）、「c」は、ポリペプチドのC末端最高アミノ酸位置に等しく（配列表によって定義される）、さらに「n」は、1から、本発明の完全長ポリペプチド配列の

10

20

30

40

50

アミノ酸数 - 6 の間の整数に等しく ; 「 c 」 は、 7 から、 完全長ポリペプチド配列のアミノ酸数の間の整数に等しく ; 「 n 」 は、 「 c 」 より少なくとも 6 小さい整数である。したがって、配列番号 : 2 において提供される配列の場合、 「 n 」 は、 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 11、 12、 13、 14、 15、 16、 17、 18、 19、 20、 21、 22、 23、 24、 25、 26、 27、 28、 29、 30、 31、 32、 33、 34、 35、 36、 37、 38、 39、 40、 41、 42、 43、 44、 45、 46、 47、 48、 49、 50、 51、 52、 53、 54、 55、 56、 57、 58、 59、 60、 61、 62、 63、 64、 65、 66、 67、 68、 69、 70、 71、 72、 73、 74、 75、 76、 77、 78、 79、 80、 81、 82、 83、 84、 85、 86、 87、 88、 89、 90、 91、 92、 93、 94、 95、 96、 97、 98、 99、 100、 101、 102、 103、 104、 105、 106、 107、 108、 109、 110、 111、 112、 113、 114、 115、 116、 117、 118、 119、 120、 121、 122、 123、 124、 125、 126、 127、 128、 129、 130、 131、 132、 133、 134、 135、 136、 137、 138、 139、 140、 141、 142、 143、 144、 145、 146、 147、 148、 149、 150、 151、 152、 153、 154、 155、 156、 157、 158、 159、 160、 161、 162、 163、 164、 165、 166、 167、 168、 169、 170、 171、 172、 173、 174、 175、 176、 177、 178、 179、 180、 181、 182、 183、 184、 185、 186、 187、 188、 189、 190、 191、 192、 193、 194、 195、 196、 197、 198、 199、 200、 201、 202、 203、 204、 205、 206、 207、 208、 209、 210、 211、 212、 213、 214、 215、 216、 217、 218、 219、 220、 221、 222、 223、 224、 225、 226、 227、 228、 229、 230、 231、 232、 2

10

20

30

40

50

3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、2 3 8、2 3 9、2 4 0、2 4 1、2 4 2、2 4 3、2 4 4、2 4 5、2 4 6、2 4 7、2 4 8、2 4 9、2 5 0、2 5 1、2 5 2、2 5 3、2 5 4、2 5 5、2 5 6、2 5 7、2 5 8、2 5 9、2 6 0、2 6 1、2 6 2、2 6 3、2 6 4、2 6 5、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 0、2 7 1、2 7 2、2 7 3、2 7 4、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0、2 9 1、2 9 2、2 9 3、2 9 4、2 9 5、2 9 6、2 9 7または2 9 8からなる群から選択される任意の整数である。「n」および「c」位置のあらゆる組み合わせが、本発明の特定の実施形態として包含される。さらに、式「n」～「c」は、「n 1～n 2」～「c 1～c 2」と変更することが可能であり、「n 1～n 2」および「c 1～c 2」は、配列表のアミノ酸位置を表す上記の任意の2つの整数から選択される位置範囲を表す。代替の式は、「n 1～n 2」～「c」および「n」～「c 1～c 2」を含む。好ましい実施形態において、GZIPの 1 および 2 ドメインを含むポリペプチド断片は、上記の式（配列番号：2において、n 1 = 2 1、n 2 = 3 3、および c 1 = 1 8 2、c 2 = 2 0 4）によって；または上記の式（配列番号：3において、n 1 = 1 8、n 2 = 3 0、および c 1 = 1 7 9、c 2 = 2 0 1）によって示すことができる。

10

【0159】

他の好ましい実施形態において、本発明のGZIPポリペプチド断片の 3 ドメインは、上記の式（配列番号：2において、n 1 = 2 0 5、n 2 = 2 2 0、および c 1 = 2 4 3、c 2 = 2 9 8）によって；または上記の式（配列番号：3において、n 1 = 2 0 2、n 2 = 2 1 7、および c 1 = 2 4 0、c 2 = 2 9 5）によって示すことができる。

20

【0160】

好ましい実施形態において、予想外の活性を有するGZIPポリペプチド断片は、配列番号：2の101～272、121～298、59～242、221～298、145～298、221～242、21～298、21～202、21～208、203～298、209～298、180～251、192～251、204～251、221～251、21～246、21～250位のアミノ酸から選択される。

【0161】

他の好ましい実施形態では、予想外の活性を有するGZIPポリペプチド断片は、配列番号：3の98～269、118～295、56～239、218～295、142～295、218～239、18～295、18～199、18～205、200～295、206～295、177～248、189～248、201～248、218～248、18～243、18～247位のアミノ酸から選択される。

30

【0162】

これらの特定の実施形態、および本明細書に記載の他のポリペプチドおよびポリヌクレオチド断片は、「少なくとも」、「等しい」、「以下」、「未満」、「少なくとも__であるが、__以下」または「__から（～）__」の指定のサイズまたは指定のN末端もしくはC末端位置であるように修正される。本発明のいずれかの実施形態を説明するために使用されるすべての範囲は、別段の指定がない限り包含的であることに留意する。

【0163】

本発明は、上述のように、アミノ酸残基のN末端およびC末端位置によって指定される個々の任意の断片、またはアミノ酸残基のサイズによって指定される任意の断片の除外もまた提供される。さらに、上述のように、アミノ酸残基のN末端およびC末端位置によって、またはアミノ酸残基のサイズによって指定される任意の数の断片を個々の種として除外することが可能である。さらに、上述のように、アミノ酸残基のN末端およびC末端位置によって、またはアミノ酸残基のサイズによって指定される任意の数の断片は、任意の組み合わせでポリペプチド断片を構成することが可能であり、任意に、非GZIPポリペプチド配列も含み得る。

40

【0164】

好ましい実施形態において、予想外の活性を有するGZIPポリペプチド断片は、配列

50

番号：2の101～272、121～298、59～242、221～298、145～298、221～242、21～298、21～202、21～208、203～298、209～298、180～251、192～251、204～251、221～251、21～246、21～250位のアミノ酸から選択される。他の好ましい実施形態において、予想外の活性を有するGZIPポリペプチド断片は、配列番号：3の98～269、118～295、56～239、218～295、142～295、218～239、18～295、18～199、18～205、200～295、206～295、177～248、189～248、201～248、218～248、18～243、18～247位のアミノ酸から選択される。さらに好ましい実施形態において、GZIPポリペプチド断片は、配列番号：2の101～272、121～298、59～242、221～298、145～298、221～242、21～298、21～202、21～208、203～298、209～298、21～246、21～250位のアミノ酸から選択される。他の好ましい実施形態では、予想外の活性を有するGZIPポリペプチド断片は、配列番号：3の98～269、118～295、56～239、218～295、142～295、218～239、18～295、18～199、18～205、200～295、206～295、18～243、18～247位のアミノ酸から選択される。

10

【0165】

好ましい実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチド断片のN末端にシグナルペプチドを付加する方法であって、前記シグナルペプチドが前記ポリペプチドの分泌を促進する働きをする方法の特徴とする。前記シグナルペプチドは、配列番号：2の1～20位のアミノ酸(MV R M V P V L L S L L L L G P A V P)または配列番号：3の1～17位のアミノ酸(M V P V L L S L L L L L G P A V P)から選択されることが好ましい。

20

【0166】

本発明のGZIPポリペプチド、およびその断片には、変異体、断片、上述のGZIPポリペプチド断片の類似体および誘導体、例えば修飾GZIPポリペプチド断片などが含まれる。

変異体(variant)

タンパク質の構造または機能に著しく影響を及ぼすことなく、本発明のGZIPポリペプチド配列の一部のアミノ酸を変えることができ；活性を決定する配列中の重要なアミノ酸が存在することは、当業者であれば理解されよう。したがって、本発明はさらに、上述の代謝関連活性を有するGZIPポリペプチドの変異体を包含する。かかる変異体は、自然突然変異による、あるいは活性にほとんど影響を及ぼさないように、当技術分野で公知の一般的な規則に従って選択されるヒトの操作による、1つまたは複数のアミノ酸欠失、挿入、転化、反復、および置換を有するGZIPポリペプチド配列を含む。表現型的にサイレントなアミノ酸置換を行う方法に関する指標は以下に示す。

30

【0167】

変化に対するアミノ酸配列の耐性を研究するための主な2つのアプローチがある(Bowie, et al. (1990) Science, 247,1306-10参照)。第1の方法は、突然変異が受け入れられるか、または自然淘汰によって排除される、進化の過程に基づく。第2のアプローチでは、機能を保持する配列を同定するために、クローン化遺伝子の特定の位置でアミノ酸変化を導入する遺伝子操作、および選択またはスクリーニングが用いられる。

40

【0168】

これらの研究から、タンパク質はアミノ酸の置換に対して驚くほど耐性であることが明らかとなっており、そのタンパク質の特定位置でどのアミノ酸変化が許容性であるらしいかが示されている。例えば、大部分の埋もれているアミノ酸残基が非極性側鎖を必要とするのに対して、一般的に表面側鎖の特徴はほとんど保存されない。他のかかる表現型的にサイレントな置換は、Bowie et al. (上記)によって記述されており、参考文献がそれに記載されている。

【0169】

50

本発明によるポリペプチドのアミノ酸配列におけるアミノ酸置換の場合には、1つまたは複数のアミノ酸を「同等な」アミノ酸によって置き換えることができる。「同等な」アミノ酸という表現は、ペプチド化学の当業者であれば、ポリペプチドの二次構造およびヒドロパシーの性質が実質的に変化しないことは予想されるように、同様な特性を有するアミノ酸のうちの1つと置き換えられるいずれかのアミノ酸を示す。

【0170】

特定の実施形態において、好ましい置換という表題のもとに、対象の保存的置換を表1に示す。かかる置換によって生物活性の変化が生じた場合、次いで、表4における例示的置換と呼ばれる、またはアミノ酸の分類を参照して以下でさらに述べられる、さらに実質的な変化が導入され、その産物がスクリーニングされる。

【0171】

【表1】

| 元の残基 | 例示的置換 | 好ましい置換 |
|---------|----------------------------------|--------|
| Ala (A) | val; leu; ile | val |
| Arg (R) | lys; gin ; asn | lys |
| Asn (N) | gin; his; lys; arg | gin |
| Asp (D) | glu | glu |
| Cys (C) | ser | ser |
| Gin (Q) | asn | asn |
| Glu (E) | asp | asp |
| Gly (G) | pro; ala | ala |
| His (H) | asn; gin; lys; arg | arg |
| Ile (I) | leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン | leu |
| Leu (L) | ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe | ile |
| Lys (K) | arg ; gin; asn | arg |
| Met (M) | leu ; phe; ile | leu |
| Phe (F) | leu; val; ile; ala; tyr | leu |
| Pro (P) | ala | ala |
| Ser (S) | thr | thr |
| Thr (T) | ser | ser |
| Trp (W) | tyr; phe | tyr |
| Tyr (Y) | trp; phe; thr; ser | phe |
| Val (V) | ile; leu; met ; phe; ala; ノルロイシン | leu |

GZIPポリペプチドの機能または免疫学的同一性の実質的な修飾は、(a)例えば、シートまたはヘリックス構造としての、置換領域におけるポリペプチド主鎖の構造、(b)標的部位における分子の電荷または疎水性、または(c)側鎖のバルク;の保持に対するそれらの効果が有意に異なる置換を選択することによって達成される。天然の残基は、一般的な側鎖の特性:

- (1) 疎水性: ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile;
- (2) 中性親水性: cys、ser、thr;
- (3) 酸性: asp、glu;
- (4) 塩基性: asn、gln、his、lys、arg;

(5) 鎖の配向に影響を及ぼす残基: g l y、p r o ;

(6) 芳香族: t r p、t y r、p h e

に基づく基に分けられる。

【0172】

非保存的置換には、これらの分類のうちの1つのメンバーを他の分類に交換する必要があるだろう。置換されたかか残基は、保存的置換部位に、またはさらに好ましくは残りの(非保存)部位に導入することもできる。

【0173】

オリゴヌクレオチド仲介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャン、およびPCR突然変異誘発などの当技術分野で公知の方法を用いて、変異を生じさせることができる。部位特異的突然変異誘発[Carter et al., Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発[Wells et al., Gene, 34: 315 (1985)]、制限選択(restriction selection)突然変異誘発[Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London 血清, 317: 415 (1986)]または他の公知の技術をクローン化DNAに実施して、GZIP変異DNAを作製することができる。

【0174】

スキャンによるアミノ酸解析を用いて、隣接する配列に沿って1つまたは複数のアミノ酸を同定することもできる。好ましいスキャン用アミノ酸としては、比較的小さな、中性アミノ酸が挙げられる。かかるアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリン、およびシステインが挙げられる。このグループの中では、炭素を超える側鎖を除去し、かつ変異体の主鎖構造を変える可能性が低いため、アラニンが一般に好ましいスキャン用アミノ酸である[Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。アラニンは最も一般的なアミノ酸であることから、一般に好ましい。さらに、それは包埋および露出部分の両方でしばしば見出される[Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.) ; Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニンの置換によって、適切な量の変異が得られない場合、イソスター(isoteric)のアミノ酸を用いることができる。

【0175】

機能に必須である、本発明のGZIPポリペプチド配列におけるアミノ酸もまた、部位特異的突然変異誘発またはアラニンスキャンによる突然変異誘発などの当技術分野で公知の方法によって同定することができる(例えば、Cunningham, et al. (1989) Science 244 (4908): 1081-5)。後者の手順によって、分子中のあらゆる残基で単一アラニン突然変異が誘導される。次いで、上述のアッセイを用いて、得られた突然変異分子を代謝関連活性について試験する。凝集が少ないなどの、非常に望ましい改善された特性を有するタンパク質を生成することが可能な、他の荷電もしくは中性アミノ酸での荷電アミノ酸の置換は特に興味深い。凝集塊は免疫原性であり得ることから、薬学的または生理学的に許容される製剤を調製する場合、凝集は活性を低減するだけでなく、問題もある(Pinckard, et al., (1967) Clin. Exp. Immunol 2: 331-340; Robbins, et al., (1987) Diabetes Ju1; 36 (7): 838-41; and Cleland, et al., (1993) Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 10 (4): 307-77)。

【0176】

このように、本発明のGZIPポリペプチドの断片、誘導体、類似体またはホモログとしては、例えば:(i)そのアミノ酸残基の1つまたは複数が保存もしくは非保存アミノ酸残基(好ましくは、保存アミノ酸残基)で置換されるものであり、かかる置換アミノ酸残基が遺伝暗号によってコードされるものである、またはそうではない(つまり、非天然アミノ酸である);または(ii)そのアミノ酸残基の1つまたは複数が置換基を含むもの;または(iii)GZIPポリペプチドが、その断片の半減期を増加させる化合物などの他の化合物(例えば、ポリエチレングリコール)と融合されるもの;または(iv)その他のアミノ酸が、断片の上記の形、例えばIgG Fc融合領域ペプチドまたはリーダー配列もしくは分泌配列、または断片の上記の形の精製に用いられる配列、またはプロタンパク質配列に融合されるもの;などが挙げられる。かかる断片、誘導体および類似体

は、本明細書における教示から、当業者の範囲内であると考えられる。

【0177】

本発明のさらなる実施形態は、50個以下の保存的アミノ酸置換、40個以下の保存的アミノ酸、30個以下の保存的アミノ酸、および20個以下の保存的アミノ酸置換であるが、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を含有するアミノ酸配列を有する、GZIPポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドに関する。10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個以下の保存的アミノ酸置換であるが、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、GZIP断片のアミノ酸配列を含むポリペプチドもまた提供する。

【0178】

さらに、アミノ酸は、L体またはD体いずれかのうちのキラリティーを有する。一部の
10 実施形態において、キラル体内で半減期を延ばすために、本発明のGZIPポリペプチド断片におけるアミノ酸のキラリティーを変化させることが好ましい。このように、一部の実施形態では、アミノ酸の1つまたは複数が、L立体配置にあることが好ましい。他の実施形態では、アミノ酸の1つまたは複数が、D立体配置にあることが好ましい。

同一性割合

本発明のポリペプチドには、上述のGZIPポリペプチドと、少なくとも50%同一の、
少なくとも60%同一の、または70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドも含まれる。GZIPポリペプチドと、少なくとも、例えば95%「同一の」アミノ酸配列を有するポリペプチドとは、そのアミノ酸配列が、GZIPポリペ
20 チドアミノ酸配列のアミノ酸100個それぞれにつき、5個までのアミノ酸の変化を含み得ることを除いては、GZIPポリペプチド配列と同一であることを意味する。参照配列は、配列番号：2または3に提供される配列に相当する配列を有するGZIPポリペプチドである。このように、GZIPポリペプチドアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、配列中のアミノ酸残基の5%まで(100個のうち5個)が、GZIPポリペプチド配列と比較して、挿入、欠失、または別のアミノ酸で置換される。これらの変化は、アミノ末端もしくはカルボキシ末端で、またはそれらの末端位置間で生じ、配列中の残基の間に個々に、または配列内の1つまたは複数の隣接基に散在し得る。

【0179】

実際問題として、特定のいずれかのポリペプチドが、GZIPポリペプチドと何パーセント同一であるかを、公知のコンピューター・プログラムを用いて従来の方法で決定することができる。かかるアルゴリズムおよびプログラムとしては、決して限定されないが、TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTA、およびCLUSTALWが挙げられる(Pearson and Lipman, (1988) Proc Natl Acad Sci USA Apr; 85 (8): 2444-8; Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215 (3): 403-410; Thompson et al., (1994) Nucleic Acids Res. 22 (2): 4673- 4680; Higgins et al., (1996) Meth. Enzymol. 266: 383-402; Altschul et al., (1997) Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402; Altschul et al., (1993) Nature Genetics 3: 266-272)。特に好ましい実施形態において、タン
40 パク質および核酸配列の相同性は、当技術分野でよく知られているベーシック・ローカル・アライメント検索ツール(「BLAST」)を用いて評価される(Karlin and Altschul (1990) Proc Natl Acad Sci USA Mar; 87 (6): 2264-8; Altschul et al., 1990, 1993, 1997 (すべて上記の)を参照のこと)。特定の5つのBLASTプログラムを使用して、特に以下のタスクが実行される：

(1) BLASTPおよびBLAST3により、アミノ酸問い合わせ配列をタンパク質配列データベースと比較する；

(2) BLASTNにより、ヌクレオチド問い合わせ配列をヌクレオチド配列データベースと比較する；

(3) BLASTXにより、問い合わせヌクレオチド配列(両方の鎖)の6つの枠の概念上の翻訳産物をタンパク質配列データベースと比較する；

10

20

30

40

50

(4) TBLASTNにより、問い合わせタンパク質配列を、6つすべての読み枠で翻訳されたヌクレオチド配列(両方の鎖)データベースと比較する;

(5) TBLASTXにより、ヌクレオチド問い合わせ配列の6つの枠の翻訳を、ヌクレオチド配列データベースの6つの枠の翻訳と比較する。

【0180】

BLASTプログラムは、問い合わせアミノ酸もしくは核酸配列と、タンパク質もしくは核酸配列データベースから得られることが好ましい試験配列との間の、本明細書において「高スコアのセグメント対」と呼ばれる類似セグメントを同定することによって相同配列を同定する。その多くが当技術分野で公知であるスコアリングマトリックスを用いることによって、高スコアのセグメント対を同定(つまり、アライメント)することが好ましい。使用するスコアマトリックスは、BLOSUM62マトリックス(Gonnet et al., (1992), Science 256: 1443-1445; Henikoff and Henikoff, (1993), Proteins 17: 49-61)であることが好ましい。好ましさは低い、PAMまたはPAM250マトリックスも使用することができる(例えば、Schwartz and Dayhoff, (1978), eds., Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National 生物医学的 Research Foundation参照)。BLASTプログラムは、同定された高スコアのすべてのセグメント対の統計的有意性を評価し、好ましくはユーザーによって指定された相同性割合など、ユーザーによって指定された有意性の閾値を満たすそれらのセグメントを選択する。高スコアのセグメント対の統計的有意性は、カーリンの統計的有意性の式(例えば、Karlin and Altschul, (1990) Proc Natl Acad Sci USA Mar; 87 (6): 2264-8参照)を用いて評価することが好ましい。BLASTプログラムは、ユーザーによって提供されるデフォルトパラメーターを用いて、または変更されたパラメーターを用いて使用することが可能である。パラメーターはデフォルトパラメーターであることが好ましい。

【0181】

大域的配列アライメントとも呼ばれる、ヌクレオチドもしくはアミノ酸配列(本発明の配列)と対象の配列との最高の全体的マッチを決定する他の好ましい方法は、Brutlag et al. (1990) Comp. App. Biosci. 6: 237-245のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュター・プログラムを用いて決定することができる。配列アライメントにおいて、問い合わせ配列および対象配列はどちらもDNAまたはアミノ酸配列である。前記大域的配列アライメントの結果は、同一性割合で示される。FASTDBアミノ酸のアライメントに使用される好ましいパラメーターは: マトリックス = PAM 0、k-タプル = 2、ミスマッチペナルティ = 1、結合ペナルティ (Joining Penalty) = 20、無作為化群 = 25、長さ = 0、カットオフ・スコア = 1、ウィンドウサイズ = 配列長さ、ギャップペナルティ = 5、ギャップサイズペナルティ = 0.05、ウィンドウサイズ = 247、または対象ヌクレオチド配列の長さ(いずれか短いほう)。

【0182】

内部の欠失のためではなく、N末端もしくはC末端欠失のために、対象配列が問い合わせ配列よりも短い場合には、手作業でその結果に補正を加えなければならない。というのは、FASTDBプログラムは、同一性割合を計算する場合に対象配列のN末端もしくはC末端切断を計算に入れていないからである。N末端もしくはC末端で切断された対象配列では、問い合わせ配列に対して、同一性割合は、問い合わせ配列の全塩基のパーセントとして、相当する対象の残基とマッチ/アラインされない、対象配列のN末端およびC末端である問い合わせ配列の残基数を計算することによって補正される。残基がマッチ/アラインされているかどうかは、FASTDB配列アライメントの結果によって決定される。次いで、指定のパラメーターを用いて、上記のFASTDBプログラムにより計算された同一性パーセントからこのパーセンテージを減算し、最終的な同一性スコア割合が得られる。この最終の同一性スコア%は、本発明の目的のために使用されるものである。問い合わせ配列とマッチ/アラインされない、対象配列のN末端およびC末端に対する残基のみが、同一性割合スコアを手作業で調整する目的のために考慮される。つまり、対象配列

の最も遠いN末端およびC末端残基外の問い合わせアミノ酸残基のみである。

【0183】

例えば、90アミノ酸残基の対象配列を100残基の問い合わせ配列とアライメントし、同一性割合を決定する。欠失は、対象配列のN末端で生じ、したがって、FASTDBアライメントは、N末端の最初の残基とマッチ/アラインしない。10個の不对残基は、配列の10%（マッチしていないN末端およびC末端の残基数/問い合わせ配列における残基の総数）であり、そのため、FASTDBプログラムによって計算される同一性スコア割合から10%が減算される。残りの90残基が完全にマッチする場合、最終同一性割合は90%であるだろう。

【0184】

他の実施例において、90残基の対象配列が100残基の問い合わせ配列と比較される。この時、欠失が内部であり、そのため、問い合わせ配列とマッチ/アラインしない対象配列のN末端もしくはC末端の残基はない。この場合、FASTDBによって計算された同一性割合は手作業で補正されない。再度、問い合わせ配列とマッチ/アラインしない、FASTDBアライメントに示される対象配列のN末端およびC末端外の残基位置のみが、手作業で補正される。本発明の目的のために、手作業での他の補正は加えられない。

産生

開示内容全体にわたり、GZIPポリペプチドがどこに記述されていようとも、GZIP断片、変異体および誘導体が、GZIPポリペプチドの好ましいサブセットとして包含されることが特に意図されることに留意されたい。

【0185】

GZIPポリペプチドは、ヒトもしくは哺乳動物組織から単離されるか、またはヒトまたは哺乳動物細胞においてヒトまたは哺乳動物遺伝子から発現されることが好ましい。本発明のGZIPポリペプチドは、当技術分野で公知の通常の発現方法を用いて作製することができる。目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、簡便ないずれかの宿主に適した発現ベクターに連結される。真核生物および原核生物の宿主系のどちらも、組換えポリペプチドの形成に使用される。次いで、そのポリペプチドを溶解細胞または培地から単離し、その目的の用途に必要とされる程度まで精製する。いずれかの本発明のポリヌクレオチドを使用して、GENSETポリペプチドを発現させることができる。次いで、そのポリペプチドを溶解細胞または培地から単離し、その目的の用途に必要とされる程度まで精製する。当技術分野で公知のいずれかの技術、例えば、差次的抽出、塩分画、クロマトグラフィー、遠心分離等による精製である。例えば、タンパク質を精製するための様々な方法についてのMethods in Enzymology（酵素学における方法）を参照のこと。

【0186】

代替の実施形態において、本発明のポリペプチドは乳から単離される。本発明のポリペプチドは、完全長GZIPポリペプチドとして精製することが可能であり、次いでしかるべき場合にインビトロで切断して、GZIP断片を作製することが可能であり、または代替方法として、GZIP断片自体を乳から精製することができる。その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる：Protein Purification Applications, A Practical Approach (New Edition), Edited by Simon Roe, AEA Technology Products and Systems, Biosciences, Harwell; Clark (1998) J Mammary Gland Biol Neoplasia 3: 337-50; Wilkins and Velandar (1992) 49: 333-8; 米国特許第6,140,552号; 同第6,025,540号; Hennighausen, Protein Expression and Purification, vol. 1, pp. 3-8 (1990); Harris et al. (1997) Bioseparation 7: 31-7; Degener et al. (1998) J. Chromatog. 799: 125-37; Wilkins (1993) J. Cell. Biochem. Suppl. 0 (17 part A):に教示されている方法を含む、多数の方法のいずれかを用いて、本発明のポリペプチドを乳から精製することができる。通常の実施形態において、例えば比較的低い速度で乳を遠心分離して、脂質画分を分離し、次いで水性上清を高速で遠心分離して、乳中のカゼインを残りの「乳清」画分から分離する。この乳清画分中に生物医学的タンパク質が見出されることが多く、例えば本出願の他で記述されているように、タンパク質精製に一般に使用さ

10

20

30

40

50

れる標準クロマトグラフィーまたは他の手順を用いて、そのタンパク質をこの画分から単離することができる。

【0187】

好ましい一実施形態において、GZIPポリペプチドは、例えばアフィニティークロマトグラフィーを用いて、GZIPポリペプチドに特異的な抗体を使用して精製される。さらに、例えば、特定サイズのタンパク質を単離する電気泳動法または他の方法を用いて、特定のGZIP断片を単離することができる。これらの方法を用いて単離されるGZIPポリペプチドは、GZIPポリペプチドは哺乳類の乳に天然に存在することが発見されていることから天然であるか、あるいは、以下に記述するように非ヒト哺乳動物の乳腺中のタンパク質の組換えによる産生の結果であり得る。かかる一実施形態において、GZIPは、異種の抗原ポリペプチド配列との融合タンパク質として産生される。その抗原配列は、例えば標準のイムノアフィニティー方法論を用いて、タンパク質を精製するために用いることができる。

10

【0188】

さらに、短いタンパク質断片を化学合成によって作製することが可能である。代替方法としては、本発明のタンパク質は、ヒトまたは非ヒト動物の細胞または組織から抽出される。タンパク質を精製する方法は当技術分野で公知であり、洗浄剤またはカオトロピック剤を使用して粒子を乱し、続いてポリペプチドの差次的抽出(differential extraction)およびイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーによる分離を行い、密度によって沈降させ、ゲル電気泳動を行うことを含む。

20

【0189】

配列番号：2または3におけるcDNAを含む、いずれかのGZIP cDNAを使用して、GZIPポリペプチドを発現させることができる。発現されるGZIPをコードする核酸は、従来のクローニング技術を用いて、発現ベクターにおいてプロモーターに作動可能に連結される。発現ベクター中のGZIP cDNAインサートは：完全長GZIPポリペプチド(後に修飾される)；6個のアミノ酸から、完全長GZIPポリペプチドよりも6アミノ酸短い、任意の整数個のアミノ酸；GZIP断片；または変異体および類似性(%)のポリペプチド；のコード配列を含み得る。

【0190】

発現ベクターは、当技術分野で公知の哺乳動物、酵母、昆虫または細菌の発現系のいずれかであり、そのいくつかは本明細書に記述されている。市販のベクターおよび発現系は、Genetics Institute社(マサチューセッツ州ケンブリッジ)、Stratagene社(カリフォルニア州ラ・ホーヤ)、Promega社(ウィスコンシン州マディソン)、およびInvivoGen社(カリフォルニア州サンディエゴ)などの様々な供給業者から入手可能である。所望の場合には、発現を高め、かつ適切なタンパク質の折り畳みを促進するために、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Hatfieldらの米国特許第5,082,767号によって説明されているように、発現ベクターが導入される特定の発現生物に対して、配列のコドンのコンテキストおよびコドン対形成(codon pairing)を最適化することができる。

30

【0191】

GZIPポリペプチドのいずれか1つをコードする核酸が開始部位として働くメチオニンを欠く場合、従来の技術を用いて、核酸の最初のコドンの次に、開始メチオニンを導入することができる。同様に、GZIPポリペプチドcDNAからのインサートがポリAシグナルを欠く場合には、例えば、Bg1IおよびSalI制限エンドヌクレアーゼ酵素を使用して、pSG5(Stratagene社)からポリAシグナルをスプライシングし、哺乳動物発現ベクターpXT1(Stratagene社)に組み込むことによって、この配列をコンストラクトに付加することができる。pXT1は、LTRおよびモロニー Maus白血病毒由来のgag遺伝子の一部を含有する。コンストラクトにおけるLTRの位置によって、効率的な、安定なトランスフェクションが可能となる。そのベクターとしては、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーターおよび選択可能なネオ

40

50

マイシン遺伝子が挙げられる。

【0192】

GZIPをコードする配列がポリAシグナルに対して適切に位置付けられるように注意して、目的のGZIP cDNAに相補的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いたGZIPヌクレオチド配列を含有し、かつ5'プライマーに組み込まれるPstIおよび相当するcDNA 3'プライマーの5'末端のBglIIの制限エンドヌクレアーゼ配列を含有するベクターから、PCRによって、GZIPをコードする核酸が得られる。PCR反応から得られる精製ポリヌクレオチドは、PstIで消化され、エキソヌクレアーゼで平滑末端化され、BglIIで消化され、精製され、pXT1に連結され、ここでポリAシグナルを含有し、BglIIで消化される。

10

【0193】

マウスNIH 3T3細胞へのGZIP発現ベクターのトランスフェクションは、宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入の一実施形態である。ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの宿主細胞への導入は、リン酸カルシウムによるトランスフェクション、DEAE-デキストラン仲介トランスフェクション、カチオン性脂質仲介トランスフェクション、電気穿孔法、形質導入、感染、または他の方法によって行うことができる。かかる方法は、Davisら((1986) Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc., Amsterdam)などの多くの標準的実験マニュアルに記述されている。本発明のポリペプチドを実際に、組換えベクターを欠く宿主細胞によって発現させることが具体的に企図される。

20

【0194】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムもしくはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーなどのよく知られている方法によって組換え細胞培養物から回収かつ精製することができる。高性能液体クロマトグラフィー(「HPLC」)が精製に用いられることが最も好ましい。本発明のポリペプチド、好ましくは、分泌型は：直接単離されていようと、または培養されていようと、天然源から精製された産物、例えば体液、組織および細胞；化学合成手順の産物；および原核生物または真核生物宿主、例えば細菌、酵母、高等植物、昆虫、および哺乳動物細胞などから、組み換え技術によって産生された産物；から回収することもできる。

30

【0195】

組換えによる作製手順に用いられる宿主に応じて、本発明のポリペプチドはグリコシル化されてもよいし、グリコシル化されなくてもよい。本発明のポリペプチドは非グリコシル化ポリペプチドであることが好ましい。さらに、本発明のポリペプチドは、場合によっては、宿主仲介プロセスの結果として、修飾メチオニン残基も含み得る。このように、翻訳開始コドンによってコードされるN末端メチオニンは一般に、すべての真核細胞における翻訳後に、いずれかのタンパク質から高効率で除去されることは当技術分野でよく知られている。大部分のタンパク質上のN末端メチオニンもまた、大部分の原核生物において効率的に除去されるが、一部のタンパク質に関しては、原核生物のこの除去プロセスは、N末端メチオニンが共有結合されるアミノ酸の性質に応じて不十分である。

40

【0196】

本明細書に記述されるベクターコンストラクトを含有する宿主細胞の包含に加えて、内因性遺伝物質(例えば、コード配列)を欠失または置換するために、または本発明のポリヌクレオチドと作動可能に結び付けられ、かつ内因性ポリヌクレオチドを活性化、変更および/または増幅する遺伝物質(例えば、異種ポリヌクレオチド配列)を含ませるために操作された、脊椎動物起源、特に哺乳動物起源の一次、二次、および不死化宿主細胞も包含する。例えば、当技術分野で公知の技術を用いて、異種制御領域(例えば、プロモーターまたはエンハンサー)および内因性ポリヌクレオチド配列を相同的組換えにより作動可能に結び付けることが可能である。例えば、それらの開示内容全体が参照により本明細書

50

に組み込まれる、1997年6月14日発行の米国特許第5,641,670号;1996年9月26日公開の国際公開番号:WO96/29411;1994年8月4日公開の国際公開番号:WO94/12650;Koller et al., (1989) Proc Natl Acad Sci USA Nov; 86 (22): 8932-5; Koller et al., (1989) Proc Natl Acad Sci USA Nov; 86 (22): 8927-31; and Zijlstra et al. (1989) Nature Nov 23; 342 (6248): 435-8; 参照のこと。

修飾

さらに、本発明のポリペプチドは、当技術分野で公知の技術を用いて化学的に合成することができる(例えば、Creighton, 1983 Proteins. New York, New York: W. H. Freeman and Company; and Hunkapiller et al., (1984) Nature Jul 12-18; 310 (5973): 105-11 参照)。例えば、本発明の比較的短い断片は、ペプチド合成装置を使用して合成することができる。さらに、所望の場合には、非古典的アミノ酸または化学アミノ酸類自体を、断片配列中に置換または付加で導入することができる。非古典的アミノ酸には、限定されないが、一般的アミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、α-アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、g-Abu、e-Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、b-アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナー・アミノ酸、例えばb-メチルアミノ酸、Ca-メチルアミノ酸、Na-メチルアミノ酸、およびアミノ酸類似体全体が含まれる。さらに、そのアミノ酸はD(右旋性)またはL(左旋性)であることが可能である。

【0197】

本発明は、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク分解切断、抗体分子または他の細胞リガンドへの結合等により、翻訳中または翻訳後に差次的に修飾されるポリペプチドを包含する。数多くの化学修飾のいずれも、公知の技術、限定されないが例えば、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、NaBH4による特異的な化学的切断;アセチル化、ホルミル化、酸化、還元;ツニカマイシンの存在下での代謝合成;などによって行うことができる。

【0198】

本発明により包含されるその他の翻訳後修飾には、例えば、N-結合型またはO-結合型糖鎖、N-末端またはC-末端の処理、アミノ酸主鎖への化学部位の結合、N-結合型またはO-結合型糖鎖の化学修飾、および原核生物宿主細胞の発現の結果としてのN-末端メチオニン残基の付加または欠失が含まれる。ポリペプチドを検出かつ単離できるように、ポリペプチドを検出可能な標識、例えば酵素標識、蛍光標識、同位体標識または親和性標識で修飾することもできる。

【0199】

さらなる利点、例えばポリペプチドの増大した溶解性、安定性および循環時間、または減少した免疫原性を提供する、本発明のポリペプチドの化学修飾された誘導体も本発明によって提供される。米国特許第4,179,337号を参照のこと。誘導体化のための化学部位は、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなどの水溶性ポリマーから選択することができる。ポリペプチドは、分子内のランダムな位置で、または分子内の所定の位置で修飾され、1つ、2つ、3つ以上の結合化学部位を含む。

【0200】

そのポリマーは、任意の分子量であり、分枝鎖または枝なし鎖である。ポリエチレングリコールの場合には、取り扱いおよび製造を容易にするために、好ましい分子量は約1 kDa~約100 kDaである(「約」という言葉は、ポリエチレングリコールの製造において、一部の分子が、記載の分子量よりもいくらか多い、少ない重さであるだろうことを

示している)。目的の治療プロファイル(例えば、所望の徐放期間、たとえあったとして生物活性に対する効果、取り扱いの容易さ、抗原性の程度または欠如、および治療用タンパク質もしくは類似体に対するポリエチレングリコールの他の公知の効果)に応じて、他のサイズを用いることもできる。

【0201】

ポリペプチドの機能ドメインまたは抗原性ドメインに対する効果を考慮して、ポリエチレングリコール分子(または他の化学部位)をポリペプチドに結合させるべきである。当業者には利用可能な多くの結合法が存在する。例えば、参照により本明細書に組み込まれるEP 0 401 384(PEGとG-C-S-Fとの共役)、Malik et al. (1992) Exp Hematol. Sep; 20 (8): 1028-35(塩化トレシル(Tresyl Chloride)を用いたGM-C-S-Fのペグ化を報告している)も参照のこと。例えばポリエチレングリコールは、遊離アミノ基またはカルボキシル基などの反応性基を介してアミノ酸残基により二重結合される。反応性基は、活性化ポリエチレングリコール分子がそれに結合することができる基である。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基には、リジン残基およびN末端アミノ酸残基が含まれ; 遊離カルボキシル基を有するアミノ酸残基には、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基およびC末端アミノ酸残基が含まれる。ポリエチレングリコール分子を結合させるために、反応性基として、スルフヒドリル基も用いることができる。治療の目的に好ましいのは、アミノ基での結合、例えばN末端もしくはリジン基での結合である。

【0202】

N末端で化学修飾されたタンパク質が特に望ましい。本発明の組成物の例証としてポリエチレングリコールを用いて、様々なポリエチレングリコール分子から(分子量、分岐等によって)、反応混合物におけるポリエチレングリコール分子とタンパク質(ポリペプチド)分子の割合、行われるペグ化反応の種類、および選択されたN末端ペグ化(N-terminally pegylated)タンパク質を得る方法を選択することが可能である。N末端ペグ化調製物を得る方法(必要であれば、他のモノペグ化部位からこの部位を分離する)は、ペグ化タンパク質分子の集団から、N末端ペグ化物質を精製することによる方法であり得る。N末端で化学修飾された選択的タンパク質は、特定のタンパク質における誘導体化に利用することが可能な、異なる種類の一級アミノ基(N末端に対してリジン)の差次的反応性を利用する、還元アルキル化によって達成される。適切な反応条件下にて、カルボニル基含有ポリマーを用いた、N末端でのタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。

多量体

本発明のポリペプチドは、単量体または多量体(つまり、二量体、三量体、四量体以上の)形であることが可能である。したがって、本発明は、本発明のポリペプチドの単量体または多量体、それらの製造、およびそれらを含む組成物(好ましくは、薬学的または生理学的に許容される組成物)に関する。特定の実施形態において、本発明のポリペプチドは、単量体、二量体、三量体または四量体である。その他の実施形態において、本発明の多量体は、少なくとも二量体、少なくとも三量体、または少なくとも四量体である。

【0203】

本発明によって包含される多量体は、ホモマーまたはヘテロマーであることが可能である。本明細書で使用される「ホモマー」という用語は、本発明のGZIPポリペプチドに対応するポリペプチドのみ(ポリペプチド断片、変異体、スプライスバリエーション、および本明細書に記載されるこれらのポリペプチド断片に対応する融合タンパク質)を含む多量体を意味する。これらのホモマーは、同一または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチド断片を含むし得る。特定の実施形態において、本発明のホモマーは、同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片のみを含む多量体である。他の特定の実施形態において、本発明のホモマーは、異なるアミノ酸配列を有するポリペプチド断片を含む多量体である。特定の実施形態では、本発明の多量体は、ホモ二量体(例えば、同一または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む)またはホモ三量体(例えば、同一または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む)である。その他の実施形態では、本発明のホモ多量体は、少なくともホモ二量体、少なくともホモ三量体、または

少なくともホモ四量体である。

【0204】

本明細書において使用される、ヘテロマーという用語は、本発明のポリペプチドに加えて、1種または複数種の異種ポリペプチド（つまり、異なるタンパク質またはそのポリペプチドに相当する）を含有する多量体である。特定の実施形態において、本発明の多量体は、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体、またはヘテロ四量体である。その他の実施形態では、本発明のヘテロ多量体は、少なくともヘテロ二量体、少なくともヘテロ三量体、または少なくともヘテロ四量体である。その他の特定の実施形態では、本発明のヘテロ多量体は、GZIPポリペプチド断片およびAPM1ポリペプチド断片を含有し、好ましくは、前記APM1ポリペプチド断片はgAPM1ポリペプチド断片である。

10

【0205】

本発明の多量体は、疎水結合、親水結合、イオン結合および/または共有結合の結果であるか、または例えばリポソーム形成によって間接的に連結される。このように、一実施形態において、本発明の多量体、例えばホモ二量体またはホモ三量体などは、本発明のポリペプチドが溶液中で互いに接触すると形成される。別の実施形態では、本発明のヘテロ多量体、例えばヘテロ三量体またはヘテロ四量体などは、本発明のポリペプチドが溶液中で本発明のポリペプチドに対する抗体（本発明の融合タンパク質における異種ポリペプチド配列に対する抗体を含む）と接触すると形成される。他の実施形態において、本発明の多量体は、本発明のポリペプチドとの共有結合または本発明のポリペプチド間の共有結合によって形成される。かかる共有結合は、ポリペプチド配列に含まれる1つまたは複数のアミノ酸残基（例えば、配列表に記載されている、または寄託クローンによってコードされるポリペプチドに含まれる）を要する。一例において、その共有結合は、天然（つまり、天然に存在する）ポリペプチドにおいて相互作用する、ポリペプチド配列内に位置するシステイン残基間の架橋である。その他の例では、その共有結合は、化学的または組換え操作の結果である。その代わりとしては、かかる共有結合は、本発明の融合タンパク質における異種ポリペプチド配列に含まれる1つまたは複数のアミノ酸残基を要する。

20

【0206】

一実施形態において、共有結合は、本発明の融合タンパク質に含まれる異種配列間にある（例えば、米国特許第5,478,925号参照）。特定の例において、その共有結合は、本発明のFc融合タンパク質に含まれる異種配列間にある（本明細書に記述されるように）。その他の特定の例では、本発明の融合タンパク質の共有結合は、例えば破骨細胞形成阻害因子（osteoprotegerin）などの共有結合した多量体を形成することができる他のタンパク質からの異種ポリペプチド配列間にある（例えば、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開番号：WO98/49305参照）。他の実施形態において、本発明の2種類以上のポリペプチドはペプチドリンカーによって連結される。その例としては、米国特許第5,073,627号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のペプチドリンカーが挙げられる。ペプチドリンカーによって分けられる本発明の複数のポリペプチドを含むタンパク質は、従来の組換えDNA技術を用いて作製することが可能である。

30

【0207】

本発明の多量体ポリペプチドを作製する他の方法は、ロイシンジッパーまたはイソロイシンジッパーポリペプチド配列に融合される本発明のポリペプチドの使用を含む。ロイシンジッパーまたはイソロイシンジッパードメインは、それらが見出されるタンパク質の多量体化を促進するポリペプチドである。ロイシンジッパーは最初に、いくつかのDNA結合タンパク質において同定され、それ以来、様々なタンパク質で見出されている(Landschulz et al., (1988) Genes Dev. Jul ; 2 (7): 786-800)。公知のロイシンジッパーの中では、二量体化または三量体化する、天然ペプチドおよびその誘導体が挙げられる。本発明の可溶性多量体タンパク質を作製するのに適したロイシンジッパードメインの例としては、参照により本明細書に組み込まれる国際特許出願公開番号：WO94/10308に記載のドメインが挙げられる。溶解状態で二量体化または三量体化するポリペプチド配列

40

50

に融合される本発明のポリペプチドを含む組換え融合タンパク質は、適切な宿主細胞中で発現され、その結果得られた可溶性多量体融合タンパク質は、当技術分野で公知の技術を用いて、培養上清から回収される。

【0208】

本発明の三量体のポリペプチドは、向上した生物活性の利点を提供する。好ましいロイシンジッパー部位およびイソロイシン部位は、三量体を優先的に形成する部位である。一例は、参照により本明細書に組み込まれる、Hoppe et al. FEBS Letters (1994) May 16 ; 344 (2-3): 191-5および米国特許出願第08/446,922号に記載の肺表面活性剤タンパク質D (SPD) に由来するロイシンジッパーである。本発明の三量体ポリペプチドの製造において、天然の三量体タンパク質に由来する他のペプチドを用いることもできる。別の例では、本発明のタンパク質は、Flag (登録商標) ポリペプチド配列を含有する本発明の融合タンパク質に含まれる、Flag (登録商標) ポリペプチド間の相互作用によって結び付けられる。さらなる実施形態において、本発明のタンパク質は、本発明のFlag (登録商標) 融合タンパク質に含まれる異種ポリペプチド配列と、Flag (登録商標) 抗体との間の相互作用によって結び付けられる。

【0209】

本発明の多量体は、当技術分野で公知の化学技術を用いて作製することが可能である。例えば、リンカー分子および当技術分野で公知のリンカー分子長さ最適化技術を用いて、本発明の多量体に含まれることが望ましいポリペプチドを化学的に架橋することができる(例えば、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,478,925号参照)。さらに、当技術分野で公知の技術を用いて、本発明の多量体を作製し、多量体に含まれることが望ましいポリペプチドの配列内に位置するシステイン残基間で1つまたは複数の分子間架橋を形成することができる(例えば、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,478,925号参照)。さらに、本発明のポリペプチドは、ポリペプチドのC末端またはN末端にシステインまたはビオチンを付加することによって、通常通り修飾することが可能であり、当技術分野で公知の技術を適用し、これらの修飾ポリペプチドの1種または複数種を含有する多量体を作製することができる(例えば、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,478,925号参照)。さらに、当技術分野で公知の少なくとも30種類の技術を適用し、本発明の多量体に含まれることが望ましいポリペプチド成分を含有するリボソームを作製することができる(例えば、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,478,925号参照)。

【0210】

代替方法としては、当技術分野で公知の遺伝子工学技術を用いて、本発明の多量体を作製することができる。一実施形態において、本発明の多量体中に含まれるポリペプチドは、明細書に記載の、またはそうでなければ当技術分野で公知の融合タンパク質技術を用いて組換えにより作製される(例えば、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,478,925号参照)。特定の実施形態において、本発明のホモ二量体をコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをリンカーポリペプチドに連結し、次いで、さらに元のC末端からN末端の逆向きにポリペプチドの翻訳産物をコードする合成ポリヌクレオチド(リーダー配列を欠く)に連結することによって作製される(例えば、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,478,925号参照)。他の実施形態において、明細書に記載の、またはそうでなければ当技術分野で公知の組換え技術を適用し、膜貫通ドメイン(または疎水性もしくはシグナルペプチド)を含有し、かつ膜再構成技術によってリボソーム中に組み込むことができる、組換えポリペプチドが作製される(例えば、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,478,925号参照)。

II. 本発明のGZIPポリヌクレオチド

好ましいポリヌクレオチドは、本発明のGZIPポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。GZIPポリヌクレオチドをコードする組換えポリヌクレオチドは、限定

されないが、その活性のアンタゴニストおよびアゴニストについてのスクリーニングアッセイで使用される組換え細胞中のポリペプチドの発現を含む様々な方法において、ならびに限定されないが、その活性のアゴニストおよびアンタゴニストについてのスクリーニングアッセイを含む様々な方法で用いられるその精製を容易にするため、診断スクリーニングおよび抗体の産生、ならびに代謝関連疾患および障害の治療または予防または体重減少のために用いることができる。

【0211】

本発明は、本明細書に記載の、GZIPポリペプチドおよびその変異ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。これらのポリヌクレオチドは、精製、単離、または組換えポリヌクレオチドであり得る。すべての場合において、本発明の目的のGZIPポリヌクレオチドは、本明細書に記載かつ記述されているように代謝関連活性を有する、本発明のGZIPポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

10

断片

ポリヌクレオチド断片は、完全長GZIPポリペプチドのすべてではないが一部と完全に同一の配列、または指定のGZIPポリペプチドのヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドである。かかる断片は「独立」しており、つまり他のポリヌクレオチドの一部ではない、または他のポリヌクレオチドに融合していない、あるいは、それらがその一部または領域を形成する別の非GZIP（異種）ポリヌクレオチド内に含まれる。しかしながら、いくつかのGZIPポリヌクレオチド断片は、単一ポリヌクレオチド内に含まれる。

【0212】

20

本発明のGZIPポリヌクレオチドは、18個の連続した塩基から、インタクトなGZIPポリペプチドをコードする完全長ポリヌクレオチド配列、例えば配列番号：1における完全長GZIPポリペプチドのポリヌクレオチド配列よりも18個の連続した塩基分短い数の塩基を含む。この実施形態の一態様において、そのポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500、505、510、515、520、525、530、535、540、545、550、555、560、565、570、575、580、585、590、595、600、605、610、615、620、625、630、635、640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、690、695、700、705、710、715、720、725、740、770、800、850、または897個の連続するヌクレオチドを含む。

30

40

【0213】

上記の好ましい核酸サイズの外に、さらに好ましい核酸は、少なくとも18ヌクレオチドを含み、「少なくとも18」とは、18と、配列番号：1または本明細書の他で示されるインタクトなGZIPポリペプチドcDNAの3'最高ヌクレオチド位置より低い18ヌクレオチドを表す整数と、の間の任意の整数として定義される。

【0214】

好ましい本発明のポリヌクレオチドとして、それらの5'および3'位置に関してさらに指定される、上述のような少なくとも18ヌクレオチド長さの核酸断片がさらに包含される。5'または3'位置は、以下の配列表に示される位置番号によって表される。対立遺伝子および退化（degenerate）および他の変異体に関して、1位は、ORFの5'最高ヌ

50

クレオチド、つまり開始コドン (A T G) のヌクレオチド「 A 」として定義され、残りのヌクレオチドは通し番号が付けられる。したがって、少なくとも 18 隣接ヌクレオチド長さのポリヌクレオチド断片が、インタクトな G Z I P ポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチド上で占める 5 ' および 3 ' ヌクレオチド位置のあらゆる組み合わせが、個々の種として本発明に包含される。5 ' および 3 ' 位置によって指定されるポリヌクレオチド断片はすぐに考えられ、したがって、不必要に明細書を長くするためだけにそれぞれに列挙しない。

【 0 2 1 5 】

その代わりに、本発明のポリヌクレオチドの上記の種は、式「 x ~ y 」によって示され；「 x 」は、ポリヌクレオチドの 5 ' 最高ヌクレオチド位置に等しく、「 y 」は、ポリヌクレオチドの 3 ' 最高ヌクレオチド位置に等しく；さらに、「 x 」は、1 と、本発明のポリヌクレオチド配列のヌクレオチド数 - 18 との間の整数に等しく、「 y 」は、19 と、本発明のポリヌクレオチド配列のヌクレオチド数 - 18 との間の整数に等しく；「 x 」は、「 y 」よりも少なくとも 18 小さい整数であることに留意のこと。

【 0 2 1 6 】

本発明はまた、上述のように、5 ' および 3 ' 位置によって指定される本発明のポリヌクレオチド断片またはヌクレオチドのサイズによって指定されるポリヌクレオチドのいずれかの種を除外する。上述のように、5 ' および 3 ' 位置によって、またはヌクレオチドのサイズによって指定される任意の数の断片が除外され得る。

【 0 2 1 7 】

本発明の G Z I P ポリヌクレオチド断片は、18 個の連続する塩基から、本明細書に記載の G Z I P 断片をコードする完全長ポリヌクレオチド配列を含む。この実施形態の一態様において、そのポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも 18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500、505、510、515、520、525、530、535、540、545、550、555、560、565、570、575、580、585、590、595、600、605、610、615、620、625、630、635、640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、690、695、700、705、710、715、720、725、740、770、800、850、または 897 個の連続するヌクレオチドを含む。

【 0 2 1 8 】

上記の好ましい核酸サイズの他に、さらに好ましい核酸は、少なくとも 18 ヌクレオチドを含み、「少なくとも 18」とは、18 と、本明細書における G Z I P 断片 c D N A の 3 ' 最高ヌクレオチド位置に相当する整数と、の間の任意の整数として定義される。

【 0 2 1 9 】

本発明の好ましいポリヌクレオチドとして、それらの 5 ' および 3 ' 位置に関してさらに指定される、上述のような少なくとも 18 ヌクレオチド長さの核酸断片がさらに包含される。5 ' または 3 ' 位置は、以下の配列表に示される位置番号によって表される。対立遺伝子および退化 (degenerate) および他の変異体に関して、1 位は、オープンリーディングフレーム (O R F) の 5 ' 最高ヌクレオチド、つまり開始コドン (A T G) のヌクレオチド「 A 」として定義され、残りのヌクレオチドは通し番号が付けられている。したがって、少なくとも 18 隣接ヌクレオチド長さの本発明のポリヌクレオチド断片が、本発明の

10

20

30

40

50

GZIP断片ポリヌクレオチド上で占め得る5'および3'ヌクレオチド位置のあらゆる組み合わせが、個々の種として本発明に包含される。5'および3'位置によって指定されるポリヌクレオチド断片はすぐに考えることができ、したがって、不必要に明細書を長くするためだけにそれぞれに列挙しない。

【0220】

その代わりとして、本発明のポリヌクレオチドの上記の種は、式「 $x \sim y$ 」によって示され；「 x 」は、ポリヌクレオチドの5'最高ヌクレオチド位置に等しく、「 y 」は、ポリヌクレオチドの3'最高ヌクレオチド位置に等しく；さらに、「 x 」は、1と、本発明のGZIPポリヌクレオチド配列のヌクレオチド数-18との間の整数に等しく、「 y 」は、9と、本発明のGZIPポリヌクレオチド配列のヌクレオチド数との間の整数に等しく；「 x 」は、「 y 」よりも少なくとも18小さい整数であることに留意されたい。「 x 」および「 y 」位置のあらゆる組み合わせが、本発明の特定の実施形態として包含される。さらに、式「 x 」~「 y 」は、「 $x_1 - x_2$ 」~「 $y_1 - y_2$ 」と変更することが可能であり、「 $x_1 - x_2$ 」および「 $y_1 - y_2$ 」は、配列表のいずれか2つのヌクレオチド位置から選択される位置範囲を表す。代わりの式には、「 $x_1 - x_2$ 」~「 y 」および「 x 」~「 $y_1 - y_2$ 」が含まれる。

【0221】

これらの特定の実施形態、および本明細書に記載の他のポリヌクレオチド断片は、「少なくとも」、「等しい」、「以下」、「未満」、「少なくとも__であるが、__以下」または「__から(～)__」の指定のサイズまたは指定の5'もしくは3'位置であるように変更される。上述のように、5'および3'位置によって、またはヌクレオチドのサイズによって指定される任意の数の断片が除外され得る。

変異体

他の好ましい実施形態において、GZIPポリペプチドをコードするGZIPポリヌクレオチドの変異体が考えられる。本明細書で使用される用語としてのポリヌクレオチドの変異体は、その配列が参照ポリヌクレオチドと異なるポリヌクレオチドである。ポリヌクレオチド変異体は、自然発生する対立遺伝子変異体などの自然発生変異体であるか、または自然に発生することが知られていない変異体であり得る。ポリヌクレオチドの自然発生しないかかるとは、ポリヌクレオチド、細胞または生物に適用される技術を含む、突然変異誘発技術によって作製することが可能である。一般に、参照および変異体のヌクレオチド配列が全体的に非常に類似しており、多くの領域においては、同一であるように、差異は限定されている。

【0222】

遺伝暗号の退化のために本発明のGZIPポリペプチドをまだコードするが、上述のものと実質的に異なる配列を含むポリヌクレオチド変異体もまた、具体的に考えられる。上述の退化変異体を作製すること、例えば特定の宿主に対するコドンの発現を最適化する（例えば、他の哺乳動物または細菌宿主細胞により、ヒトmRNAにおけるコドンを、好ましいコドンに変える）こともまた、当業者には公知であるだろう。

【0223】

上述のように、自然突然変異体などの変異ポリヌクレオチドは、自然に発生するか、または組換え法により作製される。「対立遺伝子変異体」によって、生物の染色体上の所定の遺伝子座を占有する遺伝子のいくつかの他の形のうちの1つが意図される（例えば、B. Lewin, (1990) Genes IV, Oxford University Press, New York参照）。自然発生変異体は、当技術分野で公知の突然変異誘発技術を用いて作製することができる。かかる核酸変異体には、ヌクレオチドの置換、欠失、または付加によって作製された変異体が含まれる。その置換、欠失、または付加には、1つまたは複数のヌクレオチドが関与する。コード領域における変化によって、保存的または非保存的アミノ酸置換、欠失または付加が引き起こされる。これらの中で特に好ましいのは、本発明のGZIPポリペプチドの特性および活性を変化させない、サイレントな置換、付加および欠失である。この点から、保存的置換もまた好ましい。

【0224】

変異ポリヌクレオチドに存在するヌクレオチドの変化は、サイレントであることが好ましく、ポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸をそれらが変化させないことを意味する。しかし、ヌクレオチドの変化によって、参照配列によりコードされるポリペプチドにおけるアミノ酸置換、付加、欠失、融合および切断もまた生じる場合がある。

【0225】

ヌクレオチドの置換によって1つまたは複数のアミノ酸の変化が生じる場合には、好ましいGZIPポリペプチドとしては、本発明の好ましい実施形態のセクションIに記述されている、1種または複数種の代謝関連活性を保持するポリペプチドが挙げられる。

【0226】

「同じ活性を保持する」とは、変異GZIPポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを用いて、アッセイで測定された活性が、本明細書における実施例のセクションで記述されているGZIPポリペプチドを用いて測定された活性の、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であり、かつ101%、102%、103%、104%、105%、110%、115%、120%または125%以下であることを意味する。

【0227】

活性が「増加」したとは、変異GZIPポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを用いて、アッセイで測定された活性が、本明細書における実施例のセクションで記述されているGZIPポリペプチドを用いて測定された活性の、少なくとも125%、130%、135%、140%、145%、150%、155%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、275%、300%、325%、350%、375%、400%、450%、または500%であることを意味する。

【0228】

活性が「減少」したとは、変異GZIPポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを用いて、アッセイで測定された活性が、本明細書における実施例のセクションで記述されているGZIPポリペプチドを用いて測定された活性の、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%、80%、90%または95%であることを意味する。

同一性割合

本発明はさらに、本発明の好ましい実施形態のセクションIに記載のように代謝関連活性を有するポリペプチドをコードする、配列番号：1のポリヌクレオチド配列またはその断片と、少なくとも0%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一の配列を有する核酸分子に関する。当然のことながら、遺伝暗号の退化のために、配列番号：1に示される核酸またはその断片と、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の多数の核酸分子が、生物活性を有するポリペプチドをコードするであろうことは、当業者であれば認識されよう。実際に、これらのヌクレオチド配列の退化変異体がすべて、同じポリペプチドをコードすることから、このことは、上述の比較アッセイを行わずとも、当業者には明らかであるだろう。退化変異体ではないかかる核酸分子については、適切な数が生物活性を有するポリペプチドをコードするであろうことは、当技術分野においてさらに認識されるだろう。これは、本発明の好ましい実施形態のセクションIにさらに記述されているように、タンパク質の機能に著しく影響を及ぼす可能性が低い、または影響を及ぼしそうにない、アミノ酸置換（例えば、1つの脂肪族アミノ酸を2番目の脂肪族アミノ酸で置換すること）を当業者は完全に認識しているからである。

【0229】

ポリヌクレオチド配列が、GZIPポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列の100ヌクレオチドそれぞれにつき5つまでの点突然変異を含み得ることを除いては、本発明の参照ヌクレオチド配列と例えば少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによって、そのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、参照配列と同

10

20

30

40

50

ーであることが意図される。言い換えると、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一のヌクレオチドを得るために、参照配列におけるヌクレオチドの5%までが欠失、挿入、または他のヌクレオチドで置換されてもよい。問い合わせ配列は全配列であるか、または本明細書に記載のように指定されるいずれかの断片である。

【0230】

いずれかの特定の核酸分子またはポリペプチドが、本発明のヌクレオチド配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるかどうかを決定かつ定義する方法は、公知のコンピューター・プログラムを用いて行うことができる。大域的配列アライメントとも呼ばれる、問い合わせ配列（本発明の配列）と対象配列との最高の全体的マッチを決定する他の好ましい方法は、Brutlag et al. ((1990) Comput Appl Biosci. Jul ; 6 (3): 23745) のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピューター・プログラムを用いて決定することができる。配列アライメントにおいて、問い合わせ配列および対象配列はどちらもDNA配列である。RNA配列は、最初にU'をT'に変換することによって比較することができる。前記大域的配列アライメントの結果は、同一性割合で示される。同一性割合を計算するために、DNA配列のFASTDBアライメントに使用される好ましいパラメーターは：マトリックス＝ユニタリー、k-タプル＝4、ミスマッチペナルティ＝1、結合ペナルティ（Joining Penalty）＝30、無作為化群長さ＝0、カットオフ・スコア＝1、ギャップペナルティ＝5、ギャップサイズペナルティ＝0.05、ウィンドウサイズ＝500または対象ヌクレオチド配列の長さのいずれか短いほうである。

【0231】

内部の欠失のためではなく、5'もしくは3'欠失のために、対象配列が問い合わせ配列よりも短い場合には、手作業でその結果に補正を加えなければならない。これは、FASTDBプログラムは、同一性割合を計算する場合に対象配列の5'および3'の切断を計算に入れていないからである。手作業での訂正は、対象配列における切断のためにアラインされていない全問い合わせ配列のパーセントを決定することと、FASTDBプログラムにより計算された同一性パーセントからこのパーセントを減算することを含む。この訂正されたスコアは、本発明の目的のために使用される。本発明の目的のために、他の手作業での訂正は加えられない。5'または3'末端で切断された対象配列に関して、問い合わせ配列に対してその同一性割合は、問い合わせ配列の全塩基のパーセントとして、マッチ/アラインしていない、対象配列の5'および3'末端である問い合わせ配列の塩基数を計算することによって補正される。ヌクレオチドがマッチ/アラインしているかどうかは、FASTDB配列アライメントの結果によって決定される。次いで、このパーセンテージは、同一性割合から減算され、指定のパラメーターを用いて上記のFASTDBプログラムによって計算され、最終的な同一性割合スコアが得られる。この補正スコアは、本発明の目的のために使用されるものである。問い合わせ配列とマッチ/アラインしない、FASTDBアライメントによって示される、対象配列の5'および3'末端ヌクレオチド以外のヌクレオチドのみが、同一性割合スコアを手作業で調整する目的のために計算される。

【0232】

例えば、90ヌクレオチドの対象配列が100ヌクレオチドの問い合わせ配列とアラインされ、同一性割合が決定される。その欠失は、対象配列の5'末端で生じ、したがってFASTDBアライメントによって、5'末端の最初の10ヌクレオチドのマッチ/アライメントは示されない。10個の不对ヌクレオチドは、配列の10%（マッチしていない5'末端および3'末端のヌクレオチド数/問い合わせ配列におけるヌクレオチドの総数）であり、そのため、FASTDBプログラムによって計算される同一性スコア%から10%が減算される。残りの90ヌクレオチドが完全にマッチする場合、最終的な同一性割合は90%となるだろう。

【0233】

他の実施例において、90ヌクレオチドの対象配列が100ヌクレオチドの問い合わせ

配列と比較される。この時、欠失は内部であり、そのため、問い合わせ配列とマッチ/アラインしない対象配列の5'もしくは3'末端にヌクレオチドはない。この場合、FASTDBによって計算された同一性割合は手作業で補正されない。再度、問い合わせ配列とマッチ/アラインしない対象配列の5'または3'末端のヌクレオチドのみが、手作業で補正される。本発明の目的のために、手作業での他の補正は加えられない。

融合

さらなる異種アミノ酸配列のコード配列にインフレームで融合される、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがさらに本発明に包含される。さらなる非コード配列、限定されないが、例えば非コード5'および3'配列、ベクター配列、精製、プローピング、もしくはプライミングに使用される配列と共に、本発明のポリペプチドをコードする核酸もまた、本発明に包含される。例えば、異種配列には、リボゾーム結合およびmRNAの安定性など、転写およびmRNAプロセッシングにおいて役割を果たす、転写、非翻訳配列が含まれる。あるいは、異種配列は、さらなる機能性を提供する、さらなるコード配列を含み得る。このように、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、融合ポリペプチドの精製を容易にするペプチドをコードする配列などのタグ配列に融合される。本発明のこの態様の特定の好ましい実施形態において、タグアミノ酸配列は、例えば市販されている多くの中でも特に、pQEベクター(QIAGEN社(9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311))において提供されるタグなどのヘキサヒスチジン(His6)ペプチドである。例えば、His6は、融合タンパク質の簡便な精製を提供する(Gentz et al., (1989) Proc Natl Acad Sci USA Feb; 86 (3): 821-4参照)。「HA」タグは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質由来のエピトープに相当する、精製に有用なもう1つのペプチドである(Wilson et al., (1984) Cell 37 (3): 767-78参照)。上述のように、他のかかる融合タンパク質には、NまたはC末端でFcに融合されたGZIP cDNAが含まれる。

III. 本発明の組換えベクター

「ベクター」という用語は、二本鎖または一本鎖のいずれかであり、かつ単細胞もしくは多細胞宿主生物に導入されることが求められる対象の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む、環状もしくは直鎖状DNAまたはRNA分子を示すために本明細書で用いられる。

【0234】

本発明は、本明細書に記載のポリヌクレオチドのいずれか1つを含む組換えベクターに関する。

【0235】

本発明は、本発明のGZIPポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換えベクターのファミリーを包含する。

【0236】

第1の好ましい実施形態において、本発明の組換えベクターを用いて、挿入されたポリヌクレオチドが適切な細胞宿主において増幅される。このポリヌクレオチドは、組換えベクターが複製するたびに増幅される。挿入されたポリヌクレオチドは、本発明のGZIPポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであることが可能である。

【0237】

本発明による組換えベクターの第2の好ましい実施形態は、本発明のGZIPポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターからなる。特定の実施形態内で、発現ベクターを用いて、本発明のGZIPポリペプチド、好ましくは本発明において述べられる修飾GZIPを発現させ、次いでそれを精製し、例えば代謝関連疾患の治療に、または個体の体重を単に減らすために用いることができる。

【0238】

発現には、ベクターにおいて適切なシグナルが提供されることが必要であり、前記シグナルには、宿主細胞において対象の遺伝子の発現を誘導する、ウイルスおよび哺乳動物両方由来のエンハンサー/プロモーターなど、種々の調節因子が含まれる。ポリペプチドの

発現に薬物選択マーカの発現を結び付ける因子であることから、産物を発現する永久的な、安定な、細胞クローンを確立するためのドミナントな薬物選択マーカが一般に、本発明の発現ベクター中に含まれる。

【0239】

特に、本発明は、GZIPポリペプチドの中で選択される調節配列の制御下にて、またはその代わりとしては外来性調節配列の制御下にて、本発明のGZIPポリペプチド、または本明細書に記載の修飾GZIP、またはその変異体もしくは断片をコードする核酸を含む発現ベクターに関する。

【0240】

その結果として、本発明の好ましいベクターは：(a) それに作動可能に連結されるコードポリヌクレオチドの発現を誘導する、GZIP調節配列；(b) 適切な宿主または宿主生物中でのその発現を可能にする調節配列に作動可能に連結される、本発明のGZIPコード配列；からなる群から選択される。

【0241】

本発明のベクターにおいて見出すことができる因子のいくつかは、以下のセクションでさらに詳細に記述する。

1) 本発明の発現ベクターの一般的な特徴：

本発明による組換えベクターは、限定されないが、YAC(酵母人工染色体)、BAC(細菌人工染色体)、ファージ、ファージミド、コスミド、プラスミド、および染色体DNA、非染色体DNA、半合成もしくは合成DNAからなり得る直鎖状DNAを含む。かかる組換えベクターは：

(1) 遺伝因子または遺伝子発現において調節的役割を有する因子、例えばプロモーターまたはエンハンサー。エンハンサーは、転写を増加するようにプロモーターに作用する、通常長さ約10～300bpのDNAのシス作用因子である；

(2) mRNAに転写され、最終的にポリヌクレオチドに翻訳される、構造またはコード配列であり、前記構造またはコード配列は(1)に記載の調節因子に作動可能に連結される；

(3) 適切な転写開始および終結配列；
のアセンブリーを含む転写単位を含み得る。酵母または真核生物発現系での使用が意図される構造単位は好ましくは、宿主細胞による翻訳タンパク質の細胞外分泌をコードするリーダー配列を含む。その代わりとして、組換えタンパク質が、リーダーもしくは輸送配列なしに発現される場合、それは、N末端残基を含み得る。この残基は、最終産物を得るために、発現された組換えタンパク質から続いて切断されてもよいし、または切断されなくてもよい。

【0242】

一般的に、組換え発現ベクターは、複製開始点、宿主細胞の形質転換を可能にする選択マーカ、および下流の構造配列の転写を指示する、高度に発現された遺伝子に由来するプロモーターを含むだろう。その異種構造配列は、翻訳開始および終結配列、好ましくは、翻訳タンパク質の分泌を指示することができるリーダー配列と集合して、細胞膜周辺腔または細胞外媒体が形成される。ベクターが、哺乳動物宿主細胞において目的の配列をトランスフェクトおよび発現させるために適応される特定の実施形態において、好ましいベクターは、目的の宿主において複製開始点、適切なプロモーターおよびエンハンサーを含み、いずれかの必要なりボゾーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終結配列、および5'フランキング非転写配列もまた含むだろう。SV40ウイルスゲノム、例えばSV40起源に由来するDNA配列、初期プロモーター、エンハンサー、スプライス部位およびポリアデニル化部位を用いて、必要とされる非転写遺伝因子を提供することができる。

2) 調節因子

プロモーター

本発明の発現ベクターにおいて用いられる適切なプロモーター領域は、異種遺伝子が発

10

20

30

40

50

現される細胞宿主を考慮に入れて選択される。対象の核酸配列の発現を制御するのに用いられる特定のプロモーターは、それが、標的細胞における核酸の発現を指示することができるかぎり、重要であるとは考えられない。このように、ヒト細胞が標的化される場合、例えばヒトもしくはウイルスプロモーターなど、ヒト細胞において発現させることができるプロモーターに隣接して、かつプロモーターの制御下に、核酸コード領域を位置付けることが好ましい。

【0243】

適切なプロモーターは、それが発現を制御する核酸に対して異種であるか、またはその代わりとして、発現されるコード配列を含有する天然ポリヌクレオチドに内因性であり得る。さらに、そのプロモーターは、コンストラクトのプロモーター/コード配列が挿入されている組換えベクター配列に対して一般に異種である。プロモーター領域は、例えば、CAT (クロラムフェニコールトランスフェラーゼ) ベクター、さらに好ましくは pKK232-8 および pCM7 ベクターを用いて、いずれかの所望の遺伝子から選択することができる。好ましい細菌プロモーターとしては、LacI、LacZ、T3 または T7 バクテリオファージ RNA ポリメラーゼプロモーター、gpt、PR、PL および trp プロモーター (EP 0036776)、ポリヘドリンプロモーター、またはバキュロウイルス由来の p10 タンパク質プロモーター (Kit Novagen) (Smith et al., (1983) Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165; O'Reilly et al. (1992))、PR プロモーター、または trc プロモーターも挙げられる。

【0244】

真核生物プロモーターとしては、CMV 前初期プロモーター、HSV チミジンキナーゼ、初期および後期 SV40、レトロウイルス由来の LTR、およびマウスメタロチオネン-L が挙げられる。さらに、脂肪組織、筋肉組織、または肝臓における発現を促進するプロモーターなど、特定の細胞型に特異的なプロモーターを選択することが可能である。簡便なベクターおよびプロモーターの選択は、当業者のレベル内に十分ある。

【0245】

プロモーターの選択は、遺伝子工学の分野における当業者の能力内に十分ある。例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989) または、Fuller et al. (1996) Immunology in Current Protocols in Molecular Biology に記載の手順もまた参照することができる。

他の調節因子

cDNA インサートを用いる場合、通常、遺伝子転写物の適切なポリアダニル化を生じさせるポリアダニル化シグナルを含むことが望ましいだろう。ポリアダニル化シグナルの性質は、本発明の実行の成功に重要であるとは考えられず、ヒト成長ホルモンおよび SV40 ポリアダニル化シグナルなどの、かかるいずれかの配列が用いられる。発現カセットの因子として、ターミネーターもまた企図される。これらの因子は、メッセージレベルを高め、かつカセットから他の配列へのリードスルー (読み過ごし) を最小限にする役割を果たすことができる。

【0246】

上述のような適切な DNA 配列を含有するベクターを用いて、適切な宿主を形質転換し、目的のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを発現させることができる。

3) 選択マーカー

かかるマーカーは、細胞に同定可能な変化を与え、その結果、発現コンストラクトを含有する細胞を容易に同定することが可能となるだろう。形質転換宿主細胞を選択するための選択マーカー遺伝子は、真核細胞培養に対してジヒドロ葉酸還元酵素またはネオマイシン耐性、S. cerevisiae に対して TRP1 または大腸菌においてテトラサイクリン、リファンピシンまたはアンピシリン耐性、ミコバクテリアに対してレバンスクラゼ (levan saccharase) であることが好ましく、この後者のマーカーは天然選択マーカーである。

4) 好ましいベクター

細菌ベクター

限定されないが、代表的なものとして、細菌の用途に有用な発現ベクターは、選択マーカー、および pBR322 (ATCC 37017) の遺伝因子を含む市販のプラスミドから誘導される細菌複製起点を含み得る。かかる市販のベクターとしては、例えば pKK223-3 (Pharmacia 社 (スウェーデン、ウプサラ))、pGEM1 (Promega Biotech 社 (米国、ウィスコンシン州マディソン)) が挙げられる。

【0247】

以下の細菌ベクター：pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen 社)、pbs、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH46A (Stratagene 社)；ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia 社)；pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene 社)；pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL (Pharmacia 社)；pQE-30 (QIAexpress 社) など、他の多数の適切なベクターが当業者に知られており、かつ市販されている。

10

バキュロウイルスベクター

本発明のポリペプチドの発現に適したベクターは、昆虫細胞および昆虫細胞系で増殖することができるバキュロウイルスベクターである。他の特定の適切な宿主ベクター系は、Spodoptera frugiperda 由来の SF9 細胞系 (ATCC 番号 CRL 1711) をトランスフェクトするために使用される、pVL1392/1393 バキュロウイルス導入ベクター (Pharming 社) である。

20

【0248】

バキュロウイルス発現における Apm1 球状ヘッド (head) ポリペプチドの発現に適した他のベクターとしては、Chai et al. (1993; Biotechnol Appl Biochem. Dec; 18 (Pt 3): 259-73)；Vlasak et al. (1983; Eur J Biochem Sep 1; 135 (1): 123-6)；および Lenhard et al. (1996; Gene Mar 9; 169 (2): 187-90) によって記述されているベクターが挙げられる。

ウイルスベクター

特定の一実施形態において、そのベクターはアデノウイルスに由来するベクターである。本発明による好ましいアデノウイルスベクターは、Feldman および Steg (1996; Semin Interv Cardiol Sep; 1 (3): 203-8) または Ohno et al. (1994; Science Aug 5; 265 (5173): 781-4) によって記述されているベクターである。本発明のこの特定の実施形態による他の好ましい組換えアデノウイルスは、ヒトアデノウイルス 2 型もしくは 5 型 (Ad2 もしくは Ad5) または動物由来のアデノウイルスである (仏国特許出願番号 FR-93.05954 参照)。

30

【0249】

レトロウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターは一般に、特にヒトを含む動物に、インビボで外来性ポリヌクレオチドを導入するための選り抜きの組換え遺伝子送達系であると理解されている。これらのベクターは、細胞中に遺伝子を効率的に送達し、導入された核酸は、宿主の染色体 DNA 中に安定的に組み込まれる。

40

【0250】

本発明のレトロウイルスのインビトロまたはインビボ遺伝子送達媒体の作製または構築に特に好ましいレトロウイルスには、ミンク細胞増殖巣誘導ウイルス (Mink-Cell Focus Inducing Virus)、マウス肉腫ウイルス、細網内皮症ウイルスおよびラウス肉腫ウイルスからなる群から選択されるレトロウイルスが含まれる。特に好ましいマウス白血病ウイルスとしては、4070A および 1504A ウイルス、Abelson (ATCC 番号 VR-999)、Friend (ATCC 番号 VR-245)、Gross (ATCC 番号 VR-590)、Rauscher (ATCC 番号 VR-998) およびモロニーマウス白血病ウイルス (ATCC 番号 VR-190；国際公開番号：WO94/24298) が挙げられる

50

。特に好ましいラウス肉腫ウイルスとしては、ブライアン (Bryan) 高力価ウイルス (A T C C 番号 V R - 3 3 4、V R - 6 5 7、V R - 7 2 6、V R - 6 5 9 および V R - 7 2 8) が挙げられる。他の好ましいレトロウイルスベクターは、Roth et al., (1996)、国際特許出願公開番号: W O 9 3 / 2 5 2 3 4、国際特許出願公開番号: W O 9 4 / 0 6 9 2 0、Roux et al., (1989) Proc Natl Acad Sci U S A Dec; 86 (23): 9079-83)、Julan et al., (1992) J. Gen. Virol. 3: 3251-3255 および Neda et al., (1991) J Biol Chem Aug 5; 266 (22): 14143-6) に記載されているベクターである。

【 0 2 5 1 】

本発明によって企図されるさらに他のウイルスベクター系は、アデノ随伴ウイルス (A A V) からなる。アデノ随伴ウイルスは、効率的な複製および増殖的生活環のためのヘルパーウイルスとして、アデノウイルスまたはヘルペスウイルスなどのその他のウイルスを必要とする天然の欠損ウイルスである (Muzyczka, et al., Curr. Top. Micro. Immunol. (1992) 158: 97-129 参照)。それは、非分裂細胞にその D N A を組み込むことができ、高頻度で安定的な組込みを示すわずかなウイルスのうちの 1 つでもある (Flotte et al., (1992) Am J Respir Cell Mol Biol Sep; 7 (3): 349-56; Samulski et al., (1989) J Virol Sep; 63 (9): 3822-8; McLaughlin et al., (1989) Am. J. Hum. Genet. 59: 561-569)。A A V の有利な特徴は、形質転換細胞に対して、一時細胞を形質導入する、その低下した有効性から得られる。

5) 組換えベクターの送達

本発明のポリヌクレオチドの発現を生じさせるために、これらのコンストラクトは、細胞に送達されなければならない。この送達は、細胞系を形質転換する実験手順の場合と同様にインビトロで、または特定の疾患状態の治療の場合と同様にインビボまたはエクスピボで達成される。

【 0 2 5 2 】

発現コンストラクトが感染性ウイルス粒子中に封入されるあるメカニズムは、ウイルス感染である。

【 0 2 5 3 】

培養哺乳動物細胞中にポリヌクレオチドを導入する数種類の非ウイルス的方法もまた本発明によって企図され、その方法としては、限定されないが、リン酸カルシウム沈殿法 (Graham et al., (1973) Virology Aug; 54 (2): 536-9; Chen et al., (1987) Mol Cell Biol Aug; 7 (8): 2745-52)、D E A E - デキストラン (Gopal, (1985) Mol Cell Biol May; 5 (5): 1188-90)、電気穿孔法 (Tur-Kaspa et al., (1986) Mol Cell Biol Feb; 6 (2): 716-8; Potter et al., (1984) Proc Natl Acad Sci USA Nov; 81 (22): 7161-5.)、直接微量注入 (Harland et al., (1985) J Cell Biol Sep; 101 (3): 1094-9)、D N A 添加リポソーム (Nicolau et al., (1982) Biochim Biophys Acta Oct 11; 721 (2): 185-90; Fraley et al., (1979) Proc Natl Acad Sci USA Jul; 76 (7): 3348-52)、および受容体仲介トランスフェクション (Wu and Wu, (1987) J Biol Chem Apr 5; 262 (10): 4429-32; Wu and Wu (1988) Biochemistry Feb 9; 27 (3): 887-92) が挙げられる。これらの技術のいくつかは、インビボまたはエクスピボ用途にうまく適応される。

【 0 2 5 4 】

発現ポリペプチドが細胞中に送達されたら、それは安定的に、レシピエント細胞のゲノムに組み込まれる。この組み込みは、相同的組換えにより同起源 (cognate) の位置および向きにあるか (遺伝子置換)、またはそれは、ランダムな、非特定位置で組み込まれる (遺伝子増強)。さらなる実施形態において、核酸は、D N A の別々のエピソードセグメントとして細胞中で安定的に維持される。かかる核酸セグメントまたは「エピソード」は、宿主細胞周期に無関係な、または宿主細胞周期と同期した維持および複製を可能にするのに十分な配列をコードする。

【 0 2 5 5 】

インビボで脊椎動物細胞の内部にタンパク質またはペプチドを送達する方法の特定の実施形態は、生理学的に許容される担体と、対象のポリペプチドを作動可能にコードする

10

20

30

40

50

裸のポリヌクレオチドとを含む調製物を、細胞を含有する組織の間質空間中に導入し、それによって、その裸のポリヌクレオチドが細胞の内部に取り込まれ、生理学的効果を有する工程を含む。これは、特にインビトロでの導入に適用可能であるが、インビボにも適用することができる。

【0256】

「裸の」ポリヌクレオチドを含む、インビトロおよびインビボで使用される組成物が、国際特許出願公開番号：WO 90 / 11092 (Vical社) および国際特許出願公開番号：WO 95 / 11307 (パスツール研究所, INSERM, Universit d'Ottawa) ならびに Tascon et al. (1996) Nature Medicine. 2 (8): 888-892 および Huygen et al. (1996) Nat Med Aug; 2 (8) : 893-8) の論文に記載されている。

10

【0257】

本発明のさらに他の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドコンストラクトを含む、本発明の裸のポリヌクレオチドの細胞への導入は、微粒子銃 (遺伝子銃) を用いて行うことが可能であり、前記粒子は、Klein et al. (1990) Curr Genet Feb; 17 (2): 97-103) によって記述されているように、それらを殺すことなく細胞膜を突き抜け、細胞に入ることが可能となる高速度に加速されるDNA被覆微粒子である。

【0258】

さらなる実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、リボソーム中に閉じ込められる (Ghosh and Bacchawat, (1991) Targeted Diagn Ther; 4: 87-103; Wong et al., (1980) Gene 10: 87-94; Nicolau et al., (1987) Methods Enzymol.; 149: 157-76)。これらのリボソームはさらに、レプチン、トリグリセリド、ACRP30、または他の公知のLSRリガンドをリボソーム膜中に組み込むことによって、LSRを発現する細胞に標的化することができる。

20

【0259】

特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載のGZIP球状ヘッドポリペプチドのインビボでの作製のための組成物を提供する。それは、このポリペプチドを作動可能にコードし、かつ組織細胞に前記ポリペプチドの発現を生じさせるための組織への導入に適した、裸のポリヌクレオチドを生理学的に許容される担体中に溶解状態で含む。

【0260】

所望の宿主細胞に注入されるベクターの量は、注入部位に応じて異なる。指示用量としては、動物の体内、好ましくは哺乳動物の体内、例えばマウス体内にベクター 0.1 ~ 100 µg が注入されるだろう。

30

【0261】

本発明によるベクターの他の実施形態において、それは宿主細胞に、好ましくは治療すべき動物から事前に採取された宿主細胞に、さらに好ましくは筋細胞などの体細胞に導入される。次の工程では、組換えタンパク質を局所的または全身的に体内に送達するために、目的の球状ヘッドポリペプチドまたは目的のその断片をコードするベクターで形質転換された細胞が、動物の体内に再び導入される。

IV. 本発明の組換え細胞

本発明の他の目的は、つまり本明細書に記載のポリヌクレオチドのうちの1つ、さらに正確には、「本発明のポリヌクレオチド」に記載のポリヌクレオチドのいずれか1つなど、本発明のGZIPポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドで形質転換されている、またはそれをトランスフェクトされている、宿主細胞組換え体からなる。これらのポリヌクレオチドは、一過性または安定なトランスフェクションの結果として、細胞中に存在し得る。本発明は、「本発明の組換えベクター」で記載のベクターのいずれか1つなどの組換えベクターで形質転換される宿主細胞 (原核細胞)、またはそれをトランスフェクトされる宿主細胞 (真核細胞) を包含する。

40

【0262】

一般に、本発明の組換え宿主細胞は、本明細書において記述される本発明のポリヌクレオチドの少なくとも1つまたは組換えベクターの少なくとも1つを含む。

50

【0263】

本発明の組換えベクターのレシピエントとして使用される好ましい宿主細胞は、以下の：

a) 原核生物の宿主細胞：大腸菌株 (I. E. DH5 - 株)、枯草菌、ネズミチフス菌、およびシュードモナス属、ストレプトマイセス属およびブドウ球菌属などの種からの株、および

b) 真核生物の宿主細胞：ヒーラ細胞 (ATCC 番号 CCL2 ; 番号 CCL2 . 1 ; 番号 CCL2 . 2)、Cv1 細胞 (ATCC 番号 CCL70)、COS 細胞 (ATCC 番号 CRL1650 ; 番号 CRL1651)、Sf-9 細胞 (ATCC 番号 CRL1711)、C127 細胞 (ATCC 番号 CRL - 1804)、3T3 (ATCC 番号 CRL - 6361)、CHO (ATCC 番号 CCL - 61)、ヒト腎臓 293 (ATCC 番号 45504 ; 番号 CRL - 1573)、BHK (EACC 番号 84100501 ; 番号 84111301)、PLC 細胞、HepG2、および Hep3B である。

10

【0264】

宿主細胞中のコンストラクトを従来の方法で使用して、組換え配列によってコードされる遺伝子産物を作製することができる。

【0265】

適切な宿主を形質転換し、その宿主を適切な細胞密度に成長させた後、選択されたプロモーターは、温度シフトまたは化学的誘導などの適切な手段によって誘導され、細胞はさらなる期間培養される。

20

【0266】

細胞は通常、遠心分離によって収集され、物理的もしくは化学的手段によって破壊され、得られた未精製抽出物は、さらに精製するために保持される。

【0267】

タンパク質の発現で用いられる微生物細胞は、凍結融解サイクル、音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む、いずれかの簡便な方法によって破壊することができる。かかる方法は当業者によく知られている。

【0268】

さらに、本発明に従って、これらの組換え細胞は、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくは、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ヒツジ、ウシ、およびヒトを含まない霊長類からなる群から選択される動物においてインビトロまたはインビボで作製することができる。インビトロで作製された組換え細胞は後に、動物に外科的に移植することもできる。動物においてインビボで組換え細胞を作製する方法は当技術分野でよく知られている。

30

【0269】

本発明は、a) 標的遺伝子の内因性染色体 DNA に外来性 (異種) ポリヌクレオチドを挿入し、b) 内因性染色体 DNA を欠失させる、または c) 内因性染色体 DNA を外来性ポリヌクレオチドと置き換えるために操作された、脊椎動物起源、好ましくは哺乳動物および特にヒト起源の一次、二次、および不死化相同的組換え宿主細胞も包含する。ポリヌクレオチド配列の挿入、欠失または置換は、標的遺伝子のコード配列に、または標的遺伝子と作動可能に結び付けられるプロモーターおよびエンハンサー配列などの調節領域に対するものである。

40

【0270】

本発明はさらに、相同的組換え宿主細胞をインビトロまたはインビボで作製する方法であって、細胞中で通常発現されない標的遺伝子の発現を変化させる方法に関する。その変化によって、通常の成長条件下または標的遺伝子によりコードされるポリペプチドを作製するのに適した条件下にて、標的遺伝子の発現が起こることが好ましい。

【0271】

その方法は：(a) ポリヌクレオチドコンストラクトをインビトロまたはインビボで細胞にトランスフェクトし、その結果、トランスフェクト細胞が作製される工程であって、そのポリヌクレオチドコンストラクトが；(i) ターゲティング配列；(ii) 調節配列

50

またはコード配列；(i i i) 必要な場合には、不对のスプライスドナー部位；を含む工程と、(b) 相同的組換えに適した条件下にて、インビトロまたはインビボで移入細胞を維持する工程と、を含む。

【 0 2 7 2 】

本発明はさらに、インビトロまたはインビボで細胞において標的遺伝子の発現を変化させる方法であって、(a) インビトロまたはインビボで細胞にポリヌクレオチドコンストラクトをトランスフェクトし、その結果、トランスフェクト細胞が作製される工程であって、そのポリヌクレオチドコンストラクトが；(i) ターゲティング配列；(i i) 調節配列またはコード配列；(i i i) 必要な場合には、不对のスプライスドナー部位；を含む工程と、(b) 相同的組換えに適した条件下にて、インビトロまたはインビボでトランスフェクト細胞を維持する工程と、(c) 遺伝子の発現に適した条件下にて、インビトロまたはインビボで相同的組換え細胞を維持する工程とを含む方法に関する。

10

【 0 2 7 3 】

本発明はさらに、インビトロまたはインビボで細胞において、通常その細胞で発現されない標的内因性遺伝子の発現を変化させることによって、本発明のポリペプチドを製造する方法であって：(a) インビトロで細胞にポリヌクレオチドコンストラクトをトランスフェクトし、その結果、トランスフェクト細胞が作製される工程であって、そのポリヌクレオチドコンストラクトが；(i) ターゲティング配列；(i i) 調節配列またはコード配列；(i i i) 必要な場合には、不对のスプライスドナー部位；を含む工程と、(b) 相同的組換えに適した条件下にて、インビトロまたはインビボでトランスフェクト細胞を維持する工程と、(c) 遺伝子の発現に適した条件下にて、インビトロまたはインビボで相同的組換え細胞を維持し、その結果、ポリペプチドが作製される工程とを含む方法に関する。

20

【 0 2 7 4 】

本発明はさらに、その遺伝子が通常発現されない、細胞型における標的遺伝子の発現を変化させるポリヌクレオチドコンストラクトに関する。これは、ポリヌクレオチドコンストラクトが標的細胞の染色体DNAに挿入された場合に生じ、そのポリヌクレオチドコンストラクトは：(a) ターゲティング配列；(b) 調節配列またはコード配列；(c) 必要な場合には、不对のスプライスドナー部位；を含む。上述のようなポリヌクレオチドコンストラクトがさらに包含され、そのコンストラクトはさらに、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、かつ染色体DNAとの相同的組換え後、標的内因性遺伝子とインフレームである。

30

【 0 2 7 5 】

当技術分野で公知の技術、例えば、米国特許第：6,054,288号；6,048,729号；6,048,724号；6,048,524号；5,994,127号；5,968,502号；5,965,125号；5,869,239号；5,817,789号；5,783,385号；5,733,761号；5,641,670号；5,580,734号；国際公開番号：W096/29411、W094/12650；およびKoller et al., (1994) Annu. Rev. Immunol. 10: 705-73により記述されている科学文献（そのそれぞれの開示内容全体が参照により組み込まれる）に記載の技術などによって、組成物が製造され、方法が行われる。

40

【 0 2 7 6 】

哺乳動物、通常ヒトの細胞におけるGZIPの発現は、欠損の状態にされるか、またはその代わりとして、GZIPゲノムもしくはcDNA配列の挿入で、本発明によるGZIPポリヌクレオチドによる動物細胞のゲノム中のGZIP遺伝子対応物の置換で、高められる。これらの遺伝的改変は、既に述べられている特定のDNAコンストラクトを用いた相同的組換え現象によって生じる。

【 0 2 7 7 】

使用することができる宿主細胞の種類は、哺乳動物の接合体、例えばマウス接合体である。マウス接合体に、対象の精製DNA分子、例えば、10mMトリスHCl (pH 7 .

50

4)、100 mM NaClを含有する250 μ M EDTA、30 μ Mスペルミン、および70 μ Mスペルミジン中、BACインサートの場合には1 ng/ μ l - P1バクテリオファージインサートの場合には3 ng/ μ lの濃度範囲に予め調節された精製DNA分子が微量注入される。微量注入されるDNAが大きなサイズである場合、このDNAの機械的な破損を避けるために、Schedl et al. (1993) Nature Mar 18; 362 (6417): 258-61)によって述べられているように、ポリアミンおよび高い塩濃度が用いられる。

【0278】

本明細書に記載のDNAコンストラクトを含む、本発明のポリヌクレオチドのいずれか1つが、胚幹(ES)細胞系、好ましくはマウスES細胞系に導入される。ES細胞系は、着床前胚盤胞の内部細胞塊の多能性、中立の細胞に由来する。好ましいES細胞系は、以下の: ES-E14TG2a(ATCC番号CRL-1821)、ES-D3(ATCC番号CRL1934および番号CRL-11632)、YS001(ATCC番号CRL-11776)、36.5(ATCC番号CRL-11116)である。中立状態でES細胞を維持するために、この胚の表現型を保存し、かつES細胞接着のマトリックスとして働くように、適切なシグナルを提供する成長抑制フィーダー細胞の存在下でそれらを培養する。好ましいフィーダー細胞は、実質的にいずれかのマウス株の13日~14日目の胚の組織から確立され、Abbondanzo et al. (1993; Methods Enzymol; 225: 803-23)によって記述されているように、培養状態で維持され、かつRobertson (1987) Embryo-derived Embryo-derived stem lines. In: E. J. Robertson Ed. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach. IRL Press, Oxford)によって記述されているように照射によって、またはPease and Williams (1990; Exp Cell Res. Oct; 190 (2): 209-11)によって記述されているようにLIFの抑制濃度の存在によって成長を抑制されている、一次胚線維芽細胞である。

【0279】

宿主細胞中のコンストラクトを従来の方法で使用して、組換え配列によってコードされる遺伝子産物を作製することができる。

【0280】

適切な宿主を形質転換し、その宿主を適切な細胞密度に成長させた後、選択されたプロモーターは、温度シフトまたは化学的誘導などの適切な手段によって誘導され、細胞はさらなる期間培養される。細胞は通常、遠心分離によって収集され、物理的もしくは化学的手段によって破壊され、得られた粗抽出物は、さらに精製するために保持される。タンパク質の発現で用いられる微生物細胞は、凍結融解サイクル、音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む、いずれかの簡便な方法によって破壊することができる。かかる方法は当業者によく知られている。

IV. 遺伝子導入動物

本発明は、本発明の組換えGZIPポリペプチドを発現する、非ヒト動物および植物を作製する方法および組成物もまた提供する。その動物または植物は、遺伝子導入動物または遺伝子導入植物であることが可能であり、すなわちそれらの細胞それぞれが、GZIPポリペプチドをコードする遺伝子を含有するか、またはその代わりとして、GZIPポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、動物または植物の体細胞に、例えば哺乳動物の乳腺分泌上皮細胞に導入することができる。好ましい実施形態において、非ヒト動物は、雌ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、またはウサギなどの哺乳動物である。

【0281】

哺乳動物などの遺伝子導入動物を作製する方法は当業者にはよく知られており、かかる方法は本発明で使用するすることができる。簡単に言えば、遺伝子導入動物は、例えば、対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをES細胞などの多能性幹細胞にトランスフェクトすることによって作製することができる。次いで、形質転換ES細胞は、同じ種類の哺乳動物の子宮に次いで移植される初期胚にうまく導入することができる。特定のケースでは、形質転換(「遺伝子導入」)細胞は、得られた動物の生殖細胞系の一部を含み、生殖細胞系中の遺伝子導入細胞を含む成体の動物を次いで、他の動物と交配させて、そ

の結果、それらの細胞のそれぞれにおける導入遺伝子を有する遺伝子導入動物の集団が最終的に作製され、導入遺伝子をそれらの子孫それぞれに安定的に伝達することができる。ポリヌクレオチドを導入する他の方法、例えば、対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを微量注入により受精卵または初期胚に導入する方法を用いることができる。代替方法としては、導入遺伝子を含有するレトロウイルスに接合体を感染させることによって、導入遺伝子を動物に導入することが可能である(Jaenisch, R. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73,1260-1264)。遺伝子導入哺乳動物を作製する方法は、例えば、Wall et al. (1992) J Cell Biochem 1992 Jun; 49 (2): 113-20; Hogan, et al. (1986) in Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; WO 9 1 / 0 8 2 1 6、または米国特許第 4 , 7 3 6 , 8 6 6 号に記載されている。

【 0 2 8 2 】

好ましい方法において、ポリヌクレオチドは、受精卵母細胞に微量注入される。通常、受精卵母細胞は、標準技術を用いて微量注入され、次いで、「着床前胚」が得られるまで、インビトロで培養される。かかる着床前胚は、約 1 6 ~ 1 5 0 個の細胞を含有することが好ましい。着床前期まで受精卵母細胞を培養する方法は、例えば、Gordon, et al. ((1984) Methods in Enzymology, 101, 414); Hogan, et al. ((1986) in Manipulating the mouse embryo, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y (マウス胚について)); Hammer, et al. ((1985) Nature, 315,680 (ウサギおよびブタの胚について)); Gandolfi, et al. ((1987) J. Reprod. Fert. 81,23 -28); Rexroad, et al. ((1988) J. Anim. Sci. 66,947-953) (ヒツジの胚について)); およびEyestone, et al. ((1989) J. Reprod. Fert. 85,715-720); Camous et al. ((1984) J. Reprod. Fert. 72, 779-785); およびHeyman, et al. ((1987) Theriogenology 27,5968 (ウシの胚について))に記述されており、それらの開示内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。次いで、標準法によって着床前胚を適切なメスに導入し、導入遺伝子が導入される際の発育工程に応じて、遺伝子導入またはキメラ動物を誕生させることが可能となる。

【 0 2 8 3 】

導入遺伝子の組込みの頻度が低い場合が多いことから、着床前胚における導入遺伝子組込みの検出を、本明細書に記載の方法のいずれかを用いて行うことが望ましい場合が多い。数多くの方法のいずれかを用いて、着床前胚における導入遺伝子の存在を検出することができる。例えば、着床前胚から 1 種または複数種の細胞を除去し、除去した細胞 (1 種または複数種) における導入遺伝子の有無を、いずれかの標準法、例えば P C R を用いて検出することができる。代替方法としては、導入遺伝子の存在は、子宮中で、または分娩後に、標準法を用いて検出することができる。

【 0 2 8 4 】

本発明の特に好ましい実施形態において、それらの乳中に組換え G Z I P ポリペプチドを分泌する遺伝子導入哺乳動物が作製される。乳腺は非常に効率的にタンパク質を産生する器官であることから、かかる方法を用いて、グラム / リットルの範囲内の濃度で、しばしばそれより有意に高い濃度でタンパク質を産生することができる。乳腺中での発現は、G Z I P ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを乳腺特異的なプロモーターおよび任意に他の調節因子に作動可能に連結することによって達成されることが好ましい。適切なプロモーターおよび他の因子としては、限定されないが、哺乳動物の短いおよび長い W A P 、 、 および 、カゼイン、 および ラクトグロブリン、 - C N 5 ' 遺伝子に由来するもの、ならびにマウス乳癌ウイルス (M M T V) プロモーターなどが挙げられる。かかるプロモーターおよび他の因子は、限定されないが、雌ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウサギ、およびモルモットなどのいずれかの哺乳動物に由来するものである。プロモーターおよび他の調節配列、ベクターおよび他の関連する教示は、例えば、Clark (1998) J Mammary Gland Biol Neoplasia 3: 337-50 ; Jost et al. (1999) Nat. Biotechnol 17: 160-4; 米国特許第 5 , 9 9 4 , 6 1 6 号 ; 6 , 1 4 0 , 5 5 2 号 ; 6 , 0 1

10

20

30

40

50

3, 857号; Sohn et al. (1999) DNA Cell Biol. 18: 845-52; Kim et al. (1999) J. Biochem. (Japan) 126: 320-5; Soulier et al. (1999) Euro. J. Biochem. 260: 533-9; Zhang et al. (1997) Chin. J. Biotech. 13: 271-6; Rijnkels et al. (1998) Transgen. Res. 7: 5-14; Korhonen et al. (1997) Euro. J. Biochem. 245: 482-9; Uusi-Oukari et al. (1997) Transgen. Res. 6: 75-84; Hitchin et al. (1996) Prot. Expr. Purif. 7: 247-52; Platenburg et al. (1994) Transgen. Res. 3: 99-108; Heng-Cherl et al. (1993) Animal Biotech. 4: 89-107; および Christa et al. (2000) Euro. J. Biochem. 267: 1665-71によって提供されており、それぞれの開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0285】

その他の実施形態では、本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをインビボで乳腺の体細胞中に、例えば、プラスミドDNAは、例えばDEAE-デキストランと結合して(例えば、Hens, et al. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1523: 161-171参照)、コンストラクトの受容体仲介エンドサイトーシスを導くことができるリガンドと結合して(例えば、Sobolev, et al. (1998) 273: 7928-33参照)、またはレトロウイルスベクターなどのウイルスベクター、例えばテナガザル白血病ウイルス中で(例えば、Archer, et al. (1994) PNAS 91: 6840-6844)参照)、乳頭管を通して注入することができる。これらの実施形態のいずれかにおいて、ポリヌクレオチドは、上述のように乳腺特異的なプロモーターに作動可能に連結するか、またはその代わりとして、CMVまたはMoMLV LTRなどの強く発現するいずれかのプロモーターに作動可能に連結することができる。

【0286】

本発明において使用される、いずれかのベクター、プロモーター、調節因子等の適性は、哺乳動物上皮細胞、例えばMacT細胞(ウシの哺乳動物上皮細胞)またはGME細胞(ヤギの哺乳動物上皮細胞)などの細胞をインビトロでトランスフェクトし、細胞中の導入遺伝子のトランスフェクションおよび発現の効率を評価することによって事前に評価することができる。

【0287】

インビボでの投与では、ポリヌクレオチドは、いずれかの適切な剤形で、いずれかの濃度範囲で(例えば、1~500 µg/ml、好ましくは50~100 µg/ml)、いずれかの容量(例えば1~100 ml、1~20 ml)で投与され、任意の回数(例えば、1、2、3、5、または10回)、任意の頻度(例えば、1、2、3、5、10日または任意の日数ごと)に投与される。適切な投与濃度、投与頻度、投与方法等は、特定のポリヌクレオチド、ベクター、動物等に応じて異なり、当業者によって容易に決定することができる。

【0288】

好ましい実施形態において、Archer et al. ((1994) PNAS 91: 6840-6844)に記載のように、テナガザル白血病ウイルスベクターなどのレトロウイルスベクターが用いられる。レトロウイルス感染には通常、細胞分裂が必要であり、乳腺における細胞分裂は、安息香酸エストラジオール、プロゲステロン、レセルピン、またはデキサメタゾンなどの因子を用いて、ベクターの投与と組み合わせて促進することができる。さらに、感染のレトロウイルスによる方法および他の方法は、ポリブレンなどのアクセサリー(accessory)化合物を用いて容易にすることができる。

【0289】

乳からGZIPポリペプチドを得るための本明細書に記載の方法のいずれかにおいて、得られる乳の量、その結果産生されるGZIPポリペプチドの量は、例えばヘキセストロール、エストロゲン、またはプロゲステロンを用いた、泌乳誘発(lactation induction)のいずれかの標準法によって高めることができる。

【0290】

かかる実施形態で使用されるポリヌクレオチドは、完全長GZIPポリペプチドまたは

GZIP断片をコードする。通常、コードされるポリペプチドは、乳中へのタンパク質の分泌を確実にする、シグナル配列を含むだろう。完全長GZIP配列が用いられる場合、完全長タンパク質は例えば、乳から単離し、適切なプロテアーゼを用いてインビトロで切断することができる。代替方法としては、プロテアーゼをコードする第2ポリヌクレオチドを動物に、または乳腺細胞に導入することができ、それによって、プロテアーゼが発現した結果、GZIPポリペプチドがインビボで切断され、そのため、乳からGZIP断片を直接単離することが可能となる。

V. 本発明の薬学的または生理学的に許容される組成物

本発明のGZIPポリペプチドは、非ヒト動物またはヒトに、単独で、またはそれらが適切な担体または賦形剤（1種または複数種）と混合される、薬学的または生理学的に許容される組成物中で、投与することができる。次いで、薬学的または生理学的に許容される組成物は、治療上有効な用量で提供される。治療上有効な用量とは、本明細書に記載の方法によって決定される代謝関連疾患または障害の症状または生理学的状態を予防または改善するのに十分なGZIPポリペプチドの量を意味する。治療上有効な用量とは、美容的理由のためにこの効果を望むヒトにおける体重の減少に、または体重の増加の予防に、または体重増加速度の増加の予防に必要なGZIPポリペプチドの量も意味し得る。本発明のGZIPポリペプチドの治療上有効な用量は、連続的な定期的な使用または投与で体重減少または体重増加を促進するのに適切である用量である。GZIPポリペプチドの調合および投与の技術は、"Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, latest editionに記載されている。

【0291】

本発明のGZIPポリペプチドを用いて、治療または予防することが可能な他の疾患または障害としては、限定されないが、肥満症および肥満症関連疾患および障害、例えば肥満症、耐糖能障害、インスリン抵抗性、アテローム性動脈硬化症、アテローム性疾患、心疾患、高血圧症、脳卒中、X症候群、インスリン非依存性糖尿病（NIDDMまたはII型糖尿病）およびインスリン依存性糖尿病（IDDMまたはI型糖尿病）が挙げられる。本発明の方法によって治療される糖尿病関連合併症としては、微小血管障害、眼球病変、網膜症、神経障害、腎臓障害が挙げられる。心疾患としては、限定されないが、心不全、冠状動脈不、および高血圧症が挙げられる。本発明の化合物によって治療される、他の肥満症関連障害としては、高脂質血症および高尿酸血症が挙げられる。本発明のさらに他の肥満症関連疾患または障害には、悪液質、るいそう、AIDSに関連する体重減少、癌に関連する体重減少、食欲不振および食欲亢進が挙げられる。GZIPポリペプチドを用いて、作業または運動中の身体的機能を高める、または一般的な快適さの感情を高めることもできる。身体的機能活動には、歩行、ジャンプ、持ち上げまたは登ることが含まれる。

【0292】

GZIPポリペプチドまたはそのアンタゴニストを用いて、失読症、注意欠陥障害（ADD）、注意欠陥多動障害（ADHD）、および精神分裂病などの精神疾患を、脂肪酸代謝、さらに詳細には特定の長鎖多価不飽和脂肪酸の生成を調節することによって治療することも可能である。

【0293】

本発明のGZIPポリペプチドが、単独で、または他の薬学的または生理学的に許容される化合物と組み合わせて提供することができることは明白に考えられる。肥満症および他の疾患および障害の治療に有用な他の化合物は現在、当技術分野でよく知られている。

【0294】

好ましい実施形態において、GZIPポリペプチドは、本明細書に記載されており、かつ当技術分野で公知の方法を用いたインスリン抵抗性および糖尿病の治療に有用であり、使用される。特に、好ましい実施形態は、動物またはヒトの対象においてグルコース代謝を治療的に変更および調節する方法であって、治療が必要な対象にGZIPポリペプチド（前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）を、前記動物またはヒト対象において血漿グルコースレベルを低減するのに十分な用量および期間で（その代わりとしては、

毎日定時に)投与することを含む方法に関する。

【0295】

さらなる好ましい実施形態は、治療が必要な対象にGZIPポリペプチド(前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)を、前記動物またはヒト対象において血漿グルコースレベルを低減するのに十分な用量および期間で(あるいは毎日定時に)投与することを含む、糖尿病を予防または治療する方法に関する。

投与経路

適切な投与経路としては、当技術分野で公知の方法を用いた、経口、経鼻、経直腸、経粘膜、または経腸投与、非経口送達、例えば筋肉内、皮下、髄内注入、ならびに髄腔内、直接的脳室内注入、静脈内、腹腔内、鼻腔内、肺内(吸入)または眼内注入が挙げられる。体重減少を促進する化合物を投与するのに特に有用な方法は、例えば、長期間にわたってGZIPポリペプチドを送達する装置をレシビエントの腹腔に外科的に埋め込むことを含む。他の特に好ましい投与経路は、エアロゾルおよび徐放性製剤である。発明された薬物の徐放性製剤、特にデポ製剤が特に企図される。

10

組成物/製剤

本発明に従って使用される、薬学的または生理学的に許容される組成物および薬剤は、賦形剤および補助剤を含む、1種または複数種の生理学的に許容される担体を用いて、従来の方法で製造することができる。適切な製剤は、選択される投与経路に依存する。

【0296】

本明細書に記載の特定の薬剤は、薬学的または生理学的に許容される担体と、本発明のGZIPポリペプチドである少なくとも1つのポリペプチドとを含有するだろう。関連する実施形態において、本明細書に記載の特定の薬物は、薬学的または生理学的に許容される担体と、GZIPポリペプチド、APM1ポリペプチド、インスリン、インスリン分泌促進薬およびインスリン感受性改善薬からなる群から選択される少なくとも1種類のポリペプチドと、を含むだろう。注入用には、本発明の作用物質は、水溶液、好ましくはハanks液、リンゲル液などの生理学的に適合性のバッファー、またはリン酸もしくは重炭酸バッファーなどの生理食塩水バッファー中で調合される。経粘膜投与に関しては、透過される特定のバリアに適した浸透剤が製剤に使用される。かかる浸透剤は一般に、当技術分野で公知である。

20

【0297】

経口で服用することができる薬学的または生理学的に許容される製剤は、ゼラチンで作られた押込み嵌め(push-fit)カプセル、ならびにゼラチンおよびグリセロールもしくはソルビトールなどの可塑剤で作られた密封軟カプセルを含む。押込み嵌めカプセルは、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤、またはタルクもしくはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、および任意に安定剤との混合物中に活性成分を含有し得る。軟カプセル中では、活性化合物は、脂肪油、液体パラフィン、もしくは液体ポリエチレングリコールなどの適切な液体中に溶解または懸濁される。さらに、安定剤を添加してもよい。経口投与用のすべての製剤は、かかる投与に適した用量であるべきである。

30

【0298】

口腔投与用に、その組成物は、従来の手法で調合される錠剤またはトローチ剤の形をとることが可能である。

40

【0299】

吸入による投与用に、本発明に従って使用される化合物は、適切な気体噴射剤、つまり二酸化炭素を使用して加圧したパックまたは噴霧器からエアゾールスプレー状で簡便に送達される。加圧されたエアゾールの場合には、用量単位は、計量された量を、送達する値を求めることによって決定される。化合物の粉末混合物およびラクトースもしくはデンプンなどの適切な粉末ベースを含有する、吸入器または注入器で使用する、例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジが配合される。化合物の粉末混合物およびラクトースもしくはデンプンなどの適切な粉末ベースを含有する、吸入器または注入器で使用する、例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジが配合される。

50

【0300】

その化合物は、注入、例えば静脈内ボラスもしくは持続注入による非経口投与用に配合することが可能である。注入用の製剤は、添加された保存剤と共に、単位用量の形で、例えばアンプルまたは多用量容器の形で提供される。その組成物は、水性媒体中の懸濁液、溶液または乳濁液としてかかる形状を取り、懸濁剤、安定剤または分散剤などの配合剤（formulatory agent）を含有することが可能である。

【0301】

非経口投与に用いられる薬学的または生理学的に許容される製剤は、水溶性状態の活性化合物の水溶液を含む。水性懸濁液は、カルボキシルメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランなどの懸濁液の粘度を高める物質を含有してもよい。任意に、懸濁液は、高濃度溶液の調製を可能とする、化合物の溶解性を増大する適切な安定剤または物質を含有することも可能である。

10

【0302】

あるいは、活性成分は、使用前に、発熱物質を含有しない滅菌水などの適切な媒体と構成するために粉末状または凍結乾燥状であることが可能である。

【0303】

前述の製剤の他に、その化合物はデポ製剤として配合することも可能である。かかる長時間作用性製剤は、埋め込み（例えば、皮下または筋肉内に）によって、または筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えばその化合物は、適切な高分子もしくは疎水性材料（例えば、許容可能なオイル中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂と、またはやや可溶性の誘導体、例えばやや可溶性の塩として配合することが可能である。

20

【0304】

さらに、その化合物は、治療薬を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスなどの徐放システムを用いて送達することが可能である。種々の徐放性材料が確立されており、当業者にはよく知られている。徐放性カプセルは、それらの化学的性質に応じて、数週間から100日を超える期間まで化合物を放出することができる。

【0305】

治療薬の化学的性質および生物学的安定性に応じて、タンパク質を安定化するための他の方法を用いることも可能である。

30

【0306】

その薬学的または生理学的に許容される組成物は、適切な固体もしくはゲル相の担体または賦形剤を含有してもよい。かかる担体または賦形剤の例には、限定されないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールなどのポリマーが含まれる。

有効用量

本発明で使用するのに適した、薬学的または生理学的に許容される組成物には、意図する目的を達成するのに有効な量で活性成分が含まれている組成物が含まれる。さらに詳細には、治療有効量とは、治療される対象の発症を予防する、または現在の症状を軽減するのに有効な量を意味する。有効量の決定は、特に本明細書に提供される詳細な開示内容に照らして、当業者の能力内に十分にある。

40

【0307】

本発明の方法において用いられるいずれかの化合物について、治療有効用量は、細胞培養アッセイから最初に推定することができる。例えば、用量を動物モデルにおいて表し、インビトロシステムにおいてレプチンもしくはリポタンパク質の取り込みまたは結合を増加することが示される濃度ポイントまたは範囲を含むまたは包含する循環濃度範囲を達成することができる。かかる情報を用いて、ヒトにおいて有用な用量をさらに正確に決定することができる。

【0308】

治療有効用量とは、患者において症状の改善をもたらす化合物の量を意味する。かかる

50

化合物の毒性および治療有効性は、例えばLD50（試験集団の50%に致死的な量）およびED50（集団の50%に治療上有効な用量）を決定するために、細胞培養または実験動物における標準製薬手順によって決定することができる。毒性作用と治療効果との用量比が治療指数であり、LD50とED50との比として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。

【0309】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトに使用するための投薬量の範囲を決定するのに使用することができる。かかる組成物に含まれる投薬量は、ほとんど、または全く毒性を持たないED50を含む循環濃度の範囲内であることが好ましい。その投薬量は、この範囲内で、用いられる剤形、および用いられる投与経路によって異なる。正確な配合、投与経路および投薬量は、患者の状態を考慮してそれぞれの医師によって選択することができる（例えば、Finglet al., 1975, 「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Ch. 1参照）。

【0310】

投薬量および投与の間隔は、特定の状況に応じて、体重減少もしくは増加を維持または予防するのに十分な、活性化合物の血漿レベルが得られるように、個々に調節することが可能である。これらの効果を達成するのに必要な投薬量は、個々の特性および投与経路によって異なるだろう。投与の間隔は、最小有効濃度の値を用いて決定することもできる。化合物は、その時点の10~90%、さらに好ましくは30~90%、さらに好ましくは50~90%の、最小有効濃度を超える血漿レベルを維持する投与計画を用いて投与すべきである。局所投与または選択的取り込みの場合には、薬物の有効な局所濃度は、血漿濃度と関連しない場合がある。

【0311】

投与される組成物の量は当然、治療される対象、対象の体重、疾患の重症度、投与方法および処方する医師の判断に依存するだろう。

【0312】

目的の結果を達成するために毎日または定期的に投与される、本発明のGZIPポリペプチドの量の好ましい投薬量範囲は、0.05~1.0mg/体重kgの範囲である。さらに好ましい投薬量範囲は、0.1~5mg/kgである。さらに好ましい用量は、0.25~2.5mg/kgである。当然のことながら、これらの1日量は、一日の間に一定間隔をあけて少量で送達または投与することができる。これらの投薬量範囲は単に好ましい範囲であり、本発明に制限的であることを意味するものではないことに留意されたい。

VI. 治療方法

本発明は、特に、代謝関連疾患および障害を予防または治療する方法であって、かかる治療の必要がある個体に本発明のGZIPポリペプチドを与えることを含む方法に関する。GZIPポリペプチドは、インビトロまたはインビボで代謝関連活性を有することが好ましい。GZIPポリペプチドは、経口で摂取されることが好ましい医薬組成物中で個体に与えられることが好ましい。その個体は、好ましくは哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。好ましい実施形態において、代謝関連疾患または障害は、アテローム性動脈硬化症、心血管疾患、耐糖能、インスリン抵抗性、高血圧症、脳卒中、X症候群、I型糖尿病、II型糖尿病および脂肪萎縮性糖尿病からなる群から選択される。本発明の方法によって治療される糖尿病関連合併症としては、微小血管障害、眼球病変、網膜症、神経障害、および腎臓障害が挙げられる。心疾患としては、限定されないが、心不全、冠状動脈不、および高血圧症が挙げられる。本発明の化合物によって治療される、他の代謝関連障害としては、高脂質血症、高トリグリセリド血症および高尿酸血症が挙げられる。本発明のさらに他の代謝関連疾患または障害には、悪液質、るいそう、AIDSに関連する体重減少、癌に関連する体重減少、新形成に関連する体重減少、食欲不振および食欲亢進が挙げられる。好ましい実施形態において、医薬組成物においてGZIPポリペプチドは、美容的理由から健康な個体の体重を調節するために使用される。

【0313】

本発明は、代謝関連疾患および障害を予防または治療する方法であって、かかる治療が必要な個体に、本発明のアクセシ（実施例における本発明の好ましい実施形態のセクションV Iに記載されている）により同定された化合物を投与することを含む方法も特徴とする。これらの化合物は、インビトロで細胞において、エキスピボで筋肉において、または動物モデルにおいて、G Z I Pポリペプチドの作用に拮抗作用または作動作用することが好ましい。その代わりとして、これらの化合物は、レプチンまたはリポタンパク質の取り込みまたは結合に対するG Z I Pポリペプチドの作用に拮抗作用または作動作用する。任意に、これらの化合物は、インビトロまたはインビボで、L S RとのG Z I Pポリペプチドの相互作用、結合、または取り込みを防ぐ。その化合物は、薬剤中で個体に投与されることが好ましい。個体は、好ましくは哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。好ましい実施形態において、代謝関連疾患または障害は、アテローム性動脈硬化症、心疾患、インスリン抵抗性、高血圧症、脳卒中、X症候群、I型糖尿病、II型糖尿病および脂肪萎縮性糖尿病からなる群から選択される。本発明の方法によって治療される糖尿病関連合併症としては、微小血管障害、眼球病変、網膜症、神経障害、および腎臓障害が挙げられる。心疾患としては、限定されないが、心不全、冠状動脈不、および高血圧症が挙げられる。本発明の化合物によって治療される、他の代謝関連障害としては、高脂質血症、高トリグリセリド血症および高尿酸血症が挙げられる。

10

【0314】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、インスリン治療と組み合わせて、一部の個体、特にI型糖尿病、II型糖尿病、またはインスリン抵抗性を有する個体において血中グルコースを調節する方法として用いることができる。

20

【0315】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、インスリン治療と組み合わせて、一部の個体、特にI型糖尿病、II型糖尿病、またはインスリン抵抗性を有する個体において体重を調節する方法として用いることができる。

【0316】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、インスリン治療と組み合わせることなく、単独で、一部の個体、特にI型糖尿病、II型糖尿病、またはインスリン抵抗性を有する個体において血中グルコースを調節する方法として用いることができる。

30

【0317】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本発明は、インスリン治療と組み合わせることなく、単独で、一部の個体、特にI型糖尿病、II型糖尿病、またはインスリン抵抗性を有する個体において体重を調節する方法として用いることができる。またさらなる好ましい実施形態では、体重の調節は、部分的または全体的に、a)皮下脂肪組織、またはb)内臓（大網）脂肪組織の量の減少によるものである。

【0318】

さらなる好ましい実施形態において、本発明は、インスリン分泌促進物薬またはインスリン感受性改善薬と組み合わせて、それらの体重またはグルコース制御を改善するために、一部の個体、特にI型糖尿病、II型糖尿病、またはインスリン抵抗性を有する個体において補足的治療に用いることができる。そのインスリン分泌促進薬は、1, 1-ジメチル-2-(2-モルホリノフェニル)グアニジンフマレート(BTS67582)、またはトルブタミド、トラザミド、クロルプロパミド、グリベンクラミド、グリメピリド、グリピジドおよびグリダジドから選択されるスルホニル尿素であることが好ましい。インスリン感受性改善薬は、メトホルミン、シグリタゾン、トログリタゾンおよびピオグリタゾンから選択されることが好ましい。

40

【0319】

50

本発明はさらに、インスリン分泌促進薬またはインスリン感受性改善薬なしで、単独で、一部の個体、特にⅠ型糖尿病、Ⅱ型糖尿病、またはインスリン抵抗性を有する個体の体重またはグルコース制御を改善する方法を提供する。

【0320】

さらなる好ましい実施形態において、本発明は、例えば同時に、別々に、もしくは逐次
に使用される個々の投与量単位の形でインスリン分泌促進薬またはインスリン感受性改善
薬と共に、付随的にまたは同時に投与される（分泌促進薬の前もしくは後、または感受性
改善薬の前もしくは後）。したがって、本発明はさらに、薬学的または生理学的に許容さ
れる組成物と、一部の個体、特にⅠ型糖尿病、Ⅱ型糖尿病、またはインスリン抵抗性を
有する個体の体重またはグルコース制御の改善のために、同時に、別々に、または逐次に
使用するための併用製剤（combined preparation）としての経口用インスリン分泌促進薬
またはインスリン感受性改善薬との組成物を提供する。

10

【0321】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の本
発明はさらに、インスリン感受性改善薬として使用する方法を提供する。

【0322】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の
本発明は、インスリン治療と組み合わせて、一部の個体、特にⅠ型糖尿病、Ⅱ型糖尿病
、またはインスリン抵抗性を有する個体においてインスリン感受性を改善する方法として
使用することができる。

20

【0323】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の
本発明は、インスリン治療と組み合わせることなく、一部の個体、特にⅠ型糖尿病、Ⅱ
型糖尿病、またはインスリン抵抗性を有する個体におけるインスリン感受性を改善する方
法として使用することができる。

【0324】

さらなる好ましい実施形態において、前記薬学的または生理学的に許容される組成物の
本発明はさらに、耐糖能障害からインスリン抵抗性への進行の抑制剤として使用する方
法を提供する。

VII. GZIP ポリペプチド活性の修飾因子を同定するためのアッセイ

30

本発明は、細胞におけるGZIPの活性を調節する1種または複数種の化合物について
スクリーニングする方法であって、細胞に対して試験される潜在的な化合物を提供するこ
とを含む方法の特徴とする。用いることができる例示的なアッセイが、実施例のセクショ
ンに記述されている。GZIPポリペプチドの単独での作用と比較して、それらの抑制ま
たは促進活性について試験される化合物がこれらのアッセイに加えられるだろう。GZIP
ポリペプチドの添加に基づいて作用が観察される、他のアッセイを用いて、GZIPポリ
ペプチド活性の修飾因子またはGZIPポリペプチドの存在の細胞への作用についてス
クリーニングすることもできる。必須の工程は、未知の化合物を適用し、GZIPポリペ
プチドのみが細胞に適用された場合に見られるものからの変化についてアッセイをモニタ
ーする工程である。その変化は、単独でのGZIPポリペプチド比較して、GZIPポリ
ペプチドに加えて化合物の存在下で有意に異なる何かとして定義される。この場合、有意
に異なるとは、測定可能な作用の、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%
、50%、55%、60%、65%、70%、または75%の「増加」または「減少」と
なるだろう。

40

【0325】

本明細書で使用される「調節（modulation）」という用語は、活性の測定可能な変化を
意味する。例としては、限定されないが、脂肪分解促進受容体（LSR）調節、レプチン
調節、リボタンパク質調節、血漿FFAレベル、FFA酸化、TGレベル、グルコースレ
ベル、および体重が挙げられる。これらの作用は、インビトロ、好ましくはインビボであ
り得る。活性の調節は、活性の増加または減少のいずれかである。このように、LSR活

50

性を減少または増加させること、レプチン活性を減少または増加させること、リポタンパク質活性を減少または増加させることができる。同様に、FFA、TG、グルコースレベルおよび体重は、インビボで増加または減少させることができる。遊離脂肪酸の酸化は、インビボまたはエクスピボで増加または減少させることができる。

【0326】

「LSR」活性とは、細胞表面上の、または特定のコンフォメーションにおけるLSRの発現、ならびにレプチンおよびリポタンパク質に結合し、それらを取り込み、分解するその能力を意味する。「レプチン」活性とは、LSRによるその結合、取り込みおよび分解、ならびに血液脳関門を通過するその輸送、およびLSRが必ずしも仲介因子ではない、または単なる仲介因子である場合の、潜在的なこれらの存在を意味する。同様に、「リポタンパク質」活性とは、LSRによるその結合、取り込みおよび分解、ならびにLSRが必ずしも仲介因子ではない、または単なる仲介因子である場合の、これらの存在を意味する。例示的なアッセイを実施例で示す。これらのアッセイおよび他の同等のアッセイを用いて、GZIPポリペプチド活性を調節する化合物を決定/同定することができる。場合によっては、好ましくはすべての活性が修飾されるが、GZIPポリペプチド活性のすべてではなく一部を調節する化合物を同定することが重要である場合がある。

10

【0327】

本明細書において使用される「増加(する)」という用語は、その非存在下でのGZIPポリペプチドの作用と比較される、測定可能な何らかの意味で、GZIPポリペプチドの活性を増加する化合物の能力を意味する。化合物が存在した結果として、レプチンの結合または取り込みが、例えばGZIPポリペプチド単独の存在下での制御と比較して増加し得る。活性の増加は、GZIPポリペプチドの存在下での活性レベルと比較して、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、または75%であることが好ましい。

20

【0328】

同様に、本明細書において使用される「減少(する)」という用語は、その非存在下でのGZIPポリペプチドの作用と比較される、測定可能な何らかの意味で、活性を減少させる化合物の能力を意味する。例えば、化合物が存在すると、マウスにおけるFFA、TG、およびグルコースの血漿濃度が減少する。化合物が存在した結果として、レプチンの結合または取り込みが、例えばGZIPポリペプチド単独の存在下での制御と比較して減少し得る。活性の減少は、GZIPポリペプチド単独の存在下での活性レベルと比較して、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、または75%であることが好ましい。

30

【0329】

本発明は、体重を減少させる必要のある個体において体重を減少させる潜在的化合物を同定する方法であって：a) GZIPポリペプチドおよび候補化合物と細胞を接触させる工程；b) LSR調節、レプチン調節、グルコース取り込みまたは酸化の増加、血中脂質またはトリグリセリドレベルの減少、リポタンパク質の結合、取り込みまたは分解の増加；FFA酸化の増加；からなる群から選択される結果を検出する工程；c) 前記結果が、前記細胞がGZIPポリペプチドのみと接触された場合の前記結果と異なる場合に、前記潜在的化合物が前記結果により同定される工程；を含む方法の特徴とする。

40

【0330】

代替方法としては、本発明は、体重を増加する必要のある個体において体重を増加させる潜在的化合物を同定する方法であって：a) GZIPポリペプチドおよび候補化合物と細胞を接触させる工程；b) LSR調節、レプチン調節、グルコース取り込みまたは酸化の減少、血中脂質またはトリグリセリドレベルの増加、リポタンパク質の結合、取り込みまたは分解の減少；FFA酸化の減少；からなる群から選択される結果を検出する工程；c) 前記結果が、前記細胞がGZIPポリペプチドのみと接触された場合の前記結果と異なる場合に、前記潜在的化合物が前記結果により同定される工程；を含む方法の特徴とする。

50

【0331】

さらに他の好ましい実施形態において、前記潜在的化合物は、ペプチド、ペプチドライブラリー、非ペプチドライブラリー、ペプチド、脂肪酸、リポタンパク質、薬物、抗体、小分子、プロテアーゼおよびプロテアーゼ阻害剤からなる群から選択される。

V I I I . エピトープおよび抗体の融合

本発明の好ましい実施形態は、エピトープ保有ポリペプチドおよびエピトープ保有ポリペプチド断片に関する。これらのエピトープは、「抗原エピトープ」または「抗原エピトープ」と「免疫原性エピトープ」の両方である。「免疫原性エピトープ」は、ポリペプチドが免疫原である場合、インビボで抗体応答を誘導するタンパク質の一部として定義される。一方、抗体が結合するポリペプチドの領域は、「抗原決定基」または「抗原エピトープ」として定義される。タンパク質の免疫原性エピトープの数は一般に、抗原エピトープの数よりも少ない。例えば、Geysen, et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 3998-4002参照のこと。特定のエピトープは免疫原性ではないが、それにもかかわらず、抗体をいずれかのエピトープに対してインビトロで作製することができることから、それは有用であることを特に留意のこと。

10

【0332】

エピトープは、エピトープに固有な空間的コンフォメーションにおいて3個と少ないアミノ酸を含み得る。一般に、エピトープは、少なくとも6個のかかるアミノ酸、さらにはしばしば、少なくとも8~10個のかかるアミノ酸からなる。好ましい実施形態では、抗原エピトープは、3~50の間のいずれかの整数個の、いくつかのアミノ酸を含む。エピトープとして機能する断片は、いずれかの従来手段によって作製することが可能である。例えば、Houghten, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5131-5135 (1985)、さらに米国特許第4,631,211号を参照のこと。免疫原性エピトープを構成するアミノ酸を決定する方法としては、X線結晶学、2次元核磁気共鳴、およびエピトープマッピング、例えばH. Mario Geysen et al. (1984) ; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81: 3998-4002; 国際公開番号: WO 84 / 03564 ; および国際公開番号: WO 84 / 03506 に記載のペプスカン (Pepscan) 法などが挙げられる。その他の例としては、Jameson and Wolf, Comp. Appl. Biosci. 4: 181-186 (1988)のアルゴリズムが挙げられる(前記参考文献はその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。Jameson-Wolf抗原解析は例えば、PROTEANコンピューター・プログラムを使用して、デフォルトパラメーター(Windows(登録商標)4.0, DNASTAR社(ウィスコンシン州マディソン, サウスパークストリート1228))を用いて行われる。

20

30

【0333】

本発明のエピトープ保有断片は、本発明のポリペプチドの6~50(つまり、6から50までの間のいずれかの整数)個のアミノ酸を含むことが好ましい。配列表の6の整数から完全長の配列までの抗原断片もまた、本発明に含まれる。6の整数から本発明のポリペプチドの完全長配列までの配列のすべての組み合わせが包含される。エピトープ保有断片は、隣接アミノ酸残基の数(亜属として)によって、または本発明のポリペプチドについて上述される特定のN末端およびC末端位置(種として)によって指定される。本発明の任意の数のエピトープ保有断片もまた、同じ方法で除外され得る。

40

【0334】

抗原エピトープは、例えば、エピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体を含む抗体を産生するのに有用である(Wilson et al., 1984 ; and Sutcliffe, J. G. et al., 1983参照)。次いで、その抗体は、本明細書に記載の診断および組織/細胞同定技術などの種々の技術において、および精製方法において使用される。

【0335】

同様に、当技術分野でよく知られている方法に従って、免疫原性エピトープを用いて、抗体を誘導することができる(Sutcliffe et al., supra; Wilson et al., supra; Chow, M. et al.; (1985) and Bittle, F. J. et al., (1985)参照)。好ましい免疫原性エピトープとしては、配列表のポリペプチドが挙げられる。免疫原性エピトープは、必要な

50

場合には、動物系（ウサギまたはマウスなど）に、アルブミンなどの担体タンパク質と共に提示される。8～10個と少ないアミノ酸を含む免疫原性エピトープが、最低限でも、変性ポリペプチドにおける線状エピトープに結合することができる抗体を産生するのに十分であることが示されている（例えば、ウエスタンブロット法において）。

【0336】

当技術分野でよく知られている方法、限定されないが、例えばインビボでの免疫化、インビトロでの免疫化、ファージディスプレイ法（例えば、上記のSutcliffe, et al.; 上記のWilson, et al.および上記のBittle, et al., 1985参照）などに従って、本発明のエピトープ保有ポリペプチドを使用して、抗体が誘導される。インビボ免疫化を用いる場合、動物を遊離ペプチドで免疫することができる；しかし、抗ペプチドの抗体価は、スカシガイヘモシアニン（KLH）または破傷風トキソイドなどの巨大分子担体にペプチドを結合することによって高められる。例えば、システイン残基を含有するペプチドが、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミエステル（MBS）などのリンカーを用いて担体に結合され、他のペプチドは、グルタルアルデヒドなどのさらに一般的な結合剤（linking agent）を用いて担体に結合される。ウサギ、ラットおよびマウスなどの動物が、例えば、ペプチドまたは担体タンパク質およびフロイントアジュバント約100 μgを含有するエマルジョンを腹腔内または皮内注射することによって、遊離もしくは担体結合ペプチドのいずれかで免疫される。例えば固体表面に吸着された遊離ペプチドを用いたELISAアッセイによって検出することができる、抗ペプチド抗体の有用な抗体価を得るために、例えば約2週間間隔に数回のブースター注射が必要とされる場合がある。免疫動物由来の血清中の抗ペプチド抗体の抗体価は、当技術分野でよく知られている方法に従って、抗ペプチド抗体の選択によって、例えば、固体担体上のペプチドへの吸着および選択された抗体の溶離によって高められる。

【0337】

当業者であれば、上述される本発明のポリペプチド、限定されないが、免疫原性または抗原エピトープを含むポリペプチドなどを、異種ポリペプチド配列に融合することができることは理解されよう。例えば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリンの一部を含む定常領域（IgA、IgE、IgG、IgM）、または定常領域の一部（CH1、CH2、CH3、全ドメインおよびその一部の両方を含むそのいずれかの組み合わせ）と融合することが可能であり、その結果キメラポリペプチドが生じる。これらの融合タンパク質は精製を容易にし、かつインビボで半減期の増加を示す。これは、例えば、ヒトCD4-ポリペプチドの最初の2つのドメインおよび哺乳動物免疫グロブリンの重鎖もしくは軽鎖の定常領域の種類のドメインからなるキメラタンパク質に関して示されている（EPA 0,394,827; Traunecker et al., 1988参照）。IgG部分のために、ジスルフィド結合二量体構造を有する融合タンパク質もまた、単量体ポリペプチドまたはその断片のみよりも、他の分子に結合および中和するのに効率的である（例えば、Fountoulakis et al., 1995参照）。上記エピトープをコードする核酸は、発現したポリペプチドの検出および精製において助けとなるエピトープタグとして、対象の遺伝子と再結合することもできる。

【0338】

本発明のその他の融合タンパク質は、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エクソンシャッフリング、またはコドンシャッフリングの技術によって作製することが可能である（総称して「DNAシャッフリング」と呼ばれる）。DNAシャッフリングを利用して、本発明のポリペプチドの活性を調節することが可能であり、それによって、ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストが効果的に作製される。例えば、米国特許第：5,605,793号；同第5,811,238号；同第5,834,252号；同第5,837,458号；およびPatten, P. A., et al., (1997); Harayama, S., (1998); Hansson, L. O., et al (1999); and Lorenzo, M. M. and Blasco, R., (1998)（これらの文献はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。一実施形態において、本発明のコードポリヌクレオチドの1つまたは複数の構成要素、モチーフ、セ

クション、部分、ドメイン、断片等、またはそれによってコードされるポリペプチドは、1種または複数種の異種分子の1つまたは複数の構成要素、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、断片等と再結合することができる。

抗体

本発明はさらに、本発明のペプチドに、さらに具体的には本発明のポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、抗体およびT細胞抗原受容体(TCR)に関する。本発明の抗体としては、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含む)、IgA(IgA1およびIgA2を含む)、IgD、IgE、またはIgM、およびIgYが挙げられる。本明細書で使用される「抗体」(Ab)という用語は、単鎖全抗体を含む全抗体、およびその抗原結合断片を包含することを意味するものである。好ましい実施形態において、抗体は本発明のヒト抗原結合抗体断片であり、限定されないが、Fab、Fab'F(ab)2およびF(ab')2、Fd、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、およびV_LもしくはV_Hドメインのいずれかを含む断片が含まれる。その抗体は、鳥類および哺乳動物を含むいずれかの動物に由来する抗体であることが可能である。その抗体は、ヒト、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリ由来の抗体であることが好ましい。

10

【0339】

単鎖抗体を含む抗原結合抗体断片は、単独で、または以下の：ヒンジ領域、CH1、CH2、およびCH3ドメインの全体または一部との組み合わせで、可変領域(1つまたは複数)を含み得る。可変領域(1つまたは複数)およびヒンジ領域、CH1、CH2、およびCH3ドメインのいずれかの組み合わせも、本発明に包含される。本発明はさらに、本発明のポリペプチドに特異的に結合するキメラ、ヒト化およびヒトモノクローナルおよびポリクローナル抗体を含む。本発明はさらに、本発明の抗体に対して抗イディオタイプの抗体を含む。

20

【0340】

本発明の抗体は、単一特異性、二重特異性、および三重特異性であるか、またはそれ以上の多重特異性を有することが可能である。多重特異性抗体は、本発明のポリペプチドの異なるエピトープに特異的であるか、または本発明のポリペプチドならびに異種組成物、例えば異種ポリペプチドまたは固体担体材料のどちらにも特異的であり得る。例えば、WO93/17715; WO92/08802; WO91/00360; WO92/05793; Tutt, et al., (1991); 米国特許第5,573,920号、同第4,474,893号、同第5,601,819号、同第4,714,681号、同第4,925,648号; Kostelny et al., (1992)を参照のこと。

30

【0341】

本発明の抗体は、抗体によって認識または特異的に結合される、本発明のポリペプチドのエピトープ(1種または複数種)またはエピトープ保有部分(1種または複数種)に関して記述されるか、または指定される。本発明のタンパク質、分泌タンパク質の場合には、その抗体は、本発明の核酸によってコードされる完全長タンパク質、本発明の核酸によってコードされる成熟タンパク質(つまり、シグナルペプチドの切断により産生されるタンパク質)、本発明の核酸によってコードされるシグナルペプチド、または本発明の他のいずれかのポリペプチドに特異的に結合することができる。したがって、エピトープ(1種または複数種)またはエピトープ保有部分(1種または複数種)は、本明細書に記載のように、例えばN末端およびC末端部分によって、隣接アミノ酸残基のサイズによって、またはそうでなければ本明細書において述べられるように指定される。本発明のいずれかのエピトープまたはポリペプチドに特異的に結合する抗体は、個々の種として除外される場合もある。したがって、本発明は、本発明の指定のポリペプチドに特異的に結合する抗体を包含し、その除外も考慮される。

40

【0342】

本発明の抗体は、それらの交叉反応性の面から説明または指定することが可能である。本発明のポリペプチドの他のいずれかの類似体、オルソログ、またはホモログに特異的に

50

結合しない抗体が包含される。本発明のポリペプチドと95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、50%未満の同一性（当技術分野で公知の方法および本明細書の記載の方法を用いて、例えば、FASTDBおよび本明細書に示されるパラメーターを用いて計算された）を有するポリペプチドに結合しない抗体もまた、本発明に包含される。厳密なハイブリダイゼーション条件（本明細書に記載の）下にて本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに単に結合する抗体が、本発明にさらに包含される。本発明の抗体はまた、それらの結合親和性に関して説明または指定される。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 、および 10^{-15}M 未満の解離定数または K_d を有するものが挙げられる。

10

【0343】

本発明の抗体は、限定されないが、本発明のポリペプチドを精製、検出、および標的化するための当技術分野で公知の方法、例えばインビトロおよびインビボ診断および治療法を含む用途を有する。例えば、その抗体は、生体試料において、本発明のポリペプチドのレベルを定性的かつ定量的に測定するイムノアッセイでの用途を有する（例えば、Harlow et al., 1988参照）。

【0344】

20

本発明の抗体は、単独で、または他の組成物と組み合わせて使用することができる。その抗体はさらに、NもしくはC末端で異種ポリペプチドに組換え融合するか、またはポリペプチドもしくは他の組成物に化学的に結合（共有結合および非共有結合を含む）することができる。例えば、本発明の抗体は、検出アッセイにおいて標識として有用な分子および異種ポリペプチド、薬物、または毒素などのエフェクター分子に組換え融合するか、または結合させることが可能である。例えば、WO 92 / 08495 ; WO 91 / 14438 ; WO 89 / 12624 ; 米国特許第5,314,995号 ; およびEP 0396387参照のこと。

【0345】

本発明の抗体は、当技術分野で公知の適切な方法によって作製することができる。例えば、本発明のポリペプチドまたはその抗原断片は、ポリクローナル抗体を含有する血清の生成を誘導するために、動物に投与することができる。本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術により作製された抗体に限定されない。「抗体」という用語は、少なくとも1つの結合ドメインで構成されるポリペプチドまたはポリペプチドの群を意味し、結合ドメインは抗体分子の可変ドメインの折り畳みから形成されて、抗原の抗原決定基の特徴に相補的な内部表面形状および電荷分布を有する三次元結合空間が形成され、それによって抗原との免疫反応が可能となる。「モノクローナル抗体」という用語は、真核生物の、原核生物のクローン、またはファージクローンを含む単一クローンから誘導される抗体を意味し、それが作製される方法を意味するものではない。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え、およびファージディスプレイ技術の使用を含む、当技術分野で公知の多種多様な技術を用いて作製することができる。

30

40

【0346】

ハイブリドーマ技術としては、当技術分野で公知の技術（例えば、Harlow et al. 1988 ; Hammerling, et al, 1981参照）（前記参考文献はその開示内容全体が参照により組み込まれる）が挙げられる。FabおよびF(ab')₂断片は、例えばハイブリドーマにより産生された抗体から、パパイン（Fab断片の作製のため）またはペプシン（F(ab')₂断片の作製のため）などの酵素を用いて、タンパク分解切断により作製することができる。

【0347】

代替方法としては、当技術分野で公知の方法を用いて、組換えDNA技術の適用によっ

50

て、または合成化学によって、本発明の抗体を作製することができる。例えば、本発明の抗体は、当技術分野で公知の種々のファージディスプレイ法を用いて作製することができる。ファージディスプレイ法において、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保持するファージ粒子表面上に、機能性抗体ドメインが提示される。目的の結合特性を有するファージが、抗原で、通常固体表面またはビーズに結合または捕捉された抗原で直接選択することによって、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から選択される。これらの方法で用いられるファージは通常、ファージ遺伝子ⅠⅠⅠまたは遺伝子ⅤⅠⅠⅠタンパク質に組換え融合される、F a b、F v、またはジスルフィド安定化F v抗体ドメインを有するf dおよびM 1 3などの繊維状ファージである。本発明の抗体を作製するために使用することができるファージディスプレイ法の例としては、Brinkman et al., (1995); Ames et al., (1995); Kettleborough et al., (1994); Persic et al., (1997); Burton, D. R. et al. (1994); P C T / G B 9 1 / 0 1 1 3 4 ; W O 9 0 / 0 2 8 0 9 ; W O 9 1 / 1 0 7 3 7 ; W O 9 2 / 0 1 0 4 7 ; W O 9 2 / 1 8 6 1 9 ; W O 9 3 / 1 1 2 3 6 ; W O 9 5 / 1 5 9 8 2 ; W O 9 5 / 2 0 4 0 1 ; および米国特許第 5 , 6 9 8 , 4 2 6、同第 5 , 2 2 3 , 4 0 9 号、同第 5 , 4 0 3 , 4 8 4 号、同第 5 , 5 8 0 , 7 1 7 号、同第 5 , 4 2 7 , 9 0 8 号、同第 5 , 7 5 0 , 7 5 3 号、同第 5 , 8 2 1 , 0 4 7 , 5 号、同第 5 7 1 , 6 9 8 号、同第 5 , 4 2 7 , 9 0 8 号、同第 5 , 5 1 6 , 6 3 7 号、同第 5 , 7 8 0 , 2 2 5 号、同第 5 , 6 5 8 , 7 2 7 号および同第 5 , 7 3 3 , 7 4 3 号に開示されている方法が挙げられる。

【 0 3 4 8 】

上記の参考文献に記載のように、ファージ選択後、ファージから抗体コード領域を単離し、それを用いて、ヒト抗体を含む全抗体、または他のいずれかの目的の抗原結合断片を作製することが可能であり、いずれかの目的の宿主、例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌などにおいて発現させることができる。例えば、W O 9 2 / 2 2 3 2 4 ; Mullinax et al., (1992); Sawai et al., (1995); Better et al., (1988) に開示されているような当技術分野で公知の方法を用いて、F a b、F a b ' F (a b) 2 および F (a b ') 2 断片を組換えにより作製する技術を利用することもできる。

【 0 3 4 9 】

単鎖F v および抗体を作製するために使用することができる技術の例としては、米国特許第 4 , 9 4 6 , 7 7 8 号、同第 5 , 2 5 8 , 4 9 8 号; Huston et al. (1991); Shu, L. et al. (1993); およびSkerra, A. et al. (1988)に記載の技術が挙げられる。ヒトにおける抗体のインビボでの使用およびインビトロ検出アッセイを含む一部の用途では、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を使用することが好ましい。キメラ抗体を作製する方法は、当技術分野で公知である。例えば、Morrison, (1985); Oi et al., (1986); Gillies, S. D. et al. (1989); および米国特許第 5 , 8 0 7 , 7 1 5 号を参照のこと。C D R グラフティング (E P 0 2 3 9 4 0 0 ; W O 9 1 / 0 9 9 6 7 ; 米国特許第 5 , 5 3 0 , 1 0 1 号; 同第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号)、ベニアリング (veneering) またはリサーフェシング (resurfacing) (E P 0 5 9 2 1 0 6 ; E P 0 5 1 9 5 9 6 ; Padlan E. A., (1991); Studnicka G.M. et al. (1994); Roguska M.A. et al. (1994))、チェーンシャッフリング (米国特許第 5 , 5 6 5 , 3 3 2 号) を含む様々な技術を用いて、抗体をヒト化することができる。ヒト抗体は、上述のファージディスプレイ法を含む、当技術分野で公知の様々な方法によって作製することができる。米国特許第 4 , 4 4 4 , 8 8 7 号、同第 4 , 7 1 6 , 1 1 1 号、同第 5 , 5 4 5 , 8 0 6 号、同第 5 , 8 1 4 , 3 1 8 号; W O 9 8 / 4 6 6 4 5 ; W O 9 8 / 5 0 4 3 3 ; W O 9 8 / 2 4 8 9 3 ; W O 9 6 / 3 4 0 9 6 ; W O 9 6 / 3 3 7 3 5 ; W O 9 1 / 1 0 7 4 1 を参照のこと (前記参考文献はその全体が参照により組み込まれる)。

【 0 3 5 0 】

ヒト抗体は、上述のファージディスプレイ法を含む、当技術分野で公知の様々な方法によって作製することができる。米国特許第 4 , 4 4 4 , 8 8 7 号、同第 4 , 7 1 6 , 1 1 1 号、同第 5 , 5 4 5 , 8 0 6 号、同第 5 , 8 1 4 , 3 1 8 号; W O 9 8 / 4 6 6 4 5 ;

WO 98 / 5 0 4 3 3 ; WO 98 / 2 4 8 9 3 ; WO 96 / 3 4 0 9 6 ; WO 96 / 3 3 7 3 5 ; および WO 91 / 1 0 7 4 1 を参照のこと。

【 0 3 5 1 】

本発明のポリペプチドに組換え融合される、または化学結合（共有および非共有結合のどちらも含む）される抗体がさらに、本発明に包含される。その抗体は、本発明のポリペプチド以外の抗原に特異的であってもよい。例えば、抗体を使用して、本発明のポリペプチドを特定の細胞表面受容体に特異的な抗体に融合または結合させることによって、インビトロまたはインビボで特定の細胞型に対して本発明のポリペプチドを標的化することが可能である。本発明のポリペプチドに融合または結合した抗体は、インビトロでの免疫アッセイおよび当技術分野で公知の方法を用いた精製法において使用することも可能である（例えば、上記のHarbor 等；WO 93 / 2 1 2 3 2 ；EP 0 4 3 9 0 9 5 ；Naramura, M. et al. (1994)；米国特許第5, 474, 981号；Gillies, S.O. et al. (1992)；Fell, H. Petal., 1991参照）。

10

【 0 3 5 2 】

本発明はさらに、可変領域以外の抗体ドメインに融合または結合した本発明のポリペプチドを含有する組成物を含む。例えば、本発明のポリペプチドは、抗体のFc領域、またはその一部に融合または結合することが可能である。本発明のポリペプチドに融合される抗体部分は、ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、または全ドメインもしくはその一部のいずれかの組み合わせを含む。本発明のポリペプチドを上記の抗体部分に融合または結合させて、ポリペプチドのインビボでの半減期を増大するか、あるいは当技術分野で公知の方法を用いた免疫アッセイで使用する事ができる。そのポリペプチドを上記の抗体部分に融合または結合させて、多量体を形成することも可能である。例えば、本発明のポリペプチドに融合されるFc部分は、Fc部分間のジスルフィド結合によって二量体を形成することができる。三量体以上の多量体形は、IgAおよびIgMの部分にポリペプチドを融合させることによって生成することができる。本発明のポリペプチドを抗体に融合または結合させる方法は、当技術分野では公知である。例えば、米国特許第5, 336, 603号、同第5, 622, 929号、同第5, 359, 046号、同第5, 349, 053号、同第5, 447, 851号、同第5, 112, 946号；EP 0 307 434、EP 0 367 166；WO 96 / 0 4 3 8 8、WO 91 / 0 6 5 7 0 ；Ashkenazi, A. et al. (1991)；Zheng, X.X. et al. (1995)；Vil, H. et al. (1992)を参照のこと。

20

30

【 0 3 5 3 】

本発明はさらに、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストとして作用する抗体に関する。例えば、本発明は、本発明のポリペプチドとの受容体／リガンド相互作用を一部または完全に阻害する抗体を含む。受容体特異的抗体およびリガンド特異的抗体のどちらも包含される。リガンド結合を妨げないが、受容体活性化を妨げる受容体特異的抗体が包含される。受容体活性化（つまり、シグナル伝達）は、本明細書に記述されるか、またはそうでなければ当技術分野で公知の技術によって決定することができる。リガンド結合および受容体活性化のどちらも妨げる受容体特異的抗体もまた包含される。同様に、リガンドに結合し、リガンドの受容体への結合を妨げる中和抗体、ならびにリガンドに結合し、それによって受容体活性化を妨げるが、リガンドが受容体に結合するのを妨げない抗体が包含される。受容体を活性化する抗体がさらに包含される。これらの抗体は、リガンドによって仲介される受容体活性化によって影響を受ける、すべてのまたはすべてとは限らない生物活性に対してアゴニストとして作用する。その抗体は、本明細書で開示される特定の活性を含む生物活性に対するアゴニストまたはアンタゴニストとして指定される。上記の抗体アゴニストは当技術分野で公知の方法を用いて作製することができる。例えば、WO 96 / 4 0 2 8 1 ；米国特許第5, 811, 097；Deng, B. et al. (1998)；Chen, Z. et al. (1998)；Harrop, J.A. et al. (1998)；Zhu, Z. et al. (1998)；Yoon, D.Y. et al. (1998)；Prat, M. et al. (1998)；Pitard, V. et al. (1997)；Liautard, J. et al. (1997)；Carlson, N.G. et al. (1997)；Taryman, R.E. et al. (1995)；M

40

50

uller, Y.A. et al. (1998); Bartunek, P. et al. (1996)を参照のこと。

【0354】

上述のように、本発明のポリペプチドの抗体は次に、当業者によく知られている技術を用いて本発明のポリペプチドを「模倣」する、抗イディオタイプ抗体を作製するのに使用することができる（例えば、GreenspanおよびBona, (1989); Nissinoff, (1991)参照）。例えば、本発明のポリペプチドに結合し、かつ本発明のポリペプチドのポリペプチド多重体化または本発明のポリペプチドのリガンドへの結合を競合的に抑制する抗体を使用して、ポリペプチド多重体化または結合ドメインを模倣し、結果として、ポリペプチドもしくはそのリガンドに結合かつ中和する抗イディオタイプを産生することができる。かかる中和抗イディオタイプ抗体を使用して、本発明のポリペプチドに結合させるか、またはそのリガンド/受容体に結合させて、それによってその生物活性をブロックすることができる。

10

【0355】

本発明は、本発明の突然変異完全長もしくは成熟ポリペプチドまたは突然変異ポリペプチドのエピトープを含むその断片または変異体に、特異的に結合することができる精製または単離抗体にも関する。他の好ましい実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドの少なくとも10個の連続するアミノ酸を含み、かつ突然変異を生じる形質によってコードされ得るアミノ酸の少なくとも1つを含むポリペプチドに結合することができる抗体に関する。

【0356】

20

野生型であろうと遺伝子導入動物であろうと、抗体結合が望まれるものと異なる種類の本発明のポリペプチドを発現する非ヒト動物または哺乳動物、および本発明のポリペプチドを発現しない動物（つまり、ノックアウト動物）は、特に抗体の作製に有用である。遺伝子ノックアウト動物は、本発明のポリペプチドの露出領域のすべてまたは大部分を外来抗原として認識し、したがってエピトープのより広いアレイを有する抗体を産生するであろう。さらに、わずか10～30個のアミノ酸を有する小さなポリペプチドが、本発明のポリペプチドのいずれか1つへの特異的な結合を得るのに有用である。さらに、抗原配列に類似する本発明のポリペプチドの種を産生する、動物の体液性免疫系は、動物の天然ポリペプチド種と抗原配列との間の差異を選択的に認識し、抗原配列におけるこれらの固有の部位に対して抗体を産生するだろう。かかる技術は、本発明のポリペプチドのいずれか1つに特異的に結合する抗体を得るのに、特に有用であるだろう。

30

【0357】

いずれかのプロトコルに従って作製される抗体は、生体試料における抗原保有物質の濃度を決定する、定量的イムノアッセイにおいて有用であり；それらは、生体試料における抗原の存在を同定するために半定量的または定性的にも使用される。その抗体は、タンパク質を発現する細胞を殺す、または体内におけるタンパク質のレベルを低減する、治療用組成物においても使用することができる。

【0358】

本発明の抗体は、当技術分野で公知の放射性標識、蛍光標識、または酵素標識のいずれか1つによって標識化することができる。

40

【0359】

その結果として、本発明は、本発明に従って、生体試料における本発明のポリペプチドの存在を特異的に検出する方法にも関し、前記方法は、以下の工程：

- a) 本発明のポリペプチドを含有すると思われる生体試料を入手する工程；
- b) 抗原 - 抗体結合に適切な条件下にて、その生体試料を、本発明のポリペプチドに特異的に結合するポリクローナルまたはモノクローナル抗体と接触させる工程；
- c) 形成された抗原 - 抗体複合体を検出する工程；を含む。

【0360】

本発明は、生体試料における本発明のポリペプチドの存在をインビトロで検出するための診断キットにも関し、前記キットは：

50

a) 本発明のポリペプチドに特異的に結合する、任意に標識されるポリクローナルまたはモノクローナル抗体；

b) 形成された抗原 - 抗体複合体の検出を可能にする試薬であって、任意に標識を有するか、または特に、上述のモノクローナルまたはポリクローナル抗体が単独で標識されていない場合に、標識化試薬によってそれ自体を認識することができる試薬；を備える。

A. ハイブリドーマ融合によるモノクローナル抗体の作製

上述のように同定かつ単離されるペプチドのいずれかのエピトープに対するモノクローナル抗体を、Kohler, G.およびMilstein, C., Nature 256: 495 (1975)の伝統的方法またはその派生的方法に従って、マウスハイブリドーマから作製することができる。簡潔には、数週間にわたって、それに由来する選択されたタンパク質またはペプチド数マイクログラムをマウスに繰り返し接種する。次いで、そのマウスを屠殺し、抗体を産生する脾臓細胞を単離する。ポリエチレングリコールを使用して、その脾臓細胞をマウス骨髄腫細胞と融合させ、融合していない余分な細胞を、アミノプテリンを含有する選択培地（HAT培地）上でその系の成長によって破壊する。うまく融合された細胞を希釈し、その希釈液のアリコートをし、培養物の成長が続けられるマイクロタイタープレートのウェルに入れる。抗体産生クローンは、最初にEngvall, E., Meth. Enzymol. 70: 419 (1980)によって記述されているようにELISAなどのイムノアッセイ法、およびその派生的方法によって、ウェルの上清液中の抗体を検出することによって同定される。選択されたポジティブクローンは拡大され、それらのモノクローナル抗体産物は、使用するために収集される。モノクローナル抗体作製の詳細な手順は、Davis, L. et al. Basic Methods in Molecular Biology Elsevier, New York. Section 21-2に記述されている。

【0361】

GZIPポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体が特に、本発明に含まれる。最も特に、配列番号：2の209～254、215～248、221～242位のアミノ酸、または配列番号：3の206～251、212～245、218～239位のアミノ酸を含むGZIPポリペプチド断片に特異的に結合するモノクローナル抗体が本発明に含まれる。さらに最も特に、配列番号：2の21～202、21～208位のアミノ酸、または配列番号：3の18～199、18～205位のアミノ酸を含むGZIPポリペプチド断片に特異的に結合するモノクローナル抗体が本発明に含まれる。

【0362】

さらに特に、APM1ポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体が本発明に含まれる。最も特に、配列番号：4の165～205、171～199、177～193、または179～190位のアミノ酸を含むAPM1ポリペプチド断片に特異的に結合するモノクローナル抗体が本発明に含まれる。さらに、配列番号：4の91～244、101～244または108～244位のアミノ酸を含む球状C1q相同性領域を含有するAPM1ポリペプチド断片に特異的に結合するモノクローナル抗体が最も特に好ましい。

B. 免疫化によるポリクローナル抗体の作製

未修飾であるか、または修飾して免疫原性を高めることができる、上述のそれに由来の発現タンパク質またはペプチドで適切な動物を免疫化することによって、単一タンパク質の異種性エピトープに対する抗体を含有するポリクローナル抗血清を作製することができる。有効なポリクローナル抗体の作製は、抗原および宿主種の両方に関係する多くの因子によって影響を受ける。例えば、小分子は他のものよりも免疫原性が低い傾向があり、担体およびアジュバントの使用が必要である。また、宿主動物は、接種部位および用量に応じて異なり、不適切な用量または過剰用量の抗原によって、血清の力価が低くなる。複数の皮内部位に投与された少用量（ngレベル）の抗原が、最も信頼性が高いと思われる。ウサギに関する有効な免疫化プロトコルが、Vaitukaitis, J. et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 988-991 (1971)に見出すことができる。

【0363】

一定間隔を空けてブースター注射をし、例えば抗原の既知濃度に対する寒天中での二重

免疫拡散によって半定量的に決定される、その抗体力価が下がり始めた時に、抗血清が収集される。例えば、Ouchterlony, O. et al., Chap. 19 in: Handbook of Experimental Immunology D. Wier (ed) Blackwell (1973)を参照のこと。抗体のプラトー濃度は通常、血清の $0.1 \sim 0.2 \text{ mg/ml}$ の範囲にある (約 $12 \mu\text{M}$)。抗原に対する抗血清の親和性は、例えばFisher, D., Chap. 42 in: Manual of Clinical Immunology, 2d Ed. (Rose and Friedman, Eds.) Amer. Soc. For Microbiol., Washington, D. C. (1980)に記述されているように、競合的結合曲線を作成することによって決定される。

【0364】

いずれかのプロトコルに従って作製された抗体製剤は、生体における抗原保有物質の濃度を決定する定量的イムノアッセイにおいて有用であり；それらはまた、生体試料における抗原の存在を同定するために半定量的または定性的に使用される。その抗体は、タンパク質を発現する細胞を殺すため、または体内のタンパク質レベルを低減するための治療用組成物において使用することも可能である。

【0365】

GZIPポリペプチドに特異的に結合するポリクローナル抗体も特に、本発明に包含される。最も特には、配列番号：2の209～254、215～248、221～242位のアミノ酸、または配列番号：3の206～251、212～245、218～239位のアミノ酸を含むGZIPポリペプチド断片に特異的に結合するポリクローナル抗体が本発明に包含される。さらに最も特には、配列番号：2の21～202、21～208位のアミノ酸、または配列番号：3の18～199、18～205位のアミノ酸を含むGZIPポリペプチド断片に特異的に結合するポリクローナル抗体が本発明に包含される。

【0366】

さらに特には、APM1ポリペプチドに特異的に結合するポリクローナル抗体が本発明に包含される。最も特には、配列番号：4の165～205、171～199、177～193、または179～190位のアミノ酸を含むAPM1ポリペプチド断片に特異的に結合するポリクローナル抗体が本発明に包含される。さらに、配列番号：4の91～244、101～244または108～244位のアミノ酸を含む球状C1q相同性領域を含有するAPM1ポリペプチド断片に特異的に結合するポリクローナル抗体が最も特に好ましい。

IX. GZIPに結合するAPM1のアンタゴニストを同定するためのアッセイ

本発明は、GZIPポリペプチド断片への、APM1ポリペプチドまたはポリペプチド断片の結合をブロックする1種または複数種のアンタゴニスト化合物についてスクリーニングする方法を特徴とする。好ましい前記APM1ポリペプチド断片は、APM1の球状C1q相同性領域のすべてまたは一部を含有する (国際公開番号：WO01/51645参照)。さらに好ましいAPM1ポリペプチド断片は、本発明のGZIPポリペプチドに特異的に結合する、配列番号：4の18～244、93～244、101～244または108～244位のアミノ酸を含む球状C1q相同性領域のすべてまたは一部を含有する前記APM1ポリペプチド断片である。好ましい前記GZIPポリペプチド断片は、シグナルペプチドを欠く成熟GZIPポリペプチドであり、シグナルペプチドを欠く前記成熟GZIPポリペプチドは、配列番号：2の21～298位のアミノ酸または配列番号：3の18～295位のアミノ酸を含む。

【0367】

好ましい前記化合物はポリペプチドである。

【0368】

他の好ましい前記化合物は、ポリペプチド断片である。好ましい前記ポリペプチド断片は、GZIPポリペプチド断片である。特に好ましい前記ポリペプチド断片は、配列番号：2の101～272、121～298、59～242、221～298、145～298、221～242、21～298、21～202、21～208、203～298、209～298、21～246、21～250位のアミノ酸、または配列番号：3の98～269、118～295、56～239、218～295、142～295、218～2

39、18～295、18～199、18～205、200～295、206～295、18～243、18～247位のアミノ酸を含む、GZIPポリペプチド断片である。他の好ましい前記ポリペプチド断片は、APM1ポリペプチド断片である。さらに特に好ましい断片は、配列番号：4の177～193または179～190位のアミノ酸を含むAPM1ポリペプチド断片である。

【0369】

他の好ましい前記化合物は、ペプチドである。

【0370】

他の好ましい前記化合物は、タンパク質である。

【0371】

他の好ましい前記化合物は、抗体である。好ましい前記抗体は、GZIPポリペプチドに特異的に結合する抗体である。特に好ましい抗体は、配列番号：2の221～242位のアミノ酸または配列番号：3の218～239位のアミノ酸で構成されるGZIPポリペプチド断片に特異的に結合する抗体である。他の好ましい前記抗体は、APM1ポリペプチドに特異的に結合する抗体である。さらに特に好ましい抗体は、配列番号：4の177～193位のアミノ酸で構成されるAPM1ポリペプチド断片に特異的に結合する抗体である。他の特に好ましい抗体は、配列番号4：の93～244、101～244または108～244位のアミノ酸で構成されるAPM1ポリペプチド断片に特異的に結合する抗体である。他の好ましい前記化合物は炭水化物である。他の好ましい前記化合物は脂質である。他の好ましい前記化合物は低分子量有機化合物である。他の好ましい前記化合物は低分子量無機化合物である。

【0372】

GZIPポリペプチド断片へのAPM1ポリペプチドまたはポリペプチド断片の結合をブロックする1種または複数種のアンタゴニスト化合物についてスクリーニングする前記方法の一例としては、酵素免疫測定法(ELISA)が挙げられ、その方法は、a)候補化合物と共に、またはなしに、固定化APM1ポリペプチドまたはポリペプチド断片をインキュベートし、それによって候補化合物と接触させる工程；b)前記候補化合物と接触されている前記固定化APM1ポリペプチドまたはポリペプチド断片を、さらにGZIPポリペプチド断片と接触させる工程；c)前記固定化APM1ポリペプチドまたはポリペプチド断片に結合されたGZIPポリペプチド断片を、ビオチン化抗GZIP抗体と接触させる工程；d)結合したビオチン化抗GZIP抗体を、ストレプトアビジン結合酵素と接触させる工程；e)結合したストレプトアビジン結合酵素を前記酵素の基質と接触させる工程であって、前記基質に対して前記酵素が作用した結果、色の変化が生じる工程；f)前記固定化APM1ポリペプチドまたはポリペプチド断片を前記化合物と共にインキュベートすると、色の変化の程度が低減されるかどうかの結果を検出し、前記結果から、前記化合物をアンタゴニストとして同定する工程；を含む。

【0373】

GZIPポリペプチド断片へのAPM1ポリペプチドまたはポリペプチド断片の結合をブロックする1種または複数種のアンタゴニスト化合物についてスクリーニングする前記方法の他の例としては、a)候補化合物と共に、またはなしに、固定化GZIPポリペプチド断片をインキュベートし、それによって候補化合物と接触させる工程；b)前記候補化合物と接触されている前記固定化GZIPポリペプチド断片を、さらにAPM1ポリペプチドまたはポリペプチド断片と接触させる工程；c)前記固定化GZIPポリペプチド断片に結合されたAPM1ポリペプチドまたはポリペプチド断片を、ビオチン化抗APM1抗体と接触させる(国際公開番号：WO01/51645参照)工程；d)結合したビオチン化抗APM1抗体を、ストレプトアビジン結合酵素と接触させる工程；e)結合したストレプトアビジン結合酵素を、前記酵素の基質と接触させる工程であって、前記基質に対して前記酵素が作用した結果、色の変化が生じる工程；f)前記固定化GZIPポリペプチド断片を前記化合物と共にインキュベートすると、色の変化の程度が低減されるかどうかの結果を検出し、前記結果から、前記化合物をアンタゴニストとして同定する工程

10

20

30

40

50

；を含む、酵素免疫測定法（E L I S A）が挙げられる。

【0374】

G Z I P ポリペプチド断片へのA P M 1 ポリペプチドまたはポリペプチド断片の結合をブロックする1種または複数種のアンタゴニスト化合物をE L I S Aによりスクリーニングする前記例は、当業者にはよく知られている。当業者であれば、G Z I P ポリペプチド断片へのA P M 1 ポリペプチドまたはポリペプチド断片の結合をブロックする1種または複数種のアンタゴニスト化合物についてスクリーニングするための代替のアッセイをさらに考案することができる。

X. G Z I P ポリペプチド断片によって現れる活性のアンタゴニストを同定するためのアッセイ

10

本発明は、G Z I P ポリペプチド断片によって現れる活性の1種または複数種のアンタゴニストについて化合物をスクリーニングする方法を特徴とし、前記活性は、限定されないが、脂質分配、脂質代謝、およびインスリン様活性から選択される。好ましい前記G Z I P ポリペプチド断片は、シグナルペプチドを欠く成熟G Z I P ポリペプチドであり、シグナルペプチドを欠く前記成熟G Z I P ポリペプチドは、配列番号：2の21～298位のアミノ酸または配列番号：3の18～295位のアミノ酸を含む。

【0375】

好ましい前記化合物はポリペプチドである。

【0376】

他の好ましい前記化合物はポリペプチド断片である。好ましい前記ポリペプチド断片はG Z I P ポリペプチド断片である。特に好ましい前記G Z I P ポリペプチド断片は、配列番号：2の101～272、121～298、59～242、221～298、145～298、221～242、21～298、21～202、21～208、203～298、209～298、21～246、21～250位のアミノ酸、または配列番号：3の98～269、118～295、56～239、218～295、142～295、218～239、18～295、18～199、18～205、200～295、206～295、18～243、18～247位のアミノ酸を含むG Z I P ポリペプチド断片である。

20

【0377】

他の好ましい前記化合物はペプチドである。

【0378】

他の好ましい前記化合物はタンパク質である。

30

【0379】

他の好ましい前記化合物は抗体である。好ましい前記抗体は、G Z I P ポリペプチドに特異的に結合する抗体である。特に好ましい前記抗体は、配列番号：2の221～242位のアミノ酸、または配列番号：3の218～239位のアミノ酸で構成されるG Z I P ポリペプチド断片に特異的に結合する抗体である。

【0380】

他の好ましい前記化合物は炭水化物である。

【0381】

他の好ましい前記化合物は脂質である。

40

【0382】

他の好ましい前記化合物は低分子量有機化合物である。

【0383】

他の好ましい前記化合物は低分子量無機化合物である。

【0384】

本発明はさらに、G Z I P ポリペプチド断片によって現れる活性の前記アンタゴニストについて化合物をスクリーニングする方法であって、a) 前記G Z I P ポリペプチド断片を前記化合物と接触させる、または前記化合物と接触させない工程；b) 活性に基づく結果を検出する工程であって、前記活性が、限定されないが、脂質分配、脂質代謝、およびインスリン様活性から選択される工程；c) 前記化合物を用いた前記結果が、前記化合物

50

を用いていない前記結果と対立するかどうかの前記結果から、前記化合物を前記アンタゴニストとして同定する工程；を含む、方法の特徴とする。用いることが可能な例示的なアッセイを実施例2および10に示す。

XI. GZIPポリペプチド断片とAPM1ポリペプチド断片との組み合わせによって現れる活性のアンタゴニストを同定するためのアッセイ

本発明は、GZIPポリペプチド断片とAPM1ポリペプチド断片との組み合わせによって現れる活性の1種または複数種のアンタゴニストについて化合物をスクリーニングする方法であって、前記活性が、限定されないが、脂質分配、脂質代謝、およびインスリン様活性から選択される方法の特徴とする。好ましい前記GZIPポリペプチド断片は、シグナルペプチドを欠く成熟GZIPポリペプチドであり、シグナルペプチドを欠く前記成熟GZIPポリペプチドは、配列番号：2の21～298位のアミノ酸、または配列番号：3の18～295位のアミノ酸を含む。

10

【0385】

好ましい前記APM1ポリペプチド断片は、APM1の球状C1q相同性領域で構成される。特に好ましい前記APM1ポリペプチド断片は、配列番号：4の101～244位のアミノ酸で構成される前記APM1ポリペプチド断片である。他の特に好ましい前記APM1ポリペプチド断片は、見掛け分子量27kDaを有する、血漿中の前記APM1ポリペプチド断片である（国際公開番号：WO01/51645）。

【0386】

好ましい前記化合物はポリペプチドである。

20

【0387】

他の好ましい前記化合物はポリペプチド断片である。好ましい前記ポリペプチド断片は、GZIPポリペプチド断片である。特に好ましい前記GZIPポリペプチド断片は、配列番号：2の101～272、121～298、59～242、221～298、145～298、221～242、21～298、21～202、21～208、203～298、209～298、21～246、21～250位のアミノ酸、または配列番号：3の98～269、118～295、56～239、218～295、142～295、218～239、18～295、18～199、18～205、200～295、206～295、18～243、18～247位のアミノ酸を含むGZIPポリペプチド断片である。他の好ましい前記ポリペプチド断片は、APM1ポリペプチド断片である。特に好ましい前記APM1ポリペプチド断片は、配列番号：4の177～193または179～190位のアミノ酸を含むAPM1ポリペプチド断片である。

30

【0388】

他の好ましい前記化合物はペプチドである。

【0389】

他の好ましい前記化合物はタンパク質である。

【0390】

他の好ましい前記化合物は抗体である。好ましい前記抗体は、GZIPポリペプチドに特異的に結合する抗体である。GZIPポリペプチド断片に特異的に結合する、特に好ましい前記抗体は、配列番号：2の221～242位のアミノ酸、または配列番号：3の218～239位のアミノ酸、または配列番号2：の21～202、21～208位のアミノ酸、または配列番号：3の18～199、18～205位のアミノ酸で構成されるGZIPポリペプチド断片に対して作られる前記抗体である。他の好ましい前記抗体は、APM1ポリペプチドに特異的に結合する抗体である。APM1に対して作られる、特に好ましい前記抗体は、配列番号：4の177～193位のアミノ酸で構成されるAPM1ポリペプチド断片に特異的に結合する前記抗体である。他の特に好ましい抗体は、配列番号：4の93～244、101～244または108～244位のアミノ酸で構成されるAPM1ポリペプチド断片に特異的に結合する抗体である。

40

【0391】

他の好ましい前記化合物は炭水化物である。

50

【0392】

他の好ましい前記化合物は脂質である。

【0393】

他の好ましい前記化合物は低分子量有機化合物である。

【0394】

他の好ましい前記化合物は低分子量無機化合物である。

【0395】

本発明はさらに、GZIPポリペプチド断片とAPM1ポリペプチド断片との組み合わせによって現れる前記アンタゴニスト活性について化合物をスクリーニングする方法であって、a) GZIPポリペプチド断片とAPM1ポリペプチド断片との前記組み合わせを前記化合物と接触させる、または接触させない工程；b) 活性に基づく結果を検出する工程であって、前記活性が、限定されないが、脂質分配、脂質代謝、およびインスリン様活性から選択される工程；c) 前記化合物を用いた前記結果が、前記化合物を用いていない前記結果と対立するかどうかの前記結果から、前記化合物を前記アンタゴニストとして同定する工程；を含む、方法の特徴とする。用いることが可能な例示的なアッセイを実施例2および10に示す。

10

【0396】

本発明の他の特徴および利点は、図および実施例の簡単な説明に記述されている。これらは、単に例示的なものであり、決して本発明を制限するものではない。本出願全体にわたり、種々の出版物、特許および公開特許出願が記載されている。本出願において参照される、これらの出版物、特許および公開特許明細書の開示内容は、本発明の開示内容に参照により組み込まれる。

20

【実施例】

【0397】

以下の実施例は、実例としての目的で記載するものであり、制限的な意味ではない。当業者であれば、そのすべてが本発明の一部を形成する、本明細書における開示内容に基づく同等のアッセイおよび方法を設計することができるだろう。

実施例1：GZIP DNAのノーザン分析

発達の異なる段階での、異なるヒト組織（成人および胎児の）および細胞系、ならびにマウス胚におけるGZIP発現の分析は、Clontech社から購入したポリA⁺RNAプロット（例えば、No. 7780-1、7757-1、7756-1、7768-1および7763-1）を使用することによって行われる。RNAプローブの標識化は、製造元の説明書の通りに、Ambion社から市販のRNAストリップ-EZキット（RNA Strip-EZ kit）を用いて行われる。RNAプロットとのRNAプローブのハイブリダイゼーションは、Ultraspeedハイブリダイゼーション溶液（Ambion社）を使用して行われる。

30

【0398】

簡単に言うと、プロットは、50（低い厳密度）または65（高い厳密度）で30分間プレハイブリダイズされる。標識プローブ（ 2×10^6 cpm/ml）を加えた後、プロットを一晩（14～24時間）ハイブリダイズし、 $2 \times$ SSC / 0.1% SDSで50にて2×20分間（低い厳密度）、 $1 \times$ SSC / 0.1% SDSで58にて2×20分間（中程度の厳密度）、 $1 \times$ SSC / 0.1% SDSで65にて2×20分間（高い厳密度）洗浄する。洗浄後、完了したプロットは、ホスホイメジャー（Phosphorimager）（分子動力学）に1～3日間かけられる。

40

実施例2：代謝関連活性のインビトロでの試験

GZIPポリペプチドの種々の製剤および種々の配列変異体の活性は、以下に示すアッセイを含む様々なインビトロアッセイを用いて評価される。これらのアッセイもまた、GZIPポリペプチドのアンタゴニストおよびアゴニストを作り出すために使用することができるアッセイの例である。それをするために、候補分子存在下での、上記のアッセイにおける、例えばレプチンまたはLSR活性に対するGZIPポリペプチドの効果は、候補

50

分子の非存在下での、アッセイにおけるGZIPポリペプチドの効果と比較されるだろう。GZIPポリペプチドは、高カフェテリア食 (high-cafeeteria diet) (実施例5) のマウスの体重を減少させると考えられることから、これらのアッセイは、体重を減少する (または増加する) 候補治療法を同定するのに役立つ。

肝細胞系:

LSRに対するGZIPポリペプチドの有効性の試験は、例えば、PLC細胞、Hep G2、およびHep3B (ヒト)、Hepa 1-6、BPRCL (マウス)、またはMCA-RH777、MCA-RH8994 (ラット) などの肝細胞系を用いて行うことができる。

【0399】

グルタミンおよびペニシリン - ストレプトマイシンを含有するDMEM (高グルコース) 中のBPRCLマウス肝細胞 (ATCCレポジトリ (Repository)) を、300,000細胞/ウェルの密度で6ウェルプレートにプレATINGする (0日目) (Bihain & Yen, 1992)。2日目に培地を取り替える。3日目に、コンフルエントな単層をリン酸緩衝液 (PBS、pH7.4) (2mL/ウェル) で1回洗浄する。0.2% (w/v) BSA、5mM Hepes、2mM CaCl₂、重炭酸ナトリウム3.7g/Lを含有するDMEM (pH7.5) 中で、増加する濃度の組換えAdipoQ (AQ) または球状AdipoQ (AQ-GH) と共に、細胞を37℃で30分間インキュベートする。¹²⁵I - マウスレブチン (比活性、22100cpm/ng) 10ng/mLを添加した後、インキュベーションを37℃で3時間続ける。0.2% BSAを含有するPBSで、単層を連続して2回洗浄し、続いてPBS/BSAで1回洗浄し、次いでPBSで連続して2回洗浄する。0.24mM EDTAを含有する0.1N NaOHで細胞を溶解する。ライセートをチューブに回収し、線計数器で計数する。

血液脳関門モデル:

脳に由来する細胞を使用して、脳におけるレブチン輸送に対するGZIPポリペプチドの効果を決めることができる。考えられる1つの方法は、Dehouck, et al (J Neurochem 54: 1798-801, 1990; 図、表、もしくは図面を含むその開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる) によって記述されている血液/脳関門モデルを使用する方法であって、脳の毛細管内皮細胞および星状膠細胞の共培養を用いて、LSRまたは他の受容体によるレブチン (または他の分子) 輸送に対するGZIPポリペプチドの効果を試験する方法である。

【0400】

このアッセイは、脳へのレブチン輸送に対するGZIPポリペプチドの潜在的な効果の指標となると考えられ、このアッセイを用いて、脳におけるLSRまたは他の受容体を介したレブチン輸送を調節するそれらの能力について、GZIPポリペプチド変異体をスクリーニングすることが可能である。さらに、LSRまたは他の受容体を介したレブチン輸送に対するGZIPポリペプチドの効果の、推定されるアゴニストおよびアンタゴニストもまた、このアッセイを用いてスクリーニングすることが可能である。血液/脳関門を通過するレブチンの輸送が増加すると、満腹因子としてのその作用がおそらく増加するだろう。

LSR発現のFACS解析

LSRに対するポリペプチドの効果は、抗LSR抗体および蛍光二次抗体を用いて、フローサーフェイスサイトメトリー (flow surface cytometry) により、細胞表面でのLSRの発現レベルを測定することによっても決定することができる。フローサイトメトリーは、生体粒子の特性を測定するために使用される、レーザーに基づく技術である。フローサイトメトリーの根本的な原理は、光を散乱し、励起源からの光が動いている粒子に当たると蛍光が発せられる。

【0401】

これは、GZIPポリペプチドおよび変異体ならびにGZIPポリペプチドの推定アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするために容易に適合させることができる

10

20

30

40

50

ハイスループットアッセイである。2種類のアッセイを以下に示す。抗体、細胞系およびGZIPポリペプチド類似体は、実験によって異なるだろうが、ヒト抗LSR抗体および球状APM1を用いて、ヒトを治療するために使用される変異体、アゴニスト、およびアンタゴニストについてスクリーニングすることができる。

アッセイ：1

収集およびFACSによる解析の前に、インタクトなGZIPポリペプチド（または未処理のGZIPポリペプチド）で細胞を前処理する。非酵素的解離溶液（Sigma社）を用いて細胞を収集し、次いで、1%（w/v）BSAを含有するPBS中の1：200希釈の抗LSR 81Bまたは無関係の抗血清と共に、4℃で1時間インキュベートする。同じバッファーで2回洗浄した後、ヤギの抗ウサギFITC結合抗体（Rockland社、ペンシルヴェニア州Gilbertsville）を細胞に添加し、4℃でさらに40分間インキュベートする。洗浄後、2%ホルマリン中に細胞を固定化する。フローサイトメトリー解析は、FACSSCALIBURサイトメーター（ベクトン・ディキンソン社、ニュージャージー州フランクリン・レイクス）で行う。

10

アッセイ：2

製造元の説明書に従って、解析前の48時間、細胞をT175フラスコ中で培養する。

【0402】

細胞をFACSバッファー（1×PBS/2%FBS、フィルター滅菌）で1回洗浄し、フラスコから手作業で取り出し、FACSバッファー10mLに入れる。その細胞浮遊液を15mLコニカルチューブに移し、4℃にて1200rpmで5分間遠心分離する。上清を捨て、4℃に冷却されたFACSバッファー10mLに再懸濁する。細胞の計数を行い、細胞密度をFACSバッファーで 1×10^6 細胞/mLの濃度に調節する。解析のために、細胞浮遊液1mLを48ウェルプレートの各ウェルに加える。4℃にて1200rpmで5分間、細胞を遠心分離する。プレートをチェックして、細胞がペレット化されているかを確認し、上清を除去し、プレートをボルテックスミキサーにかけることによって、細胞を再懸濁する。FACSバッファー1mLを各ウェルに添加し、続いて4℃にて1200rpmで5分間遠心分離する。記述されているこの細胞洗浄は、合計3回行った。

20

【0403】

適切な作業希釈（working dilution）（例えば、1：25、1：50、1：100、1：200、1：400、1：500、1：800、1：1000、1：2000、1：4000、1：5000、または1：10000）を決定するために、スクリーニング実験で力価測定された一次抗体を、全容積50μLのFACSバッファー中の細胞に添加する。プレートを4℃で1時間インキュベートし、光から保護する。インキュベーション後、上述のように細胞を3回洗浄する。適切な作業希釈（working dilution）（例えば、1：25、1：50、1：100、1：200、1：400、1：500、1：800、1：1000、1：2000、1：4000、1：5000、または1：10000）を決定するために、スクリーニング実験で力価測定された適切な二次抗体を、全容積50μLのFACSバッファー中の細胞に添加する。プレートを4℃で1時間インキュベートし、光から保護する。インキュベーション後、上述のように細胞を3回洗浄する。最後の洗浄が終わったら、細胞をFACSバッファー500μLに再懸濁し、FACS収集チューブに移す。光から保護された氷上に試料を置き、1時間以内に分析する。

30

40

蛍光顕微鏡検査法により検出されるGZIPポリペプチドの細胞結合および取り込み

濃度1mg/mLでのGZIPポリペプチド：精製GZIPタンパク質のフルオレセインイソチオシアネート（FITC）結合は、Sigma社のフルオロタグFITCコンジュゲーション・キット（FluoroTag FITC conjugation kit）（ストック番号FITC-1）を用いてFITCで標識化される。小規模の結合についてはSigma社の手引書に概説されているプロトコルが、GZIPタンパク質の標識化に従っている。

【0404】

細胞培養：C2C12マウス骨格筋細胞（ATCC、Manassas、VACRL

50

- 1772) および Hepa - 1 - 6 マウス肝細胞 (ATCC、Manassas、VACRL - 1830) を、 2×10^5 細胞 / ウェルの細胞密度で 6 ウェルプレート中に播種する。製造元の説明書に従って、C2C12 および Hepa - 1 - 6 細胞を、分析前の 24 ~ 48 時間培養する。細胞が 80 % コンフルエントな場合に、アッセイを行う。

【0405】

顕微鏡検査法を用いた、FTCC 標識化 GZIP タンパク質の細胞結合および取り込み：C2C12 および Hepa - 1 - 6 細胞を、ヒト LSR (81B：ヒト LSR の N 末端配列；マウス LSR および 93A と交差反応しない：C 末端配列はマウス LSR と交差反応する) に対して作られる抗体または gC1qr (953) に対する抗血清の存在 / 非存在下に、37、5 % CO₂ で 1 時間インキュベートする。2 μ g / mL の濃度で LSR 抗体を培地に添加する。抗 gC1qr 抗血清を、未希釈の血清 2.5 μ l の容積 (高濃度) で、または 1 : 100 の希釈 (低濃度) で培地に添加する。指定の抗体と共にインキュベートした後、FITC - GZIP ポリペプチド (50 nM / mL) を各細胞培養液に添加する。細胞を 37、5 % CO₂ で再び 1 時間インキュベートする。細胞を PBS で 2 回洗浄し、細胞をウェルから掻き取り、PBS 1 mL に加える。細胞浮遊液をエッペンドルフチューブに移し、1000 rpm で 2 分間遠心分離する。上清を除去し、PBS 200 μ l に細胞を再懸濁する。FITC - GZIP ポリペプチドの結合および取り込みは、40 倍の倍率で蛍光顕微鏡により分析される。

【0406】

このアッセイは、GZIP ポリペプチドの細胞への取り込みまたは結合を促進する、または防ぐ、作用物質を同定するのに有用であり得る。

リポタンパク受容体としての LSR に対する効果

LSR のリポタンパク質結合、取り込み (internalizing)、および分解活性に対する GZIP タンパク質の効果もまた、試験することができる。リポタンパク質受容体としての LSR の測定は、Bihain & Yen, (1992) Biochemistry May 19; 31 (19): 4628-36 (図、表、および図面を含む、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。LSR のリポタンパク質結合、取り込み、および分解活性に対する GZIP タンパク質の効果は、その他の対照として未処理細胞でのインタクトな GZIP タンパク質の効果と比較することができる。このアッセイを用いて、GZIP タンパク質の活性および抑制性変異体、ならびに代謝関連活性のアゴニストおよびアンタゴニストについてスクリーニングすることもできる。

【0407】

グルタミンおよびペニシリン - ストレプトマイシンを含有する DMEM (高グルコース) 中のヒト肝臓 PLC 細胞 (ATCC レポジトリ) を、300,000 細胞 / ウェルの密度で 6 ウェルプレートにプレATINGする (0 日目) (Bihain & Yen, 1992)。2 日目に培地を取り替える。3 日目に、コンフルエントな単層をリン酸緩衝液 (PBS、pH 7.4) (2 mL / ウェル) で 1 回洗浄する。0.2 % (w / v) BSA、5 mM Hepes、2 mM CaCl₂、重炭酸ナトリウム 3.7 g / L を含有する DMEM (pH 7.5) 中のヒト組換えレプチン 10 ng / mL と共に、細胞を 37 で 30 分間インキュベートし、続いて増加する濃度の GZIP ポリペプチドと共にさらに 30 分間インキュベートする。0.8 mM オレイン酸エステルおよび ¹²⁵I - LDL 20 μ g / mL を添加した後、インキュベーションを 37 で 3 時間続ける。0.2 % BSA を含有する PBS で、単層を連続して 2 回洗浄し、続いて PBS / BSA で 1 回洗浄し、次いで PBS で連続して 2 回洗浄する。¹²⁵I - LDL の、オレイン酸エステル誘導結合、取り込みおよび分解の量は、上述のように測定される (上記の Bihain & Yen, 1992)。3 回繰り返しの測定の平均として結果を示す。

【0408】

GZIP タンパク質の添加によって、リポタンパク質受容体としての LSR の活性が増加すると考えられる。LDL のオレイン酸エステル誘導結合、および取り込みは、分解と比較して、GZIP タンパク質によってさらに影響を受けると考えられるだろう。このよ

うに L S R 活性が増加すると、潜在的に、食後状態時のトリグリセリドリッチなリポタンパク質のクリアランスが上昇するだろう。このように、脂肪組織中に蓄積されるのではなく、肝臓によってさらなる食事脂肪が除去されるだろう。

【 0 4 0 9 】

このアッセイを用いて、L S R 活性（または他の受容体を介したリポタンパク質の取り込み、結合および分解）を増加または減少し、したがって、トリグリセリドリッチなリポタンパク質のクリアランス速度に影響を及ぼす化合物（またはアゴニストもしくはアンタゴニスト）の効率を決定することができる。

筋分化に対する効果

完全 D M E M（w / グルタミン、p e n / s t r e p 等）+ 1 0 % F C S 中の C 2 C 1 2 細胞（マウス骨格筋細胞系；A T C C C R L 1 7 7 2、メリーランド州ロックビル）を低密度（約 1 5 ~ 2 0 %）に播種する。2 日後、それらは 8 0 ~ 9 0 % コンフルエントとなる。この時点で、分化が可能となるように、培地を D M E M + 2 % ウマ血清に交換する。培地を毎日交換する。2 % ウマ血清中で 3 ~ 4 日後、大量の筋管形成が起こるが、C 2 C 1 2 分化の正確な時間経過は、特に、それらがどれくらいの期間継代されているか、およびどのように維持されているかに応じて異なる。

【 0 4 1 0 】

筋分化に対する G Z I P タンパク質の存在の効果を試験するために、細胞がまだ D M E M w / 1 0 % F C S 中にある場合に播種の翌日に、g A C R P 3 0（1 ~ 2 . 5 μ g / m L）を添加する。細胞をプレティングした 2 日後（g A C R P 3 0 を最初に添加して 1 日後）に、約 8 0 ~ 9 0 % コンフルエントで、培地を D M E M + 2 % ウマ血清 + g A C R P 3 0 に交換する。

筋細胞の脂肪酸酸化に対する効果

C 2 C 1 2 細胞を G Z I P タンパク質 2 μ g / m L の存在下または非存在下に 4 日間分化させる。4 日目に、オレイン酸エステルの酸化速度を、1 - 14 C - オレイン酸エステル（0 . 2 m M）から 14 C O₂ への転換を 9 0 分間測定することによって決定する。この実験を用いて、活性ポリペプチドおよびペプチドならびに G Z I P ポリペプチドのアゴニストもしくはアンタゴニストまたは活性化因子および阻害剤についてスクリーニングすることができる。

【 0 4 1 1 】

オレイン酸エステルの酸化速度に対する g A C R P 3 0 の効果を、分化 C 2 C 1 2 細胞（マウス骨格筋細胞；A T C C、M a n a s s a s、V A C R L - 1 7 7 2）および肝細胞系（H e p a 1 - 6；A T C C、M a n a s s a s、V A C R L - 1 8 3 0）において比較することができる。製造元の説明書に従って、培養細胞を維持する。オレイン酸エステルの酸化のアッセイは、上述のように行われる (Muoio et al (1999) Biochem J 338; 783-791)。簡単に言えば、ほぼコンフルエントな筋細胞を、低血清分化培地（D M E M、2 . 5 % ウマ血清）中で 4 日間維持し、その時点で筋管の形成が最大となった。1 0 % F C S が補充された同じ D M E M 培地中で肝細胞を 2 日間維持する。実験の 1 時間前に、培地を除去し、プレインキュベーション培地（M E M、2 . 5 % ウマ血清、3 m M グルコース、4 m M グルタミン、2 5 m M H e p e s、1 % F F A 不含 B S A、0 . 2 5 m M オレイン酸エステル、5 μ g / m L ゲンタマイシン）1 m L を添加する。酸化実験の初めに、 14 C - オレイン酸（1 μ C i / m L、ミズーリ州セントルイスの A m e r i c a n R a d i o l a b e l e d C h e m i c a l 社）を添加し、g A C R P 3 0 2 . 5 μ g / m L の存在 / 非存在下に 3 7 °C で、細胞を 9 0 分間インキュベートする。インキュベーション期間後、培地 0 . 7 5 m L を除去し、筋肉 F A A 酸化実験に関して以下に記述するように 14 C - 酸化生成物についてアッセイする。

培養細胞におけるオレイン酸エステルの酸化に続く、トリグリセリドおよびタンパク質の分析

オレイン酸エステル酸化アッセイのために培地を移した後、細胞を氷上に置く。トリグリセリドおよびタンパク質の含有率を決定するために、細胞を 1 m L の 1 x P B S で洗浄

10

20

30

40

50

し、残りの培地を除去する。細胞解離溶液 (Sigma 社) 300 μ L を各ウェルに添加し、37 で10分間インキュベートする。プレートを軽く叩き、細胞を離し、1 \times PBS 0.5 mL を添加した。細胞浮遊液をエッペンドルフチューブに移し、さらに0.5 mL の1 \times PBS で各ウェルをすすぎ、適切なエッペンドルフチューブに移す。試料を室温で1000 rpm にて10分間遠心分離する。上清を捨て、750 μ L の1 \times PBS / 2 % c h a p s を細胞ペレットに添加する。細胞浮遊液をボルテックスし、氷上に1時間置く。次いで、4 で13000 rpm にて試料を20分間遠心分離する。上清を新しいチューブに移し、分析するまで-20 で凍結しておく。各試料におけるトリグリセリドの定量的な測定値は、Sigma Diagnostics GPO-TRINDER enzymatic kit を用いて決定する。アッセイが48ウェルプレートで行われ、試料容積350 μ L がアッセイされ、コントロールブランクが350 μ L のPBS / 2 % c h a p s からなり、標準が、キットにおいて提供される標準10 μ L + 690 μ L のPBS / 2 % c h a p s を含有することを除いては、マニュアルに記載の手順に従う。試料の分析は、波長550 nm にてPackard Spectra Countで行われる。B C A タンパク質アッセイ (Pierce) を用いて、製造元の説明書に従って、各上清試料25 μ L でタンパク質の分析が行われる。試料の分析は、波長550 nm にてPackard Spectra Countで行われる。

10

筋細胞によるインビトロでのグルコース取り込み

L6筋細胞を、欧州菌株保存機関 (European Culture Collection) (ポートンダウン) から入手し、継代7~11で使用する。標準組織培養培地DME M中で細胞を維持し、前述のように、インスリン (10^{-8} M) の存在または非存在下にてGZIPポリペプチド断片と共に、またはなしに、[3 H] - 2 - デオキシグルコース (2DG) を用いて、グルコースの取り込みを評価する (Walker, P. S. et al. (1990))。L6筋細胞におけるグルコース輸送活性は、細胞下のグルコース輸送体分布、生合成、およびmRNA転写の協調的な制御によって調節される (その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、JBC 265 (3): 1516-1523; およびKilp, A. et al. (1992) Stimulation of hexose transport by metformin in L6 muscle cells in culture. Endocrinology 130 (5): 2535-2544) 。2DGの取り込みは、対照 (インスリンまたはGZIPポリペプチド断片を添加されていない) と比較した変化%として表される。値は、1実験につき4ウェルのセットの平均 \pm SEMとして示される。ウェルのセット間の差は、スチューデントt検定によって求められ、確率値 $p < 0.05$ が有意であると見なされる。

20

30

実施例3：高脂肪食を与えられたマウスに対するGZIPポリペプチドの効果

約6週齢のC57B1/6マウスを用いて、実験を行う (1グループにつき8匹)。すべてのマウスが個別に収容される。各実験全体にわたって、マウスに高脂肪食を与え続ける。その高脂肪食 (カフェテリア食; リサーチダイエット社からの市販のD12331) は以下の組成: タンパク質 kcal 16%, ショ糖 kcal 26%, 脂肪 kcal 58% を有する。脂肪は主に、硬化ヤシ油で構成される。

【0412】

マウスに高脂肪食を6日間与えた後、イソフルラン麻酔を用いて、マイクロ浸透圧ポンプを挿入し、それを用いて、完全長GZIPポリペプチド、GZIPポリペプチド断片、生理食塩水および無関係のペプチドをマウスに18日間皮下投与 (s.c.) する。100、50、25、および2.5 μ g / 日の用量でGZIPポリペプチドを投与し、10 μ g / 日で無関係のペプチドを投与する。高脂肪食を与えて1日目、3日目および5日目に体重を測定し、次いで、治療の開始後には毎日測定する。最終的な血液試料を心臓穿刺によって採取し、その試料を用いて、トリグリセリド (TG)、全コレステロール (TC)、グルコース、レプチン、およびインスリンレベルを決定する。1日あたりに摂取される食餌の量もまた、各グループに対して決定される。

40

実施例4：ヒトにおける代謝関連活性の試験

ヒトにおけるGZIPポリペプチの有効性についての試験を、医師の推薦および確立された指針に従って行う。マウスで試験されるパラメーターが、ヒトにおいても試験される

50

(例えば、食物摂取、体重、TG、TC、グルコース、インスリン、レプチン、FFA)。生理学的因子は短期間で変化を示すであろうことが予想される。体重増加の変化には、長い期間が必要とされる場合がある。さらに、食事制限(diet)は注意してモニターする必要があるだろう。GZIPポリペプチド、好ましくはC1q相同性領域を含むGZIPポリペプチドは、70kgのヒトに対してタンパク質約6mgの1日量または約10mg/日で投与されるだろう。他の用量、例えば1日につき1mgまたは5mgの用量、20mg、50mg、または100mg/日までの用量も、試験されるだろう。

実施例5：マウス脂肪萎縮性糖尿病モデルにおける代謝関連活性の試験

以前に、レプチンは、先天性リポジストロフィーを有するマウスにおいてインスリン抵抗性および糖尿病を転換することが報告された(Shimomura et al. Nature 401: 73-76 (1999); 図面、図、または表を含む、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)。レプチンは、脂肪萎縮性糖尿病のリポジストロフィーの異なるマウスモデルにおいて効果が低いことが見出された(Gavrilova et al Nature 403: 850 (2000); 図面、図または表を含む、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0413】

本発明は、このモデルにおいてインスリン抵抗性および高血糖を低減するための、単独での、またはレプチン、レプチンペプチド(米国特許仮出願第60/155,506号)もしくは他の化合物と組み合わせての、GZIPポリペプチドの使用を包含する。

【0414】

アッセイには、GZIPポリペプチドが、実施例3(または実施例6~8)に前述の方法を用いて投与されるであろうことを除いては、A-ZIP/F-1マウスを用いた、Gavrilova et al. (2000) Diabetes Nov; 49 (11): 1910-6; (2000) Nature Feb 24; 403 (6772): 850で既に述べられているアッセイが含まれる。マウスのグルコースおよびインスリンレベルが試験され、かつ食物摂取および肝臓重量がモニターされ、ならびに、レプチン、FFA、およびTGレベルなどの他の因子が通常、本発明者らの実験で測定されるだろう(上記の実施例3、または実施例6~8参照)。

実施例6：C57BL/6マウスにおける血漿遊離脂肪酸に対するGZIPポリペプチドの効果

正常なC57BL/6マウスにおける食後の脂肪血症(PPLE)に対するGZIPポリペプチドの効果を試験する。

【0415】

この実験に使用されるマウスは、実験前に2時間絶食させ、その後、基準(baseline)の血液試料を採取する。すべての血液試料が、EDTAコーティングされたキャピラリーチューブを用いて尾から採取される(各時点で50μL)。0時点(8:30AM)では、標準高脂肪食(バター6g、ヒマワリ油6g、脱脂粉乳10g、ショ糖10g、Nb番号6, JF, pg. 1に従って製造された新鮮な蒸留水12mL)をすべての動物に経管栄養法により与える(容積=体重の1%)。

【0416】

高脂肪食を与えた直後に、生理食塩水100μLに溶解したGZIPポリペプチド25μgを腹腔内に注入する。同じ投与量(100μL中に25μg/mL)を再度、45分および1時間45分の時点で注入する。対照動物には生理食塩水(3×100μL)を注入する。無処置動物および処置動物は、交互に取り扱う。

【0417】

血液試料を1時間ごとに採取し、すぐに氷の上に置く。各時点の後に、遠心分離によって血漿が製造される。血漿を-20℃に維持し、標準試験キット(Sigma and Wako社)を用いて、遊離脂肪酸(FFA)、トリグリセリド(TG)およびグルコースを24時間以内に測定する。利用可能な血漿の量が制限されるため、グルコースは、プールされた試料を用いて二重測定される。各時点について、1つの処置群につき、8匹すべての動物から等量の血漿がプールされる。

実施例7：C57BL/6マウスにおける血漿レプチンおよびインスリンに対するGZIP

P ポリペプチドの効果

正常な C 5 7 B L / 6 マウスにおいて食後脂肪血症 (P P L) 時の血漿レプチンおよびインスリンレベルに対する G Z I P ポリペプチドの効果を試験する。 R I A によるレプチンおよびインスリンの測定により多くの血液試料が必要とされることを考慮して、 1、 2 および 4 時間の時点でのみ血液を採取したことを除いては、その実験手順は、実施例 6 に記載の手順と同じである。

【 0 4 1 8 】

簡潔には、マウス 1 6 匹を実験前に 2 時間絶食させ、その後基準の血液試料を採取する。すべての血液試料が、 E D T A コーティングされたキャピラリーチューブを用いて尾から採取される (各時点で 1 0 0 μ L)。 0 時点 (9 : 3 0 A M) では、標準高脂肪食 (実施例 6 参照) をすべての動物に経管栄養法により与える (容積 = 体重の 1 %)。高脂肪食を与えた直後に、生理食塩水 1 0 0 μ L に溶解した G Z I P ポリペプチド 2 5 μ g を腹腔内に注入する。同じ投与量 (1 0 0 μ L 中に 2 5 μ g) を再度、 4 5 分および 1 時間 4 5 分の時点で注入する (処置群)。対照動物には生理食塩水 (3 \times 1 0 0 μ L) を注入する。無処置動物および処置動物は、交互に取り扱う。

10

【 0 4 1 9 】

血液試料をすぐに氷の上に置き、各時点の後に、遠心分離によって血漿を製造する。血漿は - 2 0 $^{\circ}$ C に維持し、標準試験キット (W a k o 社) を用いて、遊離脂肪酸 (F F A) を 2 4 時間以内に測定する。レプチンおよびインスリンは、製造元のプロトコルに従って R I A (M L - 8 2 K および S R I - 1 3 K , L I N C O R e s e a r c h 社 , ミズーリ州セント・チャールズ) によって測定する。しかしながら、血漿 2 0 μ g のみを使用する。各測定は、二重測定で行われる。利用可能な血漿の量が制限されるため、レプチンおよびインスリンは、両方の処置群においてそれぞれ、 2 匹の動物の 4 プールにおいて測定される。

20

実施例 8 : C 5 7 B L / 6 マウスにおける血漿 F F A、 T G およびグルコースに対する G Z I P ポリペプチドの効果

正常な C 5 7 B L / 6 マウスにおける食後脂肪血症 (P P L) 時の血漿 F F A、 T G、グルコース、レプチンおよびインスリンレベルに対する G Z I P ポリペプチドの効果が記述されている。高脂肪食が与えられた正常な C 5 7 B L / 6 マウスに投与される G Z I P ポリペプチド (2 . 5 μ g / 日) から得られる体重減少もまた示されている (実施例 3)

30

【 0 4 2 0 】

この実験手順は実施例 6 に記載の手順と同様である。簡潔には、マウス 1 4 匹を実験前に 2 時間絶食させ、その後基準の血液試料を採取する。すべての血液試料が、 E D T A コーティングされたキャピラリーチューブを用いて尾から採取される (各時点で 5 0 μ L)。 0 時点 (9 : 0 0 A M) では、標準高脂肪食 (実施例 6 参照) をすべての動物に経管栄養法により与える (容積 = 体重の 1 %)。高脂肪食を与えた直後に、生理食塩水 1 0 0 μ L に溶解した G Z I P ポリペプチド 2 5 μ g をマウス 4 匹に腹腔内注入する。同じ投与量 (1 0 0 μ L 中に 2 5 μ g) を再度、 4 5 分および 1 時間 4 5 分の時点で注入する。第 2 処置群には、同じ間隔で G Z I P ポリペプチド 5 0 μ g を 3 回投与する。対照動物には生理食塩水 (3 \times 1 0 0 μ L) を注入する。無処置動物および処置動物は、交互に取り扱う。

40

【 0 4 2 1 】

血液試料をすぐに氷の上に置く。各時点の後に、遠心分離によって血漿を製造する。血漿を - 2 0 $^{\circ}$ C に維持し、標準試験キット (S i g m a a n d W a k o 社) を用いて、遊離脂肪酸 (F F A)、トリグリセリド (T G) およびグルコースを 2 4 時間以内に測定する。

実施例 9 : エピネフリン注射後の F F A に対する G Z I P ポリペプチドの効果

マウスにおいて、高脂肪 / ショ糖試験食を胃内投与した後、血漿遊離脂肪酸が増加する。これらの遊離脂肪酸は主に、脂肪分解酵素、つまりリポタンパク質リパーゼ (I P L)

50

および肝性リパーゼ (H L) の活性によって生成される。この種において、これらの酵素は、内皮に結合した状態と、血漿中で遊離して循環した状態の両方で、有意な量で見出される。血漿遊離脂肪酸の他の源は、 α -アドレナリン刺激後に脂肪組織から遊離脂肪酸を放出するホルモン感受性リパーゼ (H S L) である。G Z I P ポリペプチドが、H S L によって放出される遊離脂肪酸の代謝もまた調節するかどうかを試験するために、マウスにエピネフリンを注射する。

【 0 4 2 2 】

マウスの 2 つの群に、腹腔内注入によってエピネフリン (5 μ g) を投与する。処置群には 1 時間前に、再びエピネフリンと共に G Z I P ポリペプチド (25 μ g) を注入し、対照動物には生理食塩水を投与する。血漿を単離し、遊離脂肪酸およびグルコースを上述のように測定する (実施例 8)。

10

実施例 10 : 筋肉の F F A 酸化に対する G Z I P ポリペプチドの効果

筋肉の F F A 酸化に対する G Z I P ポリペプチドの効果を調べるために、C 5 7 B L / 6 J マウスからインタクトな後肢筋肉を単離し、基質としてオレイン酸エステルを用いて F F A の酸化を測定する (Clee, S. M. et al. Plasma and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis. J Lipid Res 41, 521-531 (2000); Muoio, D. M., Dohm, G. L., Tapscott, E. B. & Coleman, R. A. Leptin opposes insulin's effects on fatty acid partitioning in muscles isolated from obese ob/ob mice. Am J Physiol 276, E913-921 (1999)). 上述のように、単離された筋肉におけるオレイン酸エステルの酸化を測定する (Cuendet et al (1976) J Clin Invest 58: 1078-1088; Le Marchand-Brustel, Y., Jeanrenaud, B. & Freychet, P. insulin binding and effects in isolated soleus muscle of lean and obese mice. Am J Physiol 234, E348-E358 (1978)). 簡潔には、マウスを脊椎脱臼により屠殺し、ヒラメ筋および E D L 筋を後肢から迅速に単離する。異なる培地の間での移動を容易にするために、各筋肉の遠位腱を 1 本の縫合糸に結び付ける。4 % F F A 不含ウシ血清アルブミン (画分 V、R I A グレード、S i g m a 社) および 5 m M グルコース (S i g m a 社) が補充された、クレブス - ヘンゼライト重炭酸バッファー (118.6 m M N a C l、4.76 m M K C l、1.19 m M K H₂ P O₄、1.19 m M M g S O₄、2.54 m M C a C l₂、25 m M N a H C O₃、10 m M H e p e s、p H 7.4) 1.5 m L 中にて、すべてのインキュベーションを 30 で行う。実験全体を通して、オレイン酸エステル (S i g m a 社) の総濃度は 0.25 m M である。インキュベーション前に、すべての培地を酸素添加する (O₂ 95 %; C O₂ 5 %)。ガス洗浄器 (gas washer) (K o n t e s 社、ニュージャージー州バインランド) によって泡立てることによって、実験全体にわたり気体混合物を水和する。

20

30

【 0 4 2 3 】

酸素添加されたインキュベーション培地において筋肉を 30 分間すすぐ。次いで、その筋肉を新たな培地 (1.5 m L) に移し、1 μ C i / m L [1 - ¹⁴C] オレイン酸 (A m e r i c a n R a d i o l a b e l e d C h e m i c a l s 社) の存在下にて 30 でインキュベートする。この培地を含有するインキュベーションバイアルをゴム製セプタムで密閉し、そこから、1 枚のワットマン紙 (1.5 c m x 11.5 c m) を保持する中央のウェルを吊るす。

40

【 0 4 2 4 】

一定に酸素添加された、10 分間の最初のインキュベーション期間後、ガスの循環を除去して、外部環境からそのシステムを遮断し、筋肉を 30 で 90 分間インキュベートする。この期間の最後に、S o l v a b l e (P a c k a r d I n s t r u m e n t s 社、コネチカット州メリデン) 0.45 m L を、中央ウェルにおけるワットマン紙上に注入し、筋肉によるオレイン酸エステルの酸化を、バイアルを氷上に移すことによって止める。

【 0 4 2 5 】

5 分後、培地から筋肉を除去し、培地 0.5 m L のアリコートもまた除去する。パイア

50

ルを再び密閉し、ゴム製セブタムに穴を開けることによってシリンジで、35%過塩素酸1 mLを培地に注入する。酸性化培地から放出されるCO₂を、中央ウェルにおけるSolvableによって回収する。30で90分間の回収期間後、ワットマン紙を中央ウェルから除去し、シンチレーション液(Hionic Fluor、Packard Instruments社、コネチカット州メリデン)15 mLを含有するシンチレーションバイアル内に入れる。¹⁴C放射能の量は、液体シンチレーション計数によって定量化される。オレイン酸エステルの酸化速度は、90分/筋肉gで生成されるオレイン酸エステル(nmol)として表される。

【0426】

オレイン酸エステルの酸化に対するgACRP30またはACRP30の効果を試験するために、これらのタンパク質を最終濃度2.5 µg/mLで培地に添加し、手順全体にわたって培地中に維持する。

実施例11：マウスから単離された筋肉および肝臓におけるトリグリセリドに対するGZIPポリペプチドの効果

GZIPポリペプチドによって誘導される増加されたFFA酸化が、筋肉または肝臓へのFFA送達の増加によっても達成されるかどうかを測定するために、後肢筋肉および肝臓のトリグリセリド含有率を、マウスをGZIPポリペプチドで処置した後に測定する。処置および無処置動物から、後肢筋肉ならびに肝臓試料を取り出し、標準脂質抽出法(Shimabukuro, M. et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. Proc Natl Acad Sci USA 94,4637-4641 (1997))に従い、標準試験キットを用いたTGおよびFFA分析によって、トリグリセリドおよび遊離脂肪酸濃度を測定する。

実施例12：イントラリピッド注入後のFFAに対するGZIPポリペプチドの効果

マウスの2つの群に、イントラリピッド-20%(Clin Tec社)30 µLを静脈(尾静脈)内にボーラス注入し、血漿FFAが急激に上昇し、このため腸管吸収が回避される(イントラリピッドは、栄養治療で用いられる静脈内脂肪乳剤である)。処置群(GZIPポリペプチドで処置された)には、イントラリピッドを与える前の30分および60分の時点でGZIPポリペプチド(25 µg)を注入し、対照動物(対照)には生理食塩水を投与する。血漿を単離し、前述のようにFFAを測定する。次いで、イントラリピッドの注入により誘導されるピーク後の、血漿FFAの減衰に対するGZIPポリペプチドの効果をモニターする。

実施例13：筋細胞による、インビトロでのグルコースの取り込み

欧州菌株保存機関(European Culture Collection)(ポर्टンダウン)からL6筋細胞を入手し、継代7~11で使用する。標準組織培養培地DME M中で細胞を維持し、前述のように、インスリン(10⁻⁸M)の存在または非存在下にてGZIPポリペプチドと共に、またはなしに、[³H]-2-デオキシグルコース(2DG)を用いて、グルコースの取り込みを評価する(Walker, P. S. et al. (1990))。L6筋細胞におけるグルコース輸送活性は、細胞下のグルコース輸送体分布、生合成、およびmRNA転写の協調的な制御によって調節される(その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、JBC 265 (3): 1516-1523; およびKilp, A. et al. (1992) Stimulation of hexose transport by metformin in L6 muscle cells in culture. Endocrinology 130 (5): 2535-2544)。2DGの取り込みは、対照(インスリンまたはGZIPポリペプチドを添加されていない)と比較した変化%として表される。値は、1実験につき4ウェルのセットの平均±SEMとして示される。ウェルのセット間の差は、スチューデントt検定によって求められ、確率値p<0.05が有意であると見なされる。

実施例14：げっ歯類の糖尿病モデルにおける代謝関連活性についてのインビボでの試験

代謝プロファイルは、肥満症および糖尿病の種々の動物モデルの間で異なるため、高血糖、高インスリン血症、高脂質血症および肥満症に対するGZIPポリペプチドの効果を区別するために、多数種のモデルの分析が実施される。実験動物のコロニーにおける突然変異および食事療法に対する異なる感受性が、肥満症およびインスリン抵抗性に関連する

10

20

30

40

50

非インスリン依存性糖尿病の動物モデルの発達を可能にしている。マウスにおける *db/db* および *ob/ob* (Diabetes, (1982) 31 (1) : 1-6) 参照) および *zucker* ラットにおける *fa/fa* などの遺伝モデルが、疾患の病態生理を理解し、かつ新規な抗糖尿病化合物(Diabetes, (1983) 32: 830-838; Annu. Rep. Sankyo Res. Lab. (1994). 46: 1-57) の有効性を試験することによって、様々な研究所によって開発されている。ホモ接合性動物、ジャクソン研究所 (Jackson Laboratory, 米国) によって開発された *C57BL/KsJ-db/db* マウスは、高血糖性、高インシュリン性およびインスリン抵抗性であるのに対して (J. Clin. Invest., (1990) 85: 962-967)、ヘテロ接合性動物は、痩せており、かつ血糖正常である。*db/db* モデルにおいて、マウスは進行的に、年と共にインスリン不足 (insulinopenia) を発症し、血糖レベルの制御が不十分な場合に、ヒト *II* 型糖尿病の末期で一般に認められる特徴が生じる。膵臓の状態およびその経過はモデルによって異なる。このモデルが *II* 型糖尿病のモデルに似ていることから、血糖およびトリグリセリド低下活性について、本発明の化合物が試験される。*Zucker (fa/fa)* ラットは重度の肥満、高インシュリン性、およびインスリン抵抗性であり (Coleman, Diabetes 31: 1, 1982; E. Shafrir, in Diabetes; H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340)、*fa/fa* 突然変異は、マウス *db* 突然変異に相当するラットである (Friedman et al., Cell 69: 217-220, 1992; Truett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7806, 1991)。*Tubby (tub/tub)* マウスは、著しい高血糖のない、肥満症、中程度のインスリン抵抗性および高インスリン血症を特徴とする (Coleman et al., J. Heredity 81: 424, 1990)。

【0427】

以前に、レプチンが、先天性リポジストロフィーを有するマウスにおいてインスリン抵抗性および糖尿病を転換することが報告された (Shimomura et al. Nature 401: 73-76 (1999))。レプチンは、脂肪萎縮性糖尿病の異なるリポジストロフィーのマウスモデルにおいて効果が低いことが見出されている (Gavrilova et al Nature 403: 850 (2000))；図面、図または表を含む、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0428】

化学的に誘導された糖尿病についてストレプトゾトシン (STZ) モデルを試験し、肥満症の非存在下での高血糖の効果を調べる。STZ 処置動物は、インスリンが不足し、重度の高血糖性である (Coleman, Diabetes 31: 1, 1982; E. Shafrir, in Diabetes; H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340)。化学的に誘導された肥満症について、グルタミン酸ナトリウム (MSG) モデル (Olney, Science 164: 719, 1969; Cameron et al., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 5: 41, 1978) も調べる。そのモデルにおける肥満症は、遺伝モデルにおける肥満症よりも重症度が低く、過食症、高インスリン血症およびインスリン抵抗性なく発症する。最後に、肥満症の誘導のための非化学的、非遺伝モデルとしては、高脂肪/高炭水化物食 (カフェテリア食) を自由に与えられているげっ歯類が挙げられる。

【0429】

本発明は、上記のげっ歯類糖尿病モデルのいずれかもしくはすべてにおいて、または *I* 型もしくは *II* 型糖尿病または上述の他の好ましい代謝疾患を有するヒト、または他の哺乳動物に基づくモデルにおいて、インスリン抵抗性および高血糖を低減するためのポリペプチドの使用を包含する。本発明の組成物において、所望の場合には、GSSP4 ポリペプチドは、単独で、あるいは他の適合性の薬理学的活性抗糖尿病薬、例えばインスリン、レプチン (米国仮出願第 60/155,506 号) またはトログリタゾンと組み合わせて、使用される。アッセイには、GSSP4 ポリペプチドが腹腔内に、皮下に、筋肉内に、または静脈内に投与されることを除いては、A-ZIP/F-1 マウスを用いた、Gavrilova et al. ((2000) Diabetes Nov; 49 (11) : 1910-6; (2000) Nature Feb 24; 403 (6772): 850) に先に記載されているアッセイが含まれる。マウスのグルコースおよびインスリンレベルが試験され、かつ食物摂取および肝臓重量がモニターされ、ならびに、レ

プチン、FFA、およびTGレベルなどの他の因子が通常、本発明者らの実験で測定されるだろう。

GZIPポリペプチドの抗高血糖活性についてのインビボアッセイ

遺伝子改変された肥満の糖尿病マウス (db/db) (雄、7~9週齢) を、22 および相対湿度50%で標準実験室条件下にて収容し(7~9匹のマウス/ケージ)、固形飼料でピュリナ(Purina)の食事および水を自由にげっ歯類に与え続ける。処置前に、各動物の尾静脈から血液を採取し、血中グルコース濃度をOne Touch Basic Glucose モニターシステム(Lifescan社)を用いて決定する。血漿グルコース250~500mg/dlを有するマウスを使用する。各処置群は、研究の初めに、平均グルコースレベルが各群において等しくなるように分配される7匹のマウスからなる。db/dbマウスに、イソフルラン麻酔を用いて挿入されたマイクロ浸透圧ポンプによって、完全長GZIPポリペプチド、生理食塩水、および無関係のペプチドを皮下投与(s.c.)する。4時間の間、1時間ごとに、かつ投与後24時間、30時間の時点で、尾静脈から血液を採取し、血中グルコース濃度を分析する。投与後0~4時間は食事を引っ込め、その後再び与える。個々の体重および平均摂食量(各ケージ)もまた24時間後に測定する。群の間での有意な差(生理食塩水で処置された群に対してGZIPで処置された群を比較して)が、スチューデントt検定を用いて評価される。

10

インビボでのインスリン感受性アッセイ

インビボでのインスリン感受性は、以下のプロトコルに従って2工程の高インシュリン性-正常血糖クランプ試験を用いて調べられる。実施例2に記載の種々のモデルのいずれかまたはすべてからのげっ歯類を、実験手順前の少なくとも1週間収容する。ケタミンおよびキシラジン(筋肉内投与)麻酔を用いて無菌条件下にて、頸静脈および頸動脈カテーテルの挿入のための手術を行う。手術後、すべてのげっ歯類に意識を取り戻させ、個々のケージに入れる。完全に回復した後および2日後に、頸静脈を通じて、GZIPポリペプチドまたは賦形剤を投与する。最後の処置の6時間後、高インシュリン性-正常血糖クランプ試験を行う。げっ歯類を固定具(restrainer)に固定し、 $4\mu\text{Ci}[3-^3\text{H}]\text{グルコース}(NEN)$ をボーラス投与し、続いて投与量 $0.2\mu\text{Ci}/分(20\mu\text{l}/分)$ の投与量でトレーサの持続注入を行う。トレーサの注入開始から2時間後、3つの血液試料(各 0.3ml)を、基礎測定のために10分間隔(-20-0分)で採取する。次いで、インスリンの注入を開始し($5\text{mU}/\text{kg}/分$)、血液試料 $100\mu\text{l}$ を10分ごとに採取し、血漿グルコースをモニターする。正常血糖に到達させ、かつ維持するために、血漿グルコースレベルに基づいて、第2ポンプを用いて、30%グルコース溶液を注入する。定常状態がインスリン $5\text{mU}/\text{kg}/分$ で確立されたら(安定なグルコース注入速度および血漿グルコース)、グルコース、 $[3-^3\text{H}]\text{グルコース}$ およびインスリンの測定のために、さらに3つの血液試料(各 0.3ml)を採取する(100~120分)。さらに高い投与量のインスリン($25\text{mU}/\text{kg}/分$)を投与し、グルコース注入速度を第2正常血糖クランプに対して調節し、血液試料を220~240分で採取する。グルコース特異的活性は、除タンパクされた血漿において決定され、記述されるように(Lang et al., Endocrinology 130: 43, 1992)、Rdおよび肝グルコース排出量(HGO)の計算を行う。次いで、基礎期間での、ならびに $5\text{mU}/\text{kg}/分$ および $25\text{mU}/\text{kg}/分$ の注入後の血漿インスリンレベルを決定し、GZIP処置および賦形剤処置されたげっ歯類の間で比較する。

20

30

40

【0430】

グルコースのホメオスタシスのインスリン調節は、2つの主要な構成要素：末梢のグルコース取り込みの刺激および肝臓のグルコース排出の抑制を有する。グルコースクランプ法においてトレーサ調査を用いて、インスリン反応のどの部分がGZIPポリペプチドによって影響を受けるかを決定することが可能である。

実施例15：2ハイブリッド・スクリーニングアッセイによる、gAPM1ポリペプチド断片に対する、GZIPポリペプチドの3ドメイン内の結合部位の同定

酵母2ハイブリッド系は、インビボでタンパク質間相互作用を研究するためにデザイン

50

され (Fields and Song, 1989)、酵母 *G a l 4* タンパク質の DNA 結合ドメインへのベイトタンパク質の融合に依拠する。この技術は、米国特許第 5, 6 6 7, 9 7 3 号および米国特許第 5, 2 8 3, 1 7 3 号 (Fields et al.) にも記述されており、どちらの特許の技術的な教示も参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 4 3 1 】

2 ハイブリッド・アッセイによるライブラリースクリーニングの一般手順は、Harper et al. (1993)、または Cho et al. (1998) によって記述されているように、または Fromont-Racine et al. (1997) によっても記述されているように行うことができる。

【 0 4 3 2 】

ベイトタンパク質またはポリペプチドは、少なくとも 6 個のアミノ酸、好ましくは少なくとも 8 ~ 1 0 個のアミノ酸、さらに好ましくは少なくとも 1 2、1 5、2 0、2 5、3 0、4 0、5 0、1 0 0、1 5 0 または 2 0 0 個のアミノ酸の隣接スパンを含む、ポリペプチドまたはポリペプチド断片を含む、から本質的になる、からなる。

【 0 4 3 3 】

さらに正確には、ポリペプチドまたはポリペプチド断片またはその変異体をコードするヌクレオチド配列が、*G A L 4* タンパク質の DNA 結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに融合され、その融合されたヌクレオチド配列は、適切な発現ベクター、例えば *p A S 2* または *p M 3* に挿入される。

【 0 4 3 4 】

次いで、*G A L 4* タンパク質の転写ドメインをコードするベクターにおけるヌクレオチド配列に、ヒト c DNA インサートが融合されるように、特別に設計されたベクターにおいてヒト c DNA ライブラリーが構築される。使用されるベクターは *p A C T* ベクターであることが好ましい。ヒト c DNA ライブラリーのヌクレオチドインサートによってコードされるポリペプチドは、「ブレイ」ポリペプチドと呼ばれる。

【 0 4 3 5 】

第 3 ベクターは、転写活性化ドメインおよび DNA 結合ドメインのどちらも含有する完全な *G a l 4* タンパク質の結合に応答性の調節配列の制御下に置かれる、ガラクトシダーゼ遺伝子または *C A T* 遺伝子などの検出可能なマーカー遺伝子を含有する。例えば、*p G 5 E C* ベクターを用いることができる。

【 0 4 3 6 】

2 種類の異なる酵母菌株も使用される。実例としてであり、限定されない例としての、2 種類の異なる酵母菌株は以下の：

- その表現型が (*M A T a*、*L e u 2 - 3*、*1 1 2 u r a 3 - 1 2*、*t r p 1 - 9 0 1*、*h i s 3 - D 2 0 0*、*a d e 2 - 1 0 1*、*g a l 4 D g a l 1 8 0 D U R A 3 G A L - L a c Z*、*L Y S G A L - H I S 3*、*c y h'*) である、*Y 1 9 0*；

- その表現型が、*Y 1 9 0* の逆の交配型である (*M A T a g a l 4 g a l 8 0 h i s 3 t r p 1 - 9 0 1 a d e 2 - 1 0 1 u r a 3 - 5 2 l e u 2 - 3*、*- 1 1 2 U R A 3 G A L - l a c Z m e t'*) である、*Y 1 8 7*；である。

【 0 4 3 7 】

簡潔には、*p A S 2 / g A P M 1 2 0 μ g* および *p A C T - c D N A* ライブラリー *2 0 μ g* を酵母菌株 *Y 1 9 0* に同時形質転換する。ヒスチジン、ロイシンおよびトリプトファンを欠くが、ヒスチジン合成阻害剤 3 - *A T* (5 0 m M) を含有する最少培地で増殖させるために、形質転換体を選択する。フィルターリフト (filter lift) ・アッセイによって、ガラクトシダーゼに対してポジティブコロニーをスクリーニングする。次いで、ヒスチジン、ロイシンを欠くが、トリプトファンおよびシクロヘキシミド (1 0 m g / m l) を含有するプレート上でダブルポジティブコロニー (*H i s⁺*、*- g a l⁺*) を増殖させ、*p A S 2 / g A P M 1* プラスミドの減少および *p A C T - c D N A* ライブラリープラスミドの保持を選択する。Harper et al. (1993) および Bram et al. (Bram RJ et al., 1993) によって記述されているように、*G a l 4* 融合として、*g A P M 1* または無関係の対照タンパク質；例えば、サイクロフィリン B、ラミン、もしくは *S N F 1* を発現す

10

20

30

40

50

る Y 1 8 7 株と、得られた Y 1 9 0 株を交配し、フィルターリフト・アッセイによってガラクトシダーゼに対してスクリーニングする。対照 G a l 4 融合との交配後の g a l である酵母クローンは、偽陽性であると見なされる。

【 0 4 3 8 】

本発明による 2 ハイブリッドの他の実施形態において、g A P M 1 またはその断片または変異体と細胞タンパク質との相互作用が、M a t c h m a k e r 2 ハイブリッド系 2 (Matchmaker Two Hybrid System 2) (カタログ N o . K 1 6 0 4 - 1 , C l o n t e c h 社) を用いて評価される。その開示内容が参照により本明細書に組み込まれる、M a t c h m a k e r 2 ハイブリッド系 2 (Matchmaker Two Hybrid System 2) (カタログ N o . K 1 6 0 4 - 1 , C l o n t e c h 社) に添付されているマニュアルに記載のように、酵母転写活性化因子 G A L 4 の DNA 結合ドメインをコードする DNA とインフレーションであるように、g A P M 1 タンパク質またはその一部をコードする核酸が発現ベクター中に挿入される。目的の c D N A 、好ましくはヒト c D N A が、G A L 4 の活性化ドメインをコードする DNA とインフレーションであるように、第 2 発現ベクター中に挿入される。2 種類の発現プラスミドが酵母に形質転換され、発現ベクターのそれぞれでの選択マーカーの発現ならびに H I S 3 遺伝子の G A L 4 依存性発現を選択する選択培地上にその酵母をプレーティングする。ヒスチジンを欠く培地上で増殖させることができる形質転換体を、G A L 4 依存性 l a c Z 発現に対してスクリーニングする。ヒスチジン選択および l a c Z アッセイの両方でポジティブな細胞は、g A P M 1 と、最初に選択された c D N A インサートによりコードされるタンパク質もしくはペプチドとの間の相互作用を含む。

【 0 4 3 9 】

2 ハイブリッドスクリーニング・アッセイを本明細書に記載のように本質的に使用し、A P M 1 の球状 C l q - 相同性領域に対する結合部位を有する 1 種または複数種のポリペプチドを同定した。2 種類の異なる g A P M 1 (国際公開番号 : W O 0 1 / 5 1 6 4 5 参照) の構築物をベイトとして使用した。あるセットの 2 ハイブリッド実験において、A P M 1 球状 C l q - 相同性領域を単独で、ベイトとして使用した。第 2 のセットの 2 ハイブリッド実験では、A P M 1 球状 C l q - 相同性領域の他に、二塩基性プロテアーゼプロセッシングの潜在的部位を含有するコラーゲン様反復をコードする 1 5 個の隣接するアミノ酸をベイトとして使用した。骨格筋、肝臓、および脳からの 3 つのヒト c D N A ライブラリーをスクリーニングした。g A P M 1 構築物をベイトとして用いて、重複する G Z I P ポリペプチド断片をコードする、5 つの無関係の c D N A クローンをプレイとして単離した。A P M 1 の球状 C l q - 相同性領域に対する G Z I P ポリペプチド上の結合部位は、5 つの G Z I P プレイ c D N A によってコードされる 5 つの G Z I P ポリペプチド断片の間で最大アミノ酸配列重複部分 (A B S) の領域内にあると推論される。A B S は、配列番号 : 2 の 2 2 1 ~ 2 4 2 位のアミノ酸または配列番号 : 3 の 2 1 7 ~ 2 3 9 位のアミノ酸で構成される。

【 配列表 】

0004423038000001.app

フロントページの続き

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 6 2 9 3 9 (WO , A 1)

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1991) vol.177, no.2, p.696-703

Cancer Res. (1998) vol.58, no.11, p.2353-2358

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N15/00-15/90

PubMed

BIOSIS/WPI (DIALOG)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq