

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-509690

(P2017-509690A)

(43) 公表日 平成29年4月6日(2017.4.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/51 (2006.01)	A 6 1 K 37/56 Z N A	4 B 0 5 0
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 5
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 106 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-563909 (P2016-563909)	(71) 出願人	512235921
(86) (22) 出願日	平成27年1月13日 (2015.1.13)		バーグ エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成28年9月12日 (2016.9.12)		アメリカ合衆国 37210 テネシー州
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/011276		, ナッシュビル, エルム ヒル パイク
(87) 国際公開番号	W02015/106296		1845
(87) 国際公開日	平成27年7月16日 (2015.7.16)	(71) 出願人	514198183
(31) 優先権主張番号	61/926, 913		ユニバーシティ オブ マイアミ
(32) 優先日	平成26年1月13日 (2014.1.13)		アメリカ合衆国 33136 フロリダ州
(33) 優先権主張国	米国 (US)		, マイアミ, ルーム 310, スイート
(31) 優先権主張番号	62/009, 783		300, 3アールデー フロア, エヌダブ
(32) 優先日	平成26年6月9日 (2014.6.9)		リュ 7ティーエイチ アベニュー 19
(33) 優先権主張国	米国 (US)		51
(31) 優先権主張番号	62/100, 881	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成27年1月7日 (2015.1.7)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エノラーゼ1 (ENO1) 組成物及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、筋肉への送達のための、Eno1を含む組成物を提供する。さらに本発明は、血糖が上昇している対象において血糖を正常化するための方法であって、対象にエノラーゼ1(Eno1)を投与し、それにより対象における血糖を正常化することを含む方法を提供する。本発明は、対象における耐糖能障害、インスリン抵抗性、前糖尿病及び糖尿病、特に2型糖尿病を含む1つ以上の状態を処置する方法であって、対象にエノラーゼ1(Eno1)を投与し、それにより対象において状態を処置することを含む方法も提供する。本発明の特定の方法ではEno1は筋肉に送達される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Eno1又はその断片及び筋肉標的化ペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 2】

組成物が筋細胞への送達のためのものである、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

Eno1がEno1ポリペプチド又はその断片を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

Eno1がEno1核酸又はその断片を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

Eno1又はその断片をコードしている発現ベクターをさらに含む、請求項1、2又は4に記載の医薬組成物。

10

【請求項 6】

Eno1又はその断片が生物学的に活性である、請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

Eno1又はその断片が精製された内在性ヒトEno1ポリペプチドの活性の少なくとも90%を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

Eno1がヒトEno1である、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 9】

マイクロ粒子をさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

ナノ粒子をさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

in situ形成組成物をさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

リポソームをさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

デンドリマーをさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 14】

Eno1ポリペプチド及び筋肉標的化ペプチドを含む複合体を含む、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

Eno1ポリペプチドがヒトEno1ポリペプチドである、請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

筋肉標的化ペプチドが:ASSLNIA、WDANGKT、GETRAPL、CGHHPVYAC及びHAIYPRHからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項15に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

複合体が、リンカーをさらに含む、請求項14に記載の医薬組成物。

40

【請求項 18】

リンカーが、共有結合リンカー、非共有結合連結及び可逆性リンカーからなる群から選択される、請求項17に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

複合体が、薬学的に許容されるデンドリマーをさらに含む、請求項14～18のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

薬学的に許容されるデンドリマーが、PAMAMデンドリマーである、請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

50

薬学的に許容されるデンドリマーが、G5デンドリマーである、請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

薬学的に許容されるデンドリマーが、非荷電デンドリマーである、請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

薬学的に許容されるデンドリマーが、アシル化デンドリマーである、請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項 2 4】

薬学的に許容されるデンドリマーが、PEG化デンドリマー又はアセチル化デンドリマーである、請求項19に記載の医薬組成物。

10

【請求項 2 5】

複合体が、リポソームをさらに含む、請求項14～18のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

複合体が、マイクロ粒子をさらに含む、請求項14～18のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 7】

複合体が、in situ形成組成物をさらに含む、請求項14～18のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 2 8】

Eno1が、筋細胞への送達の際に複合体から放出される、請求項14～27のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】

デンドリマー及びEno1が、複合体中で約1:1～約10:1の比で存在する、請求項20～24のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 0】

デンドリマー及びEno1が、複合体中で約3:1～約5:1の比で存在する、請求項20～24のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 1】

筋肉標的化部分及びデンドリマーが、複合体中で約0.1:1～約10:1の比で存在する、請求項20～24のいずれかに記載の組成物。

30

【請求項 3 2】

筋肉標的化部分及びデンドリマーが、複合体中で約1:1～約3:1の比で存在する、請求項20～24のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 3】

Eno1及び筋肉標的化部分が、複合体中で約1:1～約1:30の比で存在する、請求項14～24のいずれかに記載の組成物。

【請求項 3 4】

非経口投与用に製剤化されている、請求項1～33のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 3 5】

経口投与用に製剤化されている、請求項1～33のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 6】

筋肉内投与、静脈内投与又は皮下投与用に製剤化されている、請求項1～33のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 7】

血糖が上昇している対象において血糖を低下させる方法であって、請求項1～19のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に投与し、それにより対象において血糖を低下させることを含む、方法。

【請求項 3 8】

50

耐糖能が低下している対象において耐糖能を増加させる方法であって、請求項1～19のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に投与し、それにより対象において耐糖能を増加させることを含む、方法。

【請求項39】

インスリン感受性の低下及び/又はインスリン抵抗性を有する対象においてインスリン応答を改善する方法であって、請求項1～19のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に投与し、それにより対象においてインスリン応答を改善することを含む、方法。

【請求項40】

対象において糖尿病を処置する方法であって、請求項1～19のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に投与し、それにより対象において糖尿病を処置することを含む、方法。

10

【請求項41】

糖尿病が2型糖尿病又は1型糖尿病である、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

糖尿病が前糖尿病である、請求項40に記載の方法。

【請求項43】

Hb1Acレベルが上昇している対象においてHbA1cレベルを低下させる方法であって、請求項1～19のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に投与し、それにより対象においてHbA1cレベルを低下させることを含む、方法。

【請求項44】

異常な血糖レベルコントロールを有する対象において血糖レベルコントロールを改善する方法であって、請求項1～19のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に投与し、それにより対象において血糖レベルコントロールを改善することを含む、方法。

20

【請求項45】

対象の骨格筋細胞中のグルコース流が増加している、請求項37～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

対象においてグルコース流を増加させる方法であって、請求項1～19のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に投与し、それにより対象においてグルコース流を増加させることを含む、方法。

【請求項47】

30

対象の骨格筋細胞において解糖活性又は解糖能力を増加させる方法であって、請求項1～19のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に投与し、それにより対象の骨格筋細胞において解糖活性又は解糖能力を増加させることを含む、方法。

【請求項48】

対象の骨格筋細胞におけるミトコンドリアの遊離脂肪酸酸化を増加させる方法であって、請求項1～19のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に投与し、それにより対象の骨格筋細胞におけるミトコンドリアの遊離脂肪酸酸化を増加させることを含む、方法。

【請求項49】

Eno1が非経口で投与される、請求項37～48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項50】

40

Eno1が経口で投与される、請求項37～48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項51】

Eno1が筋肉内、静脈内及び皮下からなる群から選択される経路によって投与される、請求項49に記載の方法。

【請求項52】

対象が血糖の上昇、耐糖能の低下、インスリン感受性の低下及び/又はインスリン抵抗性、糖尿病、Hb1Acレベルの上昇並びに異常な血糖レベルコントロールのいずれか1つ以上を有する、請求項37～48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項53】

血糖の上昇、耐糖能の低下、インスリン感受性の低下及び/又はインスリン抵抗性、糖

50

尿病、Hb1Acレベルの上昇並びに異常な血糖レベルコントロールのいずれか1つ以上を有する対象を選択することをさらに含む、請求項37～48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項54】

対象がヒトである、請求項37～53のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2014年1月13日出願の米国仮特許出願第61/926,913号、2014年6月9日出願の米国仮特許出願第62/009,783号及び2015年1月7日出願の米国仮特許出願第62/100,881号に
10 基づく優先権を主張するものであり、これらのそれぞれの内容はその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の提出

本出願に伴う配列表はEFS-Webを介する電子形式で出願され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名称は119992_10619_Sequence_Listingである。テキストファイルのサイズは33KBであり、テキストファイルは2015年1月13日に作成された。

【背景技術】

【0003】

食後に血糖のレベルが上がると、インスリンが分泌され、末梢組織(骨格筋及び脂肪)の細胞を刺激してエネルギーの源としてのグルコースを血液から活発に取り込む。インスリン分泌又は作用の調節不全の結果としてのグルコース恒常性の喪失は、典型的には、肥満によって引き起こされる又はさらに悪化する場合がある糖尿病などの代謝障害を生じる。これらの状態が生活の質を低下させる又は致死性ですらある場合があることから、血流からの適切なグルコースクリアランスを回復させるための戦略が必要とされている。
20

【0004】

糖尿病は膵臓への過度のダメージ(例えば膵炎、腫瘍、副腎皮質ステロイド又はペンタミジンなどのある種の薬物の投与、鉄過剰症(すなわち血色素症)、後天性又は遺伝性内分泌疾患及び外科的切除)を生じる任意の状態から二次的に生じる場合があるが、糖尿病の最も一般的な形態は、典型的にはインスリンシグナル伝達系の一次性障害から生じる。糖尿病の2つの主な型、すなわち1型糖尿病(インスリン依存性糖尿病(IDDM)としても知られる)及び2型糖尿病(インスリン非依存性又は非インスリン依存性糖尿病(NIDDM)としても知られる)があり、それらは発症機序が異なるにも関わらず共通の長期合併症を有している。
30

【0005】

一次性糖尿病のすべての症例のおよそ10%を占める1型糖尿病は、膵臓のインスリン産生ベータ細胞の過度の破壊によって特徴付けられる臓器特異的自己免疫疾患である。結果としてのインスリン産生における低減は、必然的にグルコース代謝の脱調節をもたらす。この状態を罹患している患者にインスリンの投与が顕著な利益を提供する一方で、インスリンの短い血清半減期は、正常血糖の維持の主な障害である。代替処置は膵島移植であるが、この戦略は成果が限定的である。
40

【0006】

集団のより高い割合を冒している2型糖尿病は、インスリンの分泌の脱調節及び/又はインスリンへの末梢組織の応答の低下、すなわちインスリン抵抗性によって特徴付けられる。2型糖尿病の発症機序は不明なままであるが疫学的研究はこの種類の糖尿病が複数の遺伝的欠陥又は多型の集積に起因しており、そのそれぞれは自身の素因リスクに寄与し、体重過多、食事、不活動、薬物及び過度のアルコール消費を含む環境要因によって修正されることを示唆している。種々の治療処置が2型糖尿病の管理のために利用可能であるが、それらは種々の消耗性の副作用を伴っている。したがって2型糖尿病を有する又はそれを
50

有するリスクがあると診断された患者は、体重減少、食事の変更、運動及び適度なアルコール摂取を含むより健康な生活スタイルを身につけるようにしばしば助言される。しかしそのような生活スタイルの変更は、糖尿病によって生じる血管及び臓器損傷を回復させるためには十分ではない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

一態様では本発明は、筋肉への送達のための、エノラーゼ1(Eno1)又はその断片を含む組成物を提供する。一態様では本発明は、血糖が上昇している対象において血糖を正常化するための方法であって、対象にEno1又はその断片を含む組成物を投与し、それにより対象における血糖を正常化することを含む方法を提供する。一態様では本発明は、対象における耐糖能障害、インスリン抵抗性、前糖尿病及び糖尿病、特に2型糖尿病を含む1つ以上の状態を処置する方法であって、対象にEno1又はその断片を含む組成物を投与し、それにより対象において状態を処置することを含む方法も提供する。本発明の特定の方法ではEno1は筋肉に送達される。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、筋細胞への送達のための、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を提供する。

【0009】

特定の実施形態ではEno1はEno1ポリペプチド又はその断片を含む。特定の実施形態ではEno1はEno1核酸又はその断片を含む。特定の実施形態ではEno1はヒトEno1、例えばヒトEno1ポリペプチド又はヒトEno1核酸又はそれらの断片を含む。

20

【0010】

特定の実施形態では組成物はマイクロ粒子をさらに含む。特定の実施形態では組成物はナノ粒子をさらに含む。特定の実施形態ではEno1又はその断片は生物学的に活性である。特定の実施形態ではEno1又はその断片は、精製された内在性ヒトEno1ポリペプチドの活性の少なくとも90%を有する。

【0011】

特定の実施形態では組成物は、in situ形成組成物(in situ forming composition)をさらに含む。特定の実施形態では組成物は、リポソームをさらに含む。特定の実施形態では組成物は、デンドリマーを含む。特定の実施形態では組成物は、例えばEno1又はその断片をコードしている発現ベクターをさらに含む。特定の実施形態では発現ベクターは、ウイルス性ベクターを含む。

30

【0012】

特定の実施形態では組成物は、Eno1又はその断片、例えばEno1ポリペプチド、例えばヒトEno1ポリペプチド及び筋肉標的化部分を含む複合体を含む。特定の実施形態では筋肉標的化部分は、骨格及び/又は平滑筋標的化ペプチドを含む。特定の実施形態ではMTPは:ASS LNIA、WDANGKT、GETRAPL、CGHHPVYAC及びHAIYPRHからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では複合体は、例えばEno1とSMTPとを繋ぐ、リンカーを含む。特定の実施形態ではリンカーは、共有結合リンカー、非共有結合連結及び可逆性リンカーからなる群から選択される。特定の実施形態では複合体は、薬学的に許容されるデンドリマーを含む。特定の実施形態ではデンドリマーは、PAMAMデンドリマーである。特定の実施形態ではデンドリマーは、G5デンドリマーである。特定の実施形態ではデンドリマーは、非荷電デンドリマーである。特定の実施形態ではデンドリマーは、アシル化デンドリマーである。特定の実施形態ではデンドリマーは、PEG化デンドリマー又はアセチル化デンドリマーである。特定の実施形態では複合体は、リポソームを含む。特定の実施形態では複合体は、マイクロ粒子又はナノ粒子を含む。特定の実施形態では組成物は、in situ形成組成物を含む。

40

【0013】

特定の実施形態ではEno1は、筋細胞への送達の際に複合体から放出される。

50

【0014】

特定の実施形態ではEno1又はその断片及び標的化部分は、複合体中で約1:1～約1:30の比で存在する。

【0015】

特定の実施形態では組成物は、注射又は注入による投与用に製剤化されている。特定の実施形態では組成物は、経口投与用に製剤化されている。特定の実施形態では組成物は、非経口投与用に製剤化されている。特定の実施形態では組成物は、筋肉内投与、静脈内投与又は皮下投与用に製剤化されている。

【0016】

本発明は、血糖が上昇している対象において血糖を低下させる方法であって、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。特定の実施形態では医薬組成物は本明細書で提供する医薬組成物のいずれかを含む。

10

【0017】

本発明は、耐糖能が低下している対象において耐糖能を増加させる方法であって、Eno1を含む医薬組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。特定の実施形態では医薬組成物は本明細書で提供する医薬組成物のいずれかを含む。

【0018】

本発明は、インスリン感受性の低下及び/又はインスリン抵抗性を示す対象においてインスリン応答を改善する方法であって、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。特定の実施形態では医薬組成物は本明細書で提供する医薬組成物のいずれかを含む。

20

【0019】

本発明は、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを含む、対象において糖尿病を処置する方法を提供する。特定の実施形態では糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では糖尿病は前糖尿病である。特定の実施形態では糖尿病は1型糖尿病である。特定の実施形態では糖尿病は妊娠糖尿病である。特定の実施形態では医薬組成物は本明細書で提供する医薬組成物のいずれかを含む。

【0020】

本発明は、Hb1Acレベルが上昇している対象においてHbA1cレベルを低下させる方法であって、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。特定の実施形態では医薬組成物は本明細書で提供する医薬組成物のいずれかを含む。

30

【0021】

本発明は、異常な血糖レベルコントロールを有する対象において血糖レベルコントロールを改善する方法であって、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。特定の実施形態では医薬組成物は本明細書で提供する医薬組成物のいずれかを含む。

【0022】

特定の実施形態ではEno1又はその断片は注射又は注入によって投与される。特定の実施形態ではEno1又はその断片は非経口で投与される。特定の実施形態ではEno1又はその断片は経口で投与される。特定の実施形態ではEno1又はその断片は筋肉内投与、静脈内投与及び皮下投与からなる群から選択される経路によって投与される。

40

【0023】

本発明は、対象における血糖レベルの上昇を診断するための方法であって、(a)対象由来の生物学的試料中のEno1のレベルを検出するステップ、及び(b)生物学的試料中のEno1のレベルを予め定めた閾値と比較するステップを含み、ここで、予め定めた閾値より低いEno1レベルが対象における血糖の上昇の存在を示している方法を提供する。特定の実施形態ではその方法は、血糖の上昇の1つ以上の診断指標のレベルを検出するステップをさらに含む。特定の実施形態では、血糖の上昇の1つ以上の追加的診断指標は、HbA1c、空腹時血糖、食後血糖(fed blood glucose)及び耐糖能からなる群から選択される。特定の実施形態では生物学的試料は血液又は血清である。特定の実施形態ではEno1のレベルは、イム

50

ノアッセイ又はELISAによって決定される。特定の実施形態ではステップ(a)は、(i)Eno1に選択的に結合してバイオマーカー複合体を形成する試薬に生物学的試料を接触させること、及び(ii)バイオマーカー複合体を検出することを含む。特定の実施形態では試薬は、Eno1の少なくとも1つのエピトープに選択的に結合する抗Eno1抗体である。

【0024】

特定の実施形態ではステップ(a)は、生物学的試料中のEno1 mRNAの量を検出することを含む。特定の実施形態では増幅反応は、生物学的試料中のEno1 mRNAの量を決定するために使用される。特定の実施形態では増幅反応は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、(b)核酸配列ベース増幅アッセイ(NASBA)、(c)転写媒介増幅(TMA)、(d)リガーゼ連鎖反応(LCR)又は(e)鎖置換増幅(SDA)である。特定の実施形態ではハイブリダイゼーションアッセイは、生物学的試料中のEno1 mRNAの量を決定するために使用される。特定の実施形態では、Eno1 mRNAの一部分に相補的であるオリゴヌクレオチドは、Eno1 mRNAを検出するためのハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用される。

【0025】

本発明の特定の実施形態では血糖の上昇の診断は、2型糖尿病、前糖尿病、妊娠糖尿病及び1型糖尿病からなる群から選択される疾患又は状態の診断的特徴を示す。

【0026】

本発明は、対象における血糖の上昇の存在を診断するための方法であって、(a)Eno1に選択的に結合する試薬に生物学的試料を接触させるステップ、(b)試薬とEno1との間で複合体を形成させるステップ、(c)複合体のレベルを検出するステップ、及び(d)複合体のレベルを予め定めた閾値と比較するステップを含み、ここで、予め定めた閾値を超える複合体のレベルは対象が血糖の上昇を罹患していることを示している方法を提供する。特定の実施形態では試薬は、抗Eno1抗体である。特定の実施形態では抗体は、検出可能な標識を含む。特定の実施形態では複合体のレベルを検出するステップは、複合体を検出可能な二次抗体に接触させること及び二次抗体のレベルを測定することをさらに含む。特定の実施形態では前記方法は、血糖の上昇の1つ以上の追加的指標のレベルを検出するステップをさらに含む。特定の実施形態では血糖の1つ以上の追加的指標は、HbA1cレベル、空腹時グルコースレベル、食後グルコースレベル及び耐糖能からなる群から選択される。特定の実施形態では生物学的試料は、血液又は血清である。

【0027】

本発明の特定の実施形態では複合体のレベルは、イムノアッセイ又はELISAによって決定される。特定の実施形態では血糖の上昇は、前糖尿病、2型糖尿病、1型糖尿病又は妊娠糖尿病の指標となる。特定の実施形態では前記方法は、診断が対象における血糖の上昇の存在を示す場合に治療レジメンを施すステップをさらに含み、ここで治療レジメンは薬物療法及び行動療法又はこれらの組合せからなる群から選択される。特定の実施形態では薬物療法は、(a)メグリチニド、(b)スルホニル尿素、(c)ジペプチジルペプチダーゼ-4(DPP-4)阻害物質、(d)ビグアナイド、(e)チアゾリジンジオン、(f)アルファグルコシダーゼ阻害物質、(g)アミリン模倣物、(h)インクレチン模倣物、(i)インスリン及び(j)これらの任意の組合せからなる群から選択される薬剤での処置を含む。

【0028】

特定の実施形態では先行するいずれの方法も血糖の上昇を有する又は有するリスクがあることが疑われる対象を選択するステップをさらに含む。

【0029】

特定の実施形態では先行するいずれの方法も血糖の上昇を有する又は有するリスクがあることが疑われる対象から生物学的試料を得るステップをさらに含む。

【0030】

特定の実施形態では先行するいずれの方法も生物学的試料中の血糖の上昇に関連する1つ以上の指標のレベルを、前記生物学的試料よりも早い時点で同じ対象から得られた試料

、正常血糖を有する対象由来の試料、前糖尿病を有する対象由来の試料、2型糖尿病を有する対象由来の試料、妊娠糖尿病を有する対象由来の試料及び1型糖尿病を有する対象由来の試料からなる群から選択される対照試料中の血糖の上昇に関連する1つ以上の指標のレベルと比較するステップをさらに含む。

【0031】

本発明は、対象において血糖の上昇をモニタリングするための方法であって、前記方法が：

(1)血糖が上昇している対象から最初に得られた第1の生物学的試料中のEno1のレベルを決定するステップ、

(2)2回目に対象から得られた第2の生物学的試料中のEno1のレベルを決定するステップであって、2回目が1回目より後であるステップ、及び

(3)第2の試料中のEno1のレベルを第1の試料中のEno1のレベルと比較するステップであって、Eno1のレベルにおける変化が対象における上昇した血糖状態における変化の指標となるステップ

を含む方法を提供する。

【0032】

特定の実施形態では決定ステップ(1)及び(2)は、HbA1cレベル、空腹時グルコースレベル、食後グルコースレベル及び耐糖能からなる群から選択される血糖の1つ以上の追加的指標のレベルを決定することをさらに含む。

【0033】

特定の実施形態では対象は、第2の試料を得る前に血糖の上昇に対する薬物で処置されている。特定の実施形態では第1の生物学的試料と比較した第2の生物学的試料中のEno1の減少したレベルは、対象における血糖の上昇の指標となる。特定の実施形態では第1の生物学的試料と比較した第2の生物学的試料中のEno1の増加した又は同等のレベルは、対象における血糖の正常化の指標となる。特定の実施形態では前記方法は、対象における血糖レベルに基づいて対象のために異なる治療レジメンを選択するステップ及び/又は施すステップをさらに含む。特定の実施形態では治療レジメンは、薬物療法及び行動修正療法(behavioral modification therapy)からなる群から選択される。特定の実施形態では薬物療法は(a)メグリチニド、(b)スルホニル尿素、(c)ジペプチジルペプチダーゼ-4(DPP-4)阻害物質、(d)ピグアナイド、(e)チアゾリジンジオン、(f)アルファグルコシダーゼ阻害物質、(g)アミリン模倣物、(h)インクレチン模倣物、(i)インスリン及び(j)これらの任意の組合せからなる群から選択される薬剤での処置を含む。

【0034】

本発明は、対象における血糖の上昇を処置する方法であって、(a)血糖の上昇を有することが疑われる対象から生物学的試料を得るステップ、(b)Eno1のレベルに関する診断情報を得るための生物学的試料を提示するステップ、(c)Eno1のレベルが閾値レベルを超えている場合に抗糖尿病治療の治療有効量を投与するステップを含む方法を提供する。

【0035】

本発明は、対象における血糖の上昇を処置する方法であって、(a)生物学的試料中のEno1のレベルに関する診断情報を得るステップ、及び(b)Eno1のレベルが閾値レベルを超えている場合に抗糖尿病治療の治療有効量を投与するステップを含む方法を提供する。

【0036】

本発明は、対象における血糖の上昇を処置する方法であって、

(a)血糖の上昇を有することが疑われる対象から、Eno1のレベルに関する診断情報を同定するのに使用するための生物学的試料を得るステップ、

(b)生物学的試料中のEno1のレベルを測定するステップ、

(c)Eno1のレベルが閾値レベルより低い場合に血糖低下療法を施すように医療提供者に勧告するステップ

を含む方法を提供する。

【0037】

特定の実施形態では前記方法は、血糖の上昇の1つ以上の追加的指標のレベルに関する診断情報を得るステップをさらに含む。

【0038】

特定の実施形態では前記方法は、血糖の上昇の1つ以上の追加的指標のレベルを測定するステップをさらに含む。

【0039】

特定の実施形態では血糖の上昇の1つ以上の追加的指標は、HbA1cレベル、空腹時グルコースレベル、食後グルコースレベル及び耐糖能からなる群から選択される。

【0040】

特定の実施形態ではステップ(c)は、Eno1のレベルが低く、血糖の上昇の少なくとも1つの追加的指標が検出される場合にグルコース低下療法の治療有効量を施すことをさらに含む。特定の実施形態ではステップ(c)は、Eno1のレベルが閾値レベルより低く、血糖の上昇の少なくとも1つの追加的指標が存在する場合に、グルコース低下療法を施すことを医療提供者に勧告することをさらに含む。

【0041】

特定の実施形態では生物学的試料は、血液又は血清である。特定の実施形態ではEno1のレベルは、イムノアッセイ又はELISAによって決定される。特定の実施形態ではEno1のレベルは、(i)生物学的試料を、Eno1に選択的に結合してバイオマーカー複合体を形成する試薬と接触させること、及び(ii)バイオマーカー複合体を検出することによって決定される。特定の実施形態では試薬は、Eno1の少なくとも1つのエピトープに選択的に結合する抗Eno1抗体である。

【0042】

特定の実施形態ではEno1のレベルは、生物学的試料中のEno1 mRNAの量を測定することによって決定される。特定の実施形態では増幅反応は、生物学的試料中のEno1 mRNAの量を測定するために使用される。特定の実施形態では増幅反応は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、(b)核酸配列ベース増幅アッセイ(NASBA)、(c)転写媒介増幅(TMA)、(d)リガーゼ連鎖反応(LCR)又は(e)鎖置換増幅(SDA)である。特定の実施形態ではハイブリダイゼーションアッセイは、生物学的試料中のEno1 mRNAの量を測定するために使用される。特定の実施形態では、Eno1 mRNAの一部分に相補的であるオリゴヌクレオチドは、Eno1 mRNAを検出するためにハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用される。

【0043】

本発明は、生物学的試料中のEno1を検出するためのキットであって、生物学的試料中のEno1のレベルを測定するための少なくとも1つの試薬、及びEno1のレベルを測定するための一連の説明書を含むキットを提供する。特定の実施形態では試薬は抗Eno1抗体である。特定の実施形態ではキットは、抗Eno1抗体を検出するための手段をさらに含む。特定の実施形態では抗Eno1抗体を検出するための手段は、検出可能な二次抗体である。特定の実施形態では試薬は、Eno1 mRNAに相補的であるオリゴヌクレオチドである。特定の実施形態では説明書は、生物学的試料中のEno1レベルを検出するためのイムノアッセイ又はELISAを記載する。特定の実施形態では説明書は、生物学的試料中のEno1 mRNAのレベルをアッセイするための増幅反応を記載する。特定の実施形態では増幅反応は、生物学的試料中のEno1 mRNAの量を決定するために使用される。特定の実施形態では増幅反応は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、(b)核酸配列ベース増幅アッセイ(NASBA)、(c)転写媒介増幅(TMA)、(d)リガーゼ連鎖反応(LCR)又は(e)鎖置換増幅(SDA)である。特定の実施形態では説明書は、生物学的試料中のEno1 mRNAの量を決定するためのハイブリダイゼーションアッセイを記載する。特定の実施形態ではキットは、Eno1 mRNAの一部分に相補的である少なくとも1つのオリゴヌクレオチドをさらに含む。特定の実施形態ではキットは、生物学的試料中のHbA1c及び/又は血糖のレベルを測定するための少なくとも1つの試薬をさらに含む。特定の実施形態ではキットは、生物学的試料が得られた対象におけるHbA1cレベル、食後血糖レベル、空腹時血糖レベル及び耐糖能からなる群から選択される少なくとも1つのレベルを測定するための説明書をさらに含む。

【0044】

本発明は、血糖の上昇を検出する方法における使用のための試薬群(a panel of reagents)であってEno1及びHbA1cに対する検出試薬を含む試薬群を提供する。

【0045】

本発明は、血糖の上昇を処置する方法における使用のための試薬群であって、Eno1及びHbA1cに対する検出試薬を含む試薬群を提供する。

【0046】

本発明は、血糖の上昇の処置をモニタリングする方法における使用のための試薬群であって、Eno1及びHbA1cに対する検出試薬を含む試薬群を提供する。

【0047】

本発明は、本明細書で提供する試薬群、及び血糖の上昇の1つ以上の指標のレベルに関する診断情報を得るための一連の説明書を含有するキットを提供する。

【0048】

本発明は、血糖の上昇を診断及び/又は処置するための方法において血糖の上昇のマーカーを検出するのに特異的な複数の検出試薬を含む試薬群の使用であって、試薬群の少なくとも1つの検出試薬がEno1を検出するのに特異的であり、残りの1つ以上の検出試薬がHbA1c及びグルコースからなる群から選択される血糖マーカーの上昇の指標を検出するのに特異的である使用を提供する。

【0049】

前述の方法の特定の実施形態では、対象の骨格筋細胞中のグルコース流は増加している。

【0050】

別の態様では本発明は、対象においてグルコース流を増加させる方法であって、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。特定の実施形態では対象に投与される医薬組成物は、前述の医薬組成物のいずれかである。別の態様では本発明は、対象の骨格筋細胞において解糖活性又は解糖能力を増加させる方法であって、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。特定の実施形態では対象に投与される医薬組成物は、前述の医薬組成物のいずれかである。

【0051】

別の態様では本発明は、対象の骨格筋細胞におけるミトコンドリアの遊離脂肪酸酸化を増加させる方法であって、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。特定の実施形態では対象に投与される医薬組成物は、前述の医薬組成物のいずれかである。

【0052】

特定の実施形態では対象は、血糖の上昇、耐糖能の低下、インスリン感受性の低下及び/又はインスリン抵抗性、糖尿病、Hb1Acレベルの上昇並びに異常な血糖レベルコントロールの任意の1つ以上を有する。

【0053】

前述の方法のいずれの特定の実施形態でも対象はヒトである。

【0054】

特定の態様では本発明は、Eno1又はその断片の治療有効量を含む医薬組成物に関する。特定の実施形態では医薬組成物は、筋細胞への送達のためのものである。特定の態様では本発明は、Eno1又はその断片及び筋肉標的化ペプチドを含む医薬組成物に関する。特定の実施形態ではその組成物は、筋細胞への送達のためのものである。特定の実施形態ではEno1は、Eno1ポリペプチド又はその断片を含む。特定の実施形態ではEno1は、Eno1核酸又はその断片を含む。特定の実施形態では組成物は、Eno1又はその断片をコードする発現ベクターをさらに含む。特定の実施形態ではEno1又はその断片は、生物学的に活性である。特定の実施形態ではEno1又はその断片は、精製された内在性ヒトEno1ポリペプチドの活性の少なくとも90%を有する。特定の実施形態ではEno1はヒトEno1である。特定の実施形態では組成物はマイクロ粒子をさらに含む。特定の実施形態では組成物はナノ粒子をさらに含

10

20

30

40

50

む。特定の実施形態では組成物は、in situ形成組成物をさらに含む。特定の実施形態では組成物は、リポソームをさらに含む。特定の実施形態では組成物は、デンドリマーをさらに含む。特定の実施形態では組成物は、Eno1ポリペプチド及び筋肉標的化ペプチドを含む複合体を含む。特定の実施形態ではEno1ポリペプチドは、ヒトEno1ポリペプチドである。特定の実施形態では筋肉標的化ペプチドは:ASSLNIA、WDANGKT、GETRAPL、CGHHPVYAC及びHAIYPRHからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では複合体は、リンカーをさらに含む。特定の実施形態ではリンカーは、共有結合リンカー、非共有結合及び可逆性リンカーからなる群から選択される。特定の実施形態では複合体は、薬学的に許容されるデンドリマーをさらに含む。特定の実施形態では薬学的に許容されるデンドリマーは、PAMAMデンドリマーである。特定の実施形態では薬学的に許容されるデンドリマーは、G5デンドリマーである。特定の実施形態では薬学的に許容されるデンドリマーは、非荷電デンドリマーである。特定の実施形態では薬学的に許容されるデンドリマーは、アシル化デンドリマーである。特定の実施形態では薬学的に許容されるデンドリマーは、PEG化デンドリマー又はアセチル化デンドリマーである。

10

【0055】

前述の組成物の特定の実施形態では複合体は、リポソームをさらに含む。特定の実施形態では複合体は、マイクロ粒子をさらに含む。特定の実施形態では複合体は、in situ形成組成物をさらに含む。特定の実施形態ではEno1は、筋細胞への送達の際に複合体から放出される。特定の実施形態ではデンドリマー及びEno1は、複合体中で約1:1から約10:1の比で存在する。特定の実施形態ではデンドリマー及びEno1は、複合体中で約3:1から約5:1の比で存在する。特定の実施形態では筋肉標的化部分及びデンドリマーは、複合体中で約0.1:1から約10:1の比で存在する。特定の実施形態では筋肉標的化部分及びデンドリマーは、複合体中で約1:1から約3:1の比で存在する。特定の実施形態ではEno1及び筋肉標的化部分は、複合体中で約1:1から約1:30の比で存在する。

20

【0056】

前述の組成物の特定の実施形態では組成物は、非経口投与用に製剤化されている。特定の実施形態では組成物は、経口投与用に製剤化されている。特定の実施形態では組成物は、筋肉内投与、静脈内投与又は皮下投与用に製剤化されている。

【0057】

特定の態様では本発明は、血糖が上昇している対象における血糖を低下させる方法であって、上に記載の組成物のいずれかを対象に投与し、それにより対象における血糖を低下させることを含む方法に関する。

30

【0058】

特定の態様では本発明は、耐糖能が低下している対象において耐糖能を増加させる方法であって、上に記載の組成物のいずれかを対象に投与し、それにより対象における耐糖能を増加させることを含む方法に関する。

【0059】

特定の態様では本発明は、インスリン感受性の低下及び/又はインスリン抵抗性を有する対象においてインスリン応答を改善する方法であって、上に記載の組成物のいずれかを対象に投与し、それにより対象においてインスリン応答を改善することを含む方法に関する。

40

【0060】

特定の態様では本発明は、対象において糖尿病を処置する方法であって、上に記載の組成物のいずれかを対象に投与し、それにより対象において糖尿病を処置することを含む方法に関する。特定の実施形態では糖尿病は、2型糖尿病又は1型糖尿病である。特定の実施形態では糖尿病は、前糖尿病である。

【0061】

特定の態様では本発明は、Hb1Acレベルが上昇している対象においてHbA1cレベルを低下させる方法であって、上に記載の組成物のいずれかを対象に投与し、それにより対象においてHbA1cレベルを低下させることを含む方法に関する。

50

【0062】

特定の態様では本発明は、異常な血糖レベルコントロールを有する対象において血糖レベルコントロールを改善する方法であって、上に記載の組成物のいずれかを対象に投与し、それにより対象において血糖レベルコントロールを改善することを含む方法に関する。前述の方法の特定の実施形態では対象の骨格筋細胞におけるグルコース流は増加している。

【0063】

特定の態様では本発明は、対象においてグルコース流を増加させる方法であって、上に記載の組成物のいずれかを対象に投与し、それにより対象においてグルコース流を増加させることを含む方法に関する。

10

【0064】

特定の態様では本発明は、対象の骨格筋細胞において解糖活性又は解糖能力を増加させる方法であって、上に記載の組成物のいずれかを対象に投与し、それにより対象の骨格筋細胞において解糖活性又は解糖能力を増加させることを含む方法に関する。

【0065】

特定の態様では本発明は、対象の骨格筋細胞におけるミトコンドリアの遊離脂肪酸酸化を増加させる方法であって、上に記載の組成物のいずれかを対象に投与し、それにより対象の骨格筋細胞におけるミトコンドリアの遊離脂肪酸酸化を増加させることを含む方法に関する。

【0066】

前述の方法の特定の実施形態ではEno1は、非経口で投与される。前述の方法の特定の実施形態ではEno1は、経口で投与される。特定の実施形態ではEno1は、筋肉内、静脈内及び皮下からなる群から選択される経路で投与される。前述の方法の特定の実施形態では対象は、血糖の上昇、耐糖能の低下、インスリン感受性の低下及び/又はインスリン抵抗性、糖尿病、Hb1Acレベルの上昇並びに異常な血糖レベルコントロールの任意の1つ以上を有する。

20

【0067】

特定の実施形態では前述の方法は、血糖の上昇、耐糖能の低下、インスリン感受性の低下及び/又はインスリン抵抗性、糖尿病、Hb1Acレベルの上昇並びに異常な血糖レベルコントロールの任意の1つ以上を有する対象を選択することをさらに含む。

30

【0068】

前述の方法の特定の実施形態では対象はヒトである。

【0069】

他の実施形態は以下に提供される。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】図1Aは、Eno1及びインスリンで処置した又はしていない平滑筋芽細胞におけるグルコース取り込みを示すグラフである。図1Bは、インスリン処置を伴わずに0、500又は1000 µg/ml Eno1で処置した平滑筋芽細胞におけるグルコース取り込みを示す。

【図2-1】図2A及び2Bは、0、500又は1000 µg/ml Eno1で処置したヒト骨格筋筋管におけるEno1タンパク質レベルを示す。

40

【図2-2】図2Cは、0、500又は1000 µg/ml Eno1で処置したヒト骨格筋筋管におけるEno1活性を示す。

【図3】図3Aは、未変性(native)及び熱不活性化Eno1のEno1活性を示す。図3Bは、活性及び熱不活性化Eno1によるグルコース取り込みの誘発を示す。

【図4】図4A及び4Bは、Eno1タンパク質での処置後又は処置していない食餌性肥満(DIO)のマウスモデルにおける耐糖能検査でのグルコースクリアランスの(A)経時変化及び(B)曲線下面積(AUC)を示す。

【図5】図5はSDS-PAGEによって分析された、種々の濃度のEno1を含有するポリアクリルアミドゲルのクーマシー染色を示す。L1: Precision Plus Protein Standard Dual Color

50

、L2: Eno1(10.0 μ g)、L3: Eno1(1.0 μ g)、L4: Eno1(0.1 μ g)。

【図 6】図 6 は SDS-PAGE によって分析された、種々の濃度の Eno1 を含有するポリアクリルアミドゲルの銀染色を示す。L1: Precision Plus Protein Standard Dual Color、L2: Eno1(10.0 μ g)、L3: Eno1(1.0 μ g)、L4: Eno1(0.1 μ g)。

【図 7】図 7 は Eno1 のウエスタンブロット分析を示す。L1: Precision Plus Protein Standard Dual Color、L2: Eno1(10.0 μ g)、L3: Eno1(1.0 μ g)、L4: Eno1(0.1 μ g)。

【図 8】図 8 は Eno1 対 dendri mer-SMTP の比 2:1 で作られた Eno1/G5-dendri mer-SMTP 複合体のゼータ (ζ) 電位測定を示す。

【図 9】図 9 は種々の温度での保存後での Eno1 単独 (エノラーゼ単独) 及び Eno1/G5-dendri mer-SMTP (エノラーゼ/G5-SMC) 溶液の正規化活性を示す。

【図 10 A】図 10A 及び 10B は、(A) 蛍光標識 Eno1-G5-PAMAM dendri mer 複合体及び (B) 蛍光標識した筋肉標的化 Eno-1-G5-PAMAM dendri mer 複合体のマウスでの組織分布の代表的な蛍光画像である。

【図 10 B】図 10A 及び 10B は、(A) 蛍光標識 Eno1-G5-PAMAM dendri mer 複合体及び (B) 蛍光標識した筋肉標的化 Eno-1-G5-PAMAM dendri mer 複合体のマウスでの組織分布の代表的な蛍光画像である。

【図 11】図 11 は ビヒクル、G5-PAMAM dendri mer、G5-PAMAM dendri mer+SMTP、G5-PAMAM dendri mer+Eno1、G5-PAMAM dendri mer+Eno1+SMTP の内の 1 つで処置した痩身マウス又は DIO マウスの体重を示すグラフである。

【図 12】図 12 は 生理食塩水又は G5-PAMAM dendri mer+Eno1+SMTP (50ug/kg) の注射 1、4 及び 24 時間後の食餌性肥満を有するマウスにおける血糖レベルを示すグラフである。

【図 13-1】図 13A は、G5-PAMAM dendri mer+SMTP (DIO NP+SMTP) 又は G5-PAMAM dendri mer+Eno1+SMTP (DIO エノラーゼ-1+NP+SMTP) での 1 週間の処置後の痩身マウス及び糖尿病の食餌性肥満 (DIO) マウスモデルにおける耐糖能検査の結果を示す。図 13B は、図 13A での各処置群についての曲線下面積 (AUC) を示す。

【図 13-2】図 13C 及び 13D は、ビヒクル、G5-PAMAM dendri mer (G5)、G5-PAMAM dendri mer+SMTP、G5-PAMAM dendri mer+Eno1、G5-PAMAM dendri mer+Eno1+SMTP の内の 1 つでの 2 週間処置後の、痩身マウスにおける、又は DIO マウスにおける耐糖能検査でのグルコースクリアランスの (C) 経時変化及び (D) 曲線下面積 (AUC) を示す。

【図 13-3】図 13C 及び 13D は、ビヒクル、G5-PAMAM dendri mer (G5)、G5-PAMAM dendri mer+SMTP、G5-PAMAM dendri mer+Eno1、G5-PAMAM dendri mer+Eno1+SMTP の内の 1 つでの 2 週間処置後の、痩身マウスにおける、又は DIO マウスにおける耐糖能検査でのグルコースクリアランスの (C) 経時変化及び (D) 曲線下面積 (AUC) を示す。

【図 14 A】図 14A 及び 14B は、ビヒクル、G5-PAMAM dendri mer、G5-PAMAM dendri mer+SMTP、G5-PAMAM dendri mer+Eno1、G5-PAMAM dendri mer+Eno1+SMTP の内の 1 つでの 4 週間処置後の、痩身マウスにおける、又は DIO マウスにおける耐糖能検査でのグルコースクリアランスの (A) 経時変化及び (B) 曲線下面積 (AUC) を示す。

【図 14 B】図 14A 及び 14B は、ビヒクル、G5-PAMAM dendri mer、G5-PAMAM dendri mer+SMTP、G5-PAMAM dendri mer+Eno1、G5-PAMAM dendri mer+Eno1+SMTP の内の 1 つでの 4 週間処置後の、痩身マウスにおける、又は DIO マウスにおける耐糖能検査でのグルコースクリアランスの (A) 経時変化及び (B) 曲線下面積 (AUC) を示す。

【図 15】図 15 は 痩身マウス、食餌性肥満 (DIO) マウス、G5-dendri mer (DIO+NP) で処置した DIO マウス及び Eno1/G5-dendri mer-SMTP 複合体 (DIO+Eno-1+NP+SMTP) で処置した DIO マウスの処置の 8 週間後の血清乳酸レベルを示す。

【図 16】図 16A 及び 16B は、ビヒクル、G5-PAMAM dendri mer (G5)+SMTP 及び G5-PAMAM dendri mer+Eno1+SMTP の 25ug/kg 又は 50ug/kg の内の 1 つでの 1 週間処置後の db/db マウス (BK S.Cg-m+/+Leprdb/J) における腹腔内耐糖能検査でのグルコースクリアランスの (A) 経時変化及び (B) 曲線下面積 (AUC) を示す。

【図 17】図 17A 及び 17B は、ビヒクル、G5-PAMAM dendri mer (G5)+SMTP 及び G5-PAMAM dendri mer+Eno1+SMTP の 25ug/kg 又は 50ug/kg の内の 1 つでの処置の 2 週間後の、ビヒクル、

10

20

30

40

50

G5-PAMAMデンドリマー+SMTP及びG5-PAMAMデンドリマー+Eno1+SMTPの示す用量での注射の直後に開始された経過で得られたdb/dbマウス(BKS.Cg-m/+Leprdb/J)におけるグルコースレベルの経時変化を示すグラフである。図17Aは、4つすべての投与レジメンからの結果を示す。図17Bは、30分時点でのグルコースレベルにおける有意差を示すためにG5-PAMAMデンドリマー+SMTP(G5+SMTP)及びG5-PAMAMデンドリマー+Eno1+SMTP(Eno1+G5+SMTP)50ug/kgからの結果を示す。

【図18】図18はdb/db糖尿病マウスモデルにおける25 µg/kg体重又は50 µg/kg体重のEno1/G5-デンドリマー/SMTP複合体の1日1回の皮下注射の処置の2週間後の食後血糖レベルへの効果を示す。食後グルコースは、絶食を伴わないEno1注射の24時間後に測定された。「NP」はG5-デンドリマーである。

10

【図19】図19はdb/db糖尿病マウスモデルにおけるEno1/G5-デンドリマー/SMTP複合体の100 µg/kg体重又は200 µg/kg体重、1日2回(朝及び晩)皮下注射の食後血糖レベルへの効果を示す。

【図20】図20はG5-PAMAMデンドリマー(G5)、G5-PAMAMデンドリマー+SMTP(G5-SMC)及びアシル化G5-PAMAMデンドリマー+SMTP(G5-SMC-Ac)での処置後に検出されたクレアチンキナーゼ及びカスパーゼ3活性を示す。

【図21】図21はEno1及びインスリン処置された又はされていないヒト骨格筋筋管におけるp-Aktタンパク質レベルを示す。

【図22】図22Aは、精製Eno1で処置された又はされていないヒト骨格筋筋管におけるGlut1、Glut4、HK2及びミオゲニンmRNAレベルを示す。図22Bは、精製Eno1で処置した又はしていないヒト骨格筋筋管におけるGlut1タンパク質レベルを示す。Glut1タンパク質レベルは、リボソームタンパク質中央値によって標準化した相対単位である。

20

【図23】図23は精製Eno1で処置された又はされていないグルコース欠乏(上パネル)及びグルコース刺激(下パネル)ヒト骨格筋筋管におけるグルコース-6-リン酸(G6P)レベルを示す。

【図24】図24は精製Eno1で処置された又はされていないグルコース欠乏(上パネル)及びグルコース刺激(下パネル)ヒト骨格筋筋管におけるホスホエノールピルベート(PEP)レベルを示す。

【図25】図25は精製Eno1で処置された又はされていない、パルミテート、CCCP及びエトモキシルで連続的に処置されたヒト骨格筋筋管(HSMM)培養物における酸素消費速度(OCR)を示す。

30

【図26】図26は精製Eno1で処置された又はされていないグルコース、オリゴマイシン及び2-DGで連続的に処置されたヒト骨格筋筋管(HSMM)培養物における細胞外酸性化速度(ECAR)を示す。

【図27】図27Aは未処置対照ヒト骨格筋筋管と比較した500 µg/ml又は1000 µg/ml Eno1で処置されたヒト骨格筋筋管におけるミトコンドリア含有量を示すグラフである。ミトコンドリア含有量は、Eno1処置の48時間後に細胞にMitotracker Green、緑蛍光ミトコンドリア染色を添加することによって決定された。図27Bは未処置対照ヒト骨格筋筋管(Eno 10ug/ml)と比較した500ug/ml又は1000 µg/ml Eno1で処置されたヒト骨格筋筋管におけるミトコンドリア反応性酸素種(Mito-ROS)産生を示す。Mito-ROSは、細胞をジヒドロローダミン123、すなわちミトコンドリアに局在し、緑蛍光を呈するカチオン性ローダミン123に酸化される膜を通して受動的に拡散できる無電荷及び無蛍光反応性酸素種(ROS)指示薬で処置することによって測定された。ジヒドロローダミン123処置後、筋管をトリプシン処置し、洗浄し、Mito-ROSレベルを決定するためのフローサイトメトリーに供した。

40

【図28】図28Aは0、500又は1000 µg/ml Eno1で処置された骨格筋筋管における5'AMP活性化タンパク質キナーゼ(AMPK)及びリン酸化AMPK(pAMPK)レベルを示す。ラミンA/Cはローディング対照として使用された。図28Bは0、500又は1000 µg/ml Eno1で処置された基底及び血清飢餓骨格筋筋管におけるpAMPK(p-AMPK)対AMPKの比を示す。

【図29】図29はEno1に関する作用の様式におけるNamptの潜在的な役割を記載するワーキングモデルの模式図である。

50

【図 3 0】図 3 0 は分化培地中500 $\mu\text{g/ml}$ 又は1000 $\mu\text{g/ml}$ Eno1で48時間処置したヒト骨格筋筋管におけるNampt活性を4日間分化後に未処置対照ヒト骨格筋筋管(Eno 10 $\mu\text{g/ml}$)と比較して示す。

【図 3 1】図 3 1 は組換え細胞外Nampt(eNampt)で処置した血清飢餓ヒト骨格筋筋管における2-DG取り込みを示す。

【図 3 2】図 3 2 は分化培地中で48時間、0、500又は1000 $\mu\text{g/ml}$ Eno1で処置されたヒト骨格筋筋管培養物のNampt阻害物質FK866の存在下又は非存在下で分化4日後のグルコース取り込みを示す。FK866をEno1処置の開始24時間後に加え、筋管はFK866で24時間処置された。2-DG取り込みは、血清飢餓3時間後に測定された。FK866によるNampt阻害はEno1誘発グルコース取り込みを消失させた。

10

【図 3 3】図 3 3 は解糖系の模式図を示す。

【図 3 4 - 1】図34A及び34Bは、ヒトEno1、変種(variant)1(NCBIアクセッション番号NM_001428.3)の(A)アミノ酸(配列番号2)及び(B)核酸コード配列(配列番号1)を示す。

【図 3 4 - 2】図34A及び34Bは、ヒトEno1、変種(variant)1(NCBIアクセッション番号NM_001428.3)の(A)アミノ酸(配列番号2)及び(B)核酸コード配列(配列番号1)を示す。

【図 3 4 - 3】図34A及び34Bは、ヒトEno1、変種(variant)1(NCBIアクセッション番号NM_001428.3)の(A)アミノ酸(配列番号2)及び(B)核酸コード配列(配列番号1)を示す。

【図 3 5 - 1】図35A及び35Bは、ヒトEno1、変種2(NCBIアクセッション番号NM_001201483.1)の(A)アミノ酸(配列番号4)及び(B)核酸コード配列(配列番号3)を示す。ヒトEno1、変種2タンパク質はMBP-1とも称される。

20

【図 3 5 - 2】図35A及び35Bは、ヒトEno1、変種2(NCBIアクセッション番号NM_001201483.1)の(A)アミノ酸(配列番号4)及び(B)核酸コード配列(配列番号3)を示す。ヒトEno1、変種2タンパク質はMBP-1とも称される。

【図 3 5 - 3】図35A及び35Bは、ヒトEno1、変種2(NCBIアクセッション番号NM_001201483.1)の(A)アミノ酸(配列番号4)及び(B)核酸コード配列(配列番号3)を示す。ヒトEno1、変種2タンパク質はMBP-1とも称される。

【図 3 6 A】図36Aは、ENO2 mRNA(配列番号5)の核酸配列を示す。

【図 3 6 B】図36BはEno2(配列番号6)のアミノ酸配列を示す。

【図 3 7 A】図37A及び37BはENO3 mRNAの変種1(配列番号7)及び変種2(配列番号8)の核酸配列をそれぞれ示す。図37Cは、変種1及び変種2の両方によってコードされているEno3タンパク質アイソフォーム1(配列番号9)を示す図である。図37DはENO3 mRNAの変種3の核酸配列(配列番号10)を示す図である。図37Eは変種3によってコードされているEno3のアイソフォーム2のアミノ酸配列(配列番号11)を示す図である。ENO3 mRNAの変種3は変種1と比較して5'UTRにおいて異なっており、5'コード領域中の2個のエクソンを欠いている。Eno3タンパク質のアイソフォーム2は、アイソフォーム1より短いが、同じN及びC末端を有する。

30

【図 3 7 B】図37A及び37BはENO3 mRNAの変種1(配列番号7)及び変種2(配列番号8)の核酸配列をそれぞれ示す。図37Cは、変種1及び変種2の両方によってコードされているEno3タンパク質アイソフォーム1(配列番号9)を示す図である。図37DはENO3 mRNAの変種3の核酸配列(配列番号10)を示す図である。図37Eは変種3によってコードされているEno3のアイソフォーム2のアミノ酸配列(配列番号11)を示す図である。ENO3 mRNAの変種3は変種1と比較して5'UTRにおいて異なっており、5'コード領域中の2個のエクソンを欠いている。Eno3タンパク質のアイソフォーム2は、アイソフォーム1より短いが、同じN及びC末端を有する。

40

【図 3 7 C】図37A及び37BはENO3 mRNAの変種1(配列番号7)及び変種2(配列番号8)の核酸配列をそれぞれ示す。図37Cは、変種1及び変種2の両方によってコードされているEno3タンパク質アイソフォーム1(配列番号9)を示す図である。図37DはENO3 mRNAの変種3の核酸配列(配列番号10)を示す図である。図37Eは変種3によってコードされているEno3のアイソフォーム2のアミノ酸配列(配列番号11)を示す図である。ENO3 mRNAの変種3は変種1と比較して5'UTRにおいて異なっており、5'コード領域中の2個のエクソンを欠いている。Eno3タンパク質のアイソフォーム2は、アイソフォーム1より短いが、同じN及びC末端を有する。

【図 3 7 D】図37A及び37BはENO3 mRNAの変種1(配列番号7)及び変種2(配列番号8)の核酸

50

配列をそれぞれ示す。図37Cは、変種1及び変種2の両方によってコードされているEno3タンパク質アイソフォーム1(配列番号9)を示す図である。図37DはENO3 mRNAの変種3の核酸配列(配列番号10)を示す図である。図37Eは変種3によってコードされているEno3のアイソフォーム2のアミノ酸配列(配列番号11)を示す図である。ENO3 mRNAの変種3は変種1と比較して5'UTRにおいて異なっており、5'コード領域中の2個のエクソンを欠いている。Eno3タンパク質のアイソフォーム2は、アイソフォーム1より短いが、同じN及びC末端を有する。

【図37E】図37A及び37BはENO3 mRNAの変種1(配列番号7)及び変種2(配列番号8)の核酸配列をそれぞれ示す。図37Cは、変種1及び変種2の両方によってコードされているEno3タンパク質アイソフォーム1(配列番号9)を示す図である。図37DはENO3 mRNAの変種3の核酸配列(配列番号10)を示す図である。図37Eは変種3によってコードされているEno3のアイソフォーム2のアミノ酸配列(配列番号11)を示す図である。ENO3 mRNAの変種3は変種1と比較して5'UTRにおいて異なっており、5'コード領域中の2個のエクソンを欠いている。Eno3タンパク質のアイソフォーム2は、アイソフォーム1より短いが、同じN及びC末端を有する。

【発明を実施するための形態】

【0071】

詳細な説明及び好ましい実施形態

発見プラットフォーム(discovery platform)技術を使用して、糖尿病の病態生理を駆動する別の分子シグネチャーを明らかにした。Eno1は、糖尿病のヒト一次性in vitroモデルにおいて顕著に調節されている決定的なノード(node; 結節点)としてこの発見プラットフォーム技術を通じて同定された。本明細書で考察する続くin vitro及びin vivo研究は、インスリン依存性及び非依存性グルコース取り込み、耐糖能、インスリン感受性並びに/又は糖尿病、例えば1型糖尿病、2型糖尿病、前糖尿病及び妊娠糖尿病におけるEno1に関する役割を確認した。さらに具体的にはEno1タンパク質でのヒト筋管の処置は、筋管におけるインスリン依存性及び非依存性グルコース取り込みの両方を増加させることが実証され、1型及び2型糖尿病の両方の処置における、並びにインスリン及び/又はインスリン応答の存在及び非存在の両方でのグルコース取り込みにおけるEno1についての役割を示している。さらに、単独で又は骨格筋標的化デンドリマーとの関連でのEno1タンパク質の投与は、マウスでの食餌性肥満モデルにおいて耐糖能を改善し、同様の結果が1型及び2型糖尿病の両方の遺伝モデルにおいて予測される。これらの結果はEno1がグルコース及びインスリン応答を正常化することにおいて有効であることを実証しており、それによりEno1が耐糖能を改善し、インスリン感受性を増加させる/インスリン抵抗性を低下させることにおいて有用であり、それにより糖尿病を処置することを示している。

【0072】

I. 定義

ENO1L、アルファエノラーゼ、エノラーゼアルファ、タウクリスタリン、非神経性エノラーゼ(NNE)、アルファエノラーゼ様1、ホスホピルベートヒドラーターゼ(PPH)、プラスミノーゲン結合タンパク質、MYCプロモーター結合タンパク質1(MPB1)及び2-ホスホ-D-グリセレートヒドロリアーゼとしても知られるエノラーゼ1、(アルファ)は、哺乳動物において見出される3つのエノラーゼアイソザイムの1つである。ヒトEno1アイソフォームのタンパク質及び核酸配列は本明細書で図34及び35において提供される。本出願は、ヒト疾患の処置のためのヒトアミノ酸及び核酸配列を提供する。しかし、本発明の組成物及び方法が、処置される種のEno1の選択によって非ヒト動物の処置のために容易に適合化され得ることは理解される。非ヒト種についてのEno1のアミノ酸及び核酸配列は、当技術分野において公知であり、例えばncbi.nlm.nih.gov/genbank/において見出され得る。いくつかの実施形態では本発明の組成物及び方法において使用されるEno1は哺乳動物Eno1である。好ましい実施形態ではEno1はヒトEno1である。

【0073】

本明細書において使用される「Eno1の投与」は、他に示す場合を除いて、Eno1タンパク質又はEno1タンパク質の発現のための核酸構築物のいずれかの投与として理解される。特定の実施形態ではEno1タンパク質は、Eno1タンパク質断片又はEno1タンパク質断片をコー

ドする核酸を含み得る。特定の実施形態ではEno1の投与は、Eno1タンパク質の投与である。特定の実施形態ではEno1の投与はEno1ポリヌクレオチドの投与である。ヒトEno1のタンパク質及び核酸配列は本明細書で提供される。特定の実施形態ではEno1の投与は、ヒトEno1の第1の変種又は第2の変種の投与を含む。特定の実施形態ではEno1の投与は、ヒトEno1の第1の変種及び第2の変種の投与を含む。特定の実施形態ではEno1の投与は、ヒトEno1の第1の変種の投与を含む。特定の実施形態ではEno1の投与は、ヒトEno1の第2の変種の投与を含む。特定の実施形態ではEno1の投与は、ヒトEno1の第1の変種だけの投与を含む。特定の実施形態ではEno1の投与は、ヒトEno1の第2の変種だけの投与を含む。

【0074】

本明細書において使用される「生物学的に活性」は、内在性Eno1タンパク質の少なくとも1つの活性を有するEno1分子又はその断片を指す。例えばいくつかの実施形態では生物学的に活性なEno1分子又はその断片は、2-ホスホ-D-グリセレート (PGA) のホスホエノールピルベート (PEP) への脱水を触媒する。いくつかの実施形態では生物学的に活性なEno1分子又はその断片は、PEPのPGAへの水和を触媒する。いくつかの実施形態では生物学的に活性なEno1分子又はその断片は、細胞、例えば筋細胞、好ましくは骨格筋細胞によるグルコース取り込みを増加させる。いくつかの実施形態では生物学的に活性なEno1分子又はその断片は、血糖レベル、例えば食後血糖レベル又は耐糖能検査における血糖レベルを低減する。いくつかの実施形態では生物学的に活性なEno1分子又はその断片は、Namp1、例えば細胞外Namp1 (eNamp1) に結合する。

【0075】

本明細書において使用される骨格筋細胞、平滑筋細胞などを含む「筋肉への投与」、「筋肉への送達」又は「筋細胞への送達」は、所望の全身性効果、例えば耐糖能及び/若しくはインスリン感受性を増加させることによる例えば異常な血糖を有する対象における血糖の正常化、又は糖尿病を処置すること、を提供するためにEno1の有効量を筋肉、例えば筋細胞に提供するための製剤、方法又はその組合せとして理解される。特定の実施形態ではEno1は、筋肉に直接投与するため、及び好ましくは保持するために製剤化される。特定の実施形態では、筋肉への直接投与(すなわち筋肉内投与)のための製剤、好ましくは比較的低頻度の投与(例えば1週間に1回以下、2週間ごと以下、1ヵ月に1回以下、2ヵ月ごと以下、3ヵ月ごと以下、4ヵ月ごと以下、5ヵ月ごと以下、6ヵ月ごと以下)を可能にするためにEno1の徐放性製剤が使用される。特定の実施形態ではEno1は、Eno1の筋肉への送達を増加させるために標的化部分に連結され、それによりEno1は直接筋肉に送達される必要はない(例えば皮下又は静脈内に送達される)。筋肉への投与がEno1の全用量が筋肉又は筋細胞に送達されることを必要としないことは理解される。特定の実施形態ではEno1の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%が筋肉、好ましくは骨格筋及び/又は平滑筋に送達される。特定の実施形態では、筋細胞に送達される非筋肉内投与される筋肉標的化Eno1の量は、筋肉に送達される非標的化Eno1の量の約1.5倍以上、2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上又は6倍以上である。特定の実施形態ではEno1は骨格筋に送達される。特定の実施形態ではEno1は平滑筋に送達される。特定の実施形態ではEno1は、骨格筋及び平滑筋に送達される。特定の実施形態では、平滑筋と比較して骨格筋に優先的に又はより多い量が送達される。特定の実施形態では筋肉に送達されたEno1の少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以上が骨格筋に送達される。特定の実施形態ではEno1は平滑筋に送達されない。標的化部分によるペイロードの相対標的化を決定するためのアッセイは、当技術分野において公知であり、参照により本明細書に組み込まれる例えばSamoylova et al., 1999, Muscle Nerve, 22:460~466において提供されている。

【0076】

本明細書において使用される「筋肉標的化部分」は、筋肉標的化ペプチド(MTP)、例えば骨格及び/又は平滑筋標的化ペプチド(SMTP)を少なくとも含む。特定の実施形態では標的化部分は、インテグリン $\alpha_v\beta_5$ 又は $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに結合するリガンドを含む。特定の実施形態では標的化部分は、CD-46リガンドを含む。特定の実施形態では標的化部分

は、アデノウイルスペトン(peton)タンパク質を任意選択でアデノウイルス35線維タンパク質との組合せで含む。特定の実施形態では、筋肉標的化部分によって筋肉標的化Eno1の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%が筋肉、いくつかの実施形態では好ましくは骨格及び/又は平滑筋に送達される。特定の実施形態では、筋細胞に送達される非筋肉内投与筋肉標的化Eno1の量は、筋肉に送達される非標的化Eno1の量の約1.5倍以上、2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上又は6倍以上である。

【0077】

本明細書において使用される「筋肉標的化ペプチド」又は「MTP」は、筋細胞、好ましくは骨格及び/又は平滑筋細胞へのそのペイロード(例えばEno1)の送達を増加させるペプチド配列として理解される。MTPは当技術分野において公知であり、例えばそれぞれその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,329,501号、米国特許出願第2011/0130346号及びSamoylova et al., 1999, Muscle and Nerve 22: 460~466に提供されている。特定の実施形態ではMTPは骨格筋標的化ペプチドである「骨格筋標的化ペプチド」は、骨格筋細胞へのそのペイロード(例えばEno1)の送達を増加させるペプチド配列である。特定の実施形態ではMTPは平滑筋標的化ペプチドである。「平滑筋標的化ペプチド」は、平滑筋細胞へのそのペイロード(例えばEno1)の送達を増加させるペプチド配列である。特定の実施形態ではMTPは、骨格細胞及び平滑筋細胞へのそのペイロード(例えばEno1)の送達を増加させる。特定の実施形態ではMTP、例えば骨格筋標的化ペプチド及び/又は平滑筋標的化ペプチドは、心筋細胞へのそのペイロードの送達を増加させない。MTP、例えば骨格筋、標的化ペプチドは、これだけに限らないが次の配列:ASSLNIA、WDANGKT、GETRAPL、CGHHPVYAC及びHAIYPRHを含むペプチドを含む。好ましい実施形態ではMTPはアミノ酸配列ASSLNIAを含む。

【0078】

本明細書において使用される「ペイロード」は、標的化部分による標的細胞への送達のための部分として理解される。特定の実施形態ではペイロードはペプチド、例えばEno1ペプチドである。特定の実施形態ではペイロードは核酸、例えばEno1ペプチドをコードする核酸である。特定の実施形態ではペイロードは、Eno1ペイロードを伴う標的細胞への送達のための追加的構成成分(例えばデンドリマー、リボソーム、マイクロ粒子)又は薬剤(例えば治療剤)をさらに含む。

【0079】

本明細書において使用される「リンカー」は、ペイロードが標的化部分によって所望の部位に送達されるように標的化部分とペイロードとを十分にごく近接して並置する部分として理解される。特定の実施形態ではリンカーは共有結合リンカー、例えば可逆的架橋薬剤を含む架橋薬剤、ペプチド結合であり、例えばここでペイロードは標的化部分と共翻訳されたタンパク質である。特定の実施形態ではリンカーは、ペイロード又は標的化部分の1つに共有結合で繋がれており、非共有結合で互いに連結されている。特定の実施形態ではリンカーはデンドリマーを含む。特定の実施形態ではデンドリマーは、標的化部分に共有結合で連結されており、非共有結合でペイロード、例えばEno1に連結されている。特定の実施形態ではリンカーはリボソーム又はマイクロ粒子であり、標的化部分はリボソームの表面に露出されており、ペイロード、例えばEno1はリボソーム又はマイクロ粒子に封入されている。特定の実施形態ではリンカー及びEno1は、マイクロ粒子リンカーの表面に存在している。特定の実施形態では標的化部分は、ウイルス粒子の表面に存在しており、ペイロードはEno1をコードしている核酸を含んでいる。

【0080】

本明細書において使用される、「連結した」、「作動可能に連結した」、「繋がれた」などは、記載の構成成分がそれらの目的とする様式で機能できるようにするように複合体中に存在する近位を指す。構成成分は、共有結合(例えばペプチド結合、ジスルフィド結合、非天然化学的連結)、水素結合を通じて(例えばタンパク質のノブイントゥーホール(knob-into-hole)対合、例えば米国特許第5,582,996号参照されたい、ワトソンクリックヌ

10

20

30

40

50

クレオチド対合)又はイオン結合(例えばキレート及び金属)で直接又はリンカー(マイクロ粒子、ビーズ又はデンドリマーを含む高次又はさらに大きな構造への結合のためのリンカーの使用を含む、例えばペプチド配列、典型的には短いペプチド配列、核酸配列又は、化学的リンカー)を通じて連結されてよい。本明細書で使用される複合体の構成成分は、リポソーム及び/又はデンドリマー中及び/又は上にパッケージングされることによって互いに連結されてよく、複合体の構成成分のいくつかは共有結合的に、いくつかは非共有結合的に結合されている場合がある。リンカーは、活性分子間の分離を提供するために使用されてよく、そのため第1の分子を第2の分子に連結することによって、分子の活性は実質的に阻害されない(10%未満、20%未満、30%未満、40%未満、50%未満)。リンカーは、例えばEnolを標的化部分に繋ぐために使用され得る。本明細書において使用される、連結されているが共有結合的に繋がれていない分子は、本発明の試薬が使用される条件、すなわち典型的には生理的条件下で互いに 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 若しくは 10^{-12} 未満又はこれらの値で囲まれる任意の範囲の結合親和性(Kd)を有する。

【0081】

特定の実施形態ではペイロード及び標的化部分は、約1:1モル比で複合体中に存在する。特定の実施形態では標的化部分は、モル過剰のペイロードを有して複合体中に存在する。特定の実施形態ではペイロード対標的化部分の比は、約0.1:1、約0.2:1、約0.3:1、約0.4:1、約0.5:1、約0.6:1、約0.7:1、約0.8:1、約0.9:1、約1:1、約2:1、約3:1、約4:1、約5:1、約6:1、約7:1、約8:1、約9:1、約10:1、約11:1、約12:1、約13:1、約14:1、約15:1、約16:1、約17:1、約18:1、約19:1又は約20:1である。

【0082】

「デンドリマー」は、セントラルコアから放射状に生じる複数の分枝状モノマーから構成されるポリマー分子である。構造及びデンドリマーを生成するために使用される合成方法のために、デンドリマー合成からの産物は理論的に単分散である。デンドリマーのコアが除去されると、デンドロンと称される多数の同一の断片が、セントラルコアの多重度に応じた数だけ残る。コアから周辺外側への移動の際に遭遇する分岐点の数がその世代を、例えばG-1、G-2、G-3などのように規定し、高い世代のデンドリマーはより大きく、より分枝状であり、低い世代のデンドリマーよりも多い末端基を有する。本明細書において使用されるデンドリマーは、好ましくは薬学的に許容されるデンドリマーである。

【0083】

本明細書において使用される「血糖が上昇している対象」又は「血糖の増加」は、病理学的状態と考えられる十分な期間及び頻度について血糖の上昇を有する対象、すなわち十分なインスリンを産生していない又はインスリンに十分に感受性ではなく、そのためグルコースレベルが食事後の長期間、例えば食事後2時間を超えて上昇したままである及び/又は空腹時血糖の上昇を有する対象として理解される。特定の実施形態では、血糖が上昇している対象は、少なくとも100mg/dlの空腹時血糖及び少なくとも140mg/dlの75g経口耐糖能検査での2時間血漿グルコースの1つ又は両方を有する対象として理解される。特定の実施形態では、血糖が上昇している対象は、少なくとも126mg/dlの空腹時血糖、少なくとも200mg/dlの75g経口耐糖能検査での2時間血漿グルコース、又は少なくとも200mg/dlのランダム血漿グルコースの1つ以上を有する対象として理解される。特定の実施形態では血糖が上昇している対象は、少なくとも92mg/dlの空腹時血糖、少なくとも180mg/dlの75g経口耐糖能検査での1時間血漿グルコース、及び少なくとも153mg/dlの75g経口耐糖能検査での2時間血漿グルコースの1つ以上を有する妊娠中の対象として理解される。特定の実施形態では本明細書において使用される血糖が上昇している対象は、完全なインスリン欠失を生じる1型糖尿病又は膵臓疾患を有する対象を含まない。特定の実施形態では本明細書において使用される血糖が上昇している対象は、完全なインスリン欠失を生じる1型糖尿病又は膵臓疾患を有する対象を含む。

【0084】

本明細書において使用される「HbA1cが上昇している対象」又は「A1cが上昇している対象」は、少なくとも5.7%のHbA1cレベルを有する対象として理解される。特定の実施形態

では対象は、少なくとも6.5%のHbA1cレベルを有する。

【0085】

本明細書において使用される「糖尿病」は、1型糖尿病若しくは2型糖尿病のいずれか、又は1型及び2型糖尿病の両方を、任意選択で妊娠糖尿病との組合せで指すと意図される。特定の実施形態では糖尿病は2型糖尿病を含む。特定の実施形態では糖尿病は1型糖尿病を含まない。特定の実施形態では糖尿病は妊娠糖尿病を含む。特定の実施形態では糖尿病は妊娠糖尿病を含まない。特定の実施形態では糖尿病は前糖尿病を含む。特定の実施形態では糖尿病は前糖尿病を含まない。特定の実施形態では糖尿病は前糖尿病、1型糖尿病及び2型糖尿病を含む。特定の実施形態では糖尿病は前糖尿病及び2型糖尿病を含む。

【0086】

本明細書において使用される「インスリン抵抗性」及び「インスリン非感受性」は互換的に使用でき、インスリンの量が正常な対象においてよりも血糖を低下させることにおいて有効でなく、インスリンの欠如によってではない正常範囲を超える血糖の増加を生じる状態、特に病的状態を指す。機序に束縛されることなく状態は典型的にはインスリン受容体を通じるシグナル伝達の低下に関連する。典型的には筋肉及び脂肪細胞でのインスリン抵抗性は、グルコース取り込み、並びにグリコーゲン及びトリグリセリドとしての保存をそれぞれ低減させる。肝臓細胞でのインスリン抵抗性は、グリコーゲン合成の低減、並びにグルコース産生及び血液への放出の抑制の失敗を生じる。

【0087】

インスリン抵抗性は、インスリンの欠如によってではない正常範囲を超える血糖の増加、特に血糖の病理学的増加を同様に生じる「インスリン機能不全」と共に同じ対象にしばしば存在する。インスリン機能不全は、インスリンが存在し、身体によって産生されているインスリン作用の欠如に関連する状態である。それは、膵島細胞の欠如によりインスリンが産生されない1型糖尿病とは別である。

【0088】

本発明の方法の目的のために、対象がインスリン抵抗性/非感受性、インスリン機能不全又は両方を罹患しているかどうかを識別する必要はない。

【0089】

用語「耐糖能障害」(IGT)又は「前糖尿病」は、耐糖能検査を行う場合に、正常と高血糖との間である血糖レベルを有する、すなわち異常な耐糖能、例えば病理学的に異常な耐糖能を有するヒトを記載するために使用される。そのようなヒトは、臨床的に糖尿病を有すると特徴付けられなくても、糖尿病を発症するリスクが高い。例えば耐糖能障害は、患者が110mg/dlより高く126mg/dl(7.00mmol/L)より低い空腹時血糖濃度若しくは空腹時血清グルコース濃度を有する、又は140mg/dl(7.78mmol/L)より高く200mg/dl(11.11mmol/L)より低い2時間食後(postprandial)血糖若しくは血清グルコース濃度を有する状態を指す。耐糖能障害又は空腹時グルコース不良とも称される前糖尿病は、2型真性糖尿病、心血管疾患及び死亡を生じる主なリスク因子である。前糖尿病を効果的に処置することによって2型糖尿病の発症を予防する治療介入を開発することが注目されてきた(Pharmacotherapy, 24:362~71, 2004)。

【0090】

本明細書において使用される「病理学的」状態は、疾患又は状態の臨床的に許容可能な閾値に達する。病理学的状態は、特に長期的に、状態が解消しない、例えば血糖及び/又はHbA1cレベルが正常化されない場合、対象に顕著な有害作用を生じる場合がある。病的状態は治療剤、手術及び/又は生活様式の変化によって回復される可能性がある。病理学的状態は慢性であってもなくてもよい。病理学的状態は可逆的であってもなくてもよい。病理学的状態は末期であってもなくてもよい。

【0091】

「高インスリン血症」は、インスリン抵抗性を有する、正常血糖を有する又は有さない対象において、空腹時又は食後(postprandial)血清又は血漿インスリン濃度が正常のインスリン抵抗性を有さない痩せた個体のものを超えて上昇している(すなわち空腹時血漿グ

10

20

30

40

50

ルコース検査において>100mg/dl又は経口耐糖能検査において>140mg/dl)状態、として定義される。

【0092】

「高血糖」(高い血糖)の状態は、血糖レベルが高すぎる状態である。典型的には高血糖は、血糖レベルが180mg/dlを超えて上昇すると生じる。高血糖の症状は、頻尿、過度の渇き及び長期間にわたる体重減少を含む。

【0093】

「低血糖」(低い血糖)の状態は、血糖レベルが低すぎる状態である。典型的には低血糖は、血糖レベルが70mg/dl未満に下がると生じる。低血糖の症状は、不機嫌、四肢(特に手及び腕)のしびれ、錯乱、震え又はめまいを含む。この状態は、利用可能なグルコースの量を超える過剰なインスリンがある時に生じることから、時にはインスリン反応と称される。

【0094】

本明細書において使用される「HbA1cレベル」又は「A1cレベル」は、過去2~3ヵ月の平均血糖レベルを評価するHbA1c検査から決定されたヘモグロビンA1c(HbA1c)レベルとして理解される。糖尿病を有さないヒトは、典型的には4%~6%の間の範囲のHbA1c値を有する。前糖尿病は、5.7%から6.5%の病理学的HbA1cレベルによって特徴付けられ、6.5%より高いHbA1cレベルは糖尿病の指標となる。HbA1cにおける1%ごとの増加は、およそ30mg/dLの血糖レベル増加、及び持続性の血糖の上昇による合併症のリスクの増加を反映する。好ましくは本発明により処置されている患者のHbA1c値は、9%未満、7%未満、6%未満及び最も好ましくはおよそ5%に低減される。それにより処置されている患者の超過HbA1cレベル(すなわち5.7%を超過しているHbA1cレベル)は、処置前のそのようなレベルと比較して(すなわち、処置前レベル-処置後レベル/処置前レベル)好ましくは少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上低下されている。

【0095】

本明細書において使用される用語「対象」は、獣医学対象を含むヒト及び非ヒト動物を指す。用語「非ヒト動物」は、すべての脊椎動物、例えば非ヒト霊長類、マウス、ウサギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類及びは虫類などの哺乳動物及び非哺乳動物を含む。好ましい実施形態では対象はヒトであり、患者と称される場合がある。

【0096】

本明細書において使用される用語「処置(treat)」、「処置すること(treating)」又は「処置(treatment)」は、これだけに限らないが疾患又は状態の1つ以上の徴候又は症状の緩和又は回復、疾患の程度の減少、疾患の安定(すなわち悪化していない)状態、疾患状態の回復又は寛解を含む有益な又は所望の臨床結果を得るための作用を好ましくは指す。本明細書において使用される処置は、インスリン抵抗性の低減、インスリン感受性の増加、インスリン欠失の減少、HbA1cレベルの改善又は正常化、血糖レベル(例えば食後血糖レベル、空腹時血糖レベル、耐糖能)の改善又は正常化及び糖尿病の徴候又は症状の少なくとも1つの回復の1つ以上を含み得る。2型糖尿病を含む糖尿病の処置における治療目標は、HbA1cレベル<6.5%、食前血糖80~120mg/dl及び食事2時間後の血糖<140mg/dlを含む。前糖尿病の処置における治療目標は、HbA1c、血糖レベル及びグルコース応答の正常レベルへの低減を含む。処置は、治療的である必要はなく、処置の理想的な治療的目標に達する必要はない。処置結果は定量的に決定される必要はない。しかし特定の実施形態では処置結果は、範囲の端の正常値に対するパーセント改善を考慮することによって定量され得る。例えば代謝症候群は、いくつかの測定値(例えば血糖レベル、HbA1cレベル)の過剰及び他の測定値(例えばインスリン応答)の欠失によって特徴付けられる。150mg/dlの空腹時血糖レベルを有する対象は、50mg/dl(150mg/dl~100mg/dl、正常最大血糖レベル)の超過空腹時血糖を有する。過剰な血糖の20%低減は、過剰な血糖での10mg/dl低減である。同様の算出が他の値について行われる場合がある。

【0097】

本明細書において使用される「グルコースレベルを低減する」は、正常化されたグルコ

ースレベルを達するために、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%以上、グルコースの過剰を低減することを意味する。すなわちグルコースレベルは150mg/dlを超えない。望ましくは、食事前グルコースレベルは、血糖正常レベル、すなわち150から60mg/dLの間、140から70mg/dLの間、130から70mg/dLの間、125から80mg/dLの間及び好ましくは120から80mg/dLの間に低減される。グルコースレベルにおけるそのような低減は、血液からのグルコースのクリアランスに関連する生物学的活性のいずれか1つの増加によって得られる可能性がある。したがって、グルコースレベルを低減する能力を有する薬剤は、インスリン産生、分泌又は作用を増加させる可能性がある。インスリン作用は、例えば末梢組織によるグルコース取り込みの増加によって及び/又は肝臓グルコース産生の低減によって増加され得る。代替的に薬剤は、腸管からの炭水化物の吸収を低減でき、グルコーストランスポーター活性を変更でき(例えばGLUT4発現、内在性活性又は移行を増加させることによる)、インスリン感受性組織の量を増加でき(例えば筋細胞又は脂肪細胞分化を増加させることによる)又は脂肪細胞若しくは筋細胞における遺伝子転写を変更できる(例えば代謝経路遺伝子の脂肪細胞発現由来の因子の分泌の変更)。望ましくは、薬剤は、グルコースのクリアランスに関連する活性の1つより多くを増加させる。

【0098】

「グルコースレベルが低減されるようにインスリンシグナル伝達経路を変更する」によって、全体としての結果が血漿からのグルコースのクリアランスにおける増加及び血糖正常化であるように、インスリンシグナル伝達に参与する活性のいずれか1つを(増加させる又は低減することによって)変更することが意味される。例えばインスリンシグナル伝達経路を変更すること、それによりインスリン産生、分泌若しくは作用における増加、末梢組織によるグルコース取り込みの増加、肝臓グルコース産生の低減又は腸管からの炭水化物の吸収の低減を生じる。

【0099】

「治療有効量」は、対象において疾患を処置するために十分な量である。治療有効量は1回以上の投与において投与され得る。

【0100】

2型糖尿病に対する多数の処置が薬物及び行動的介入の両方を含んで当技術分野において公知である。2型糖尿病の処置のための薬物は、これだけに限らないがメグリチニド(regaglinide (Prandin)及びナテグリニド(Starlix);スルホニル尿素(glipizide (Glucotrol)、glimepiride(Amaryl)及びglyburide(DiaBeta、Glynase));ジペプチジルペプチダーゼ-4(DPP-4)阻害物質(saxagliptin(Onglyza)、シタグリブチン(Januvia)及びリナグリブチン(Tradjenta));ピグアナイド(metformin (Fortamet、Glucophage));チアゾリジンジオン(rosiglitazone (Avandia)及びpioglitazone(Actos));並びにアルファグルコシダーゼ阻害物質(acarbose(Precose)及びmiglitol(Glyset))を含む。インスリンは、典型的には2型糖尿病の後期の処置においてだけ使用され、速効型インスリン(insulin aspart (NovoLog)、insulin glulisine(Apidra)及びinsulin lispro(Humalog));短時間作用性インスリン(insulin regular(Humulin R、Novolin R));中間型インスリン(insulin NPH human(Humulin N、Novolin N))並びに長時間作用性インスリン(insulin glargine(Lantus)及びinsulin detemir(Levemir))を含む。糖尿病に対する処置は、運動を含む行動修正及び、薬物又は手術の使用によって促進され得る体重減少も含んでよい。血糖の上昇及び糖尿病のための処置は、組み合わせられ得る。例えば薬物療法は、行動修正療法と組み合わせられ得る。

【0101】

本明細書において使用される「診断する」などは、疾患、障害又は状態の徴候又は症状などの少なくとも1つの指標の存在に基づいて疾患、障害又は状態を有する対象を同定するための観察、検査又は状況に基づく対象の状態の臨床的又は他の評価を指す。典型的には本発明の方法を使用して診断することは、本明細書で提供する方法を併用する疾患、障害又は状態の複数の指標についての対象の観察を含む。診断方法は、疾患が存在する又はしない指標を提供する。単一の診断検査は、検査される対象の疾患状態に関する確定的結論を典型的には提供しない。

【0102】

本明細書において使用される「モニタリング」は、第1の時点での及び後の第2の時点での対象における疾患の少なくとも1つの徴候又は症状を評価すること、状態の徴候(複数可)又は症状(複数可)の重症度を比較すること並びに経時的にさらに重症又は軽症になる状態を決定することとして理解される。

【0103】

用語「投与する」、「投与すること」又は「投与」は、対象の系への又は対象中若しくは上の具体的な領域への医薬組成物又は薬剤の送達の任意の方法を含む。特定の実施形態では薬剤は経腸で又は非経口で投与される。本発明の特定の実施形態では薬剤は、静脈内に、筋肉内に、皮下に、皮内に、鼻腔内に、経口で、経皮的又は粘膜的に投与される。特定の好ましい実施形態では薬剤は、注射又は注入によって、例えば静脈内に、筋肉内に、皮下に投与される。特定の実施形態では投与はポンプの使用を含む。特定の実施形態では薬剤は、局所に又は全身性に投与される。薬剤を投与することは、協力して作業する多数の人々によって実施され得る。薬剤を投与することは、直接又は他を通じて具体的な薬剤を摂取するために、例えば経口送達、皮下送達、セントラルラインを通じた静脈内送達によるなどの自己送達(self-delivery)による、又は例えば静脈内送達、筋肉内送達など訓練を受けた専門家による送達のためのいずれかで、例えば対象に投与される薬剤を処方すること及び/又は説明書を提供することを含む。

【0104】

本明細書において使用される用語「同時投与」は、糖尿病、前糖尿病、耐糖能障害又はインスリン抵抗性の処置のための薬剤の投与の前、同時又は実質的に同時、続く又は断続的なEno1の投与を指す。本明細書で提供するEno1製剤は、糖尿病、前糖尿病、耐糖能障害又はインスリン抵抗性の処置のための少なくとも1つの他の治療薬剤との併用療法において使用され得る。Eno1及び/又はその薬学的製剤及び他の治療薬剤は、相加的に又はより好ましくは相乗的に作用する場合がある。一実施形態ではEno1及び/又はその製剤は、糖尿病、前糖尿病、耐糖能障害又はインスリン抵抗性の処置のための別の治療薬剤の投与と同時に投与される。別の実施形態ではEno1及び/又はその薬学的製剤は、糖尿病、前糖尿病、耐糖能障害又はインスリン抵抗性の処置のための別の治療薬剤の投与の前又は続いて投与される。

【0105】

明細書において使用される用語「試料」は、対象から単離された類似する液体、細胞又は組織の集合物を指す。用語「試料」は、対象由来の任意の体液(例えば尿、血清、血液、リンパ、婦人科液、囊胞液、腹水(ascetic fluid)、眼液並びに気管支洗浄及び/又は腹腔リンスによって回収される液体)、腹水、組織試料又は細胞を含む。他の対象試料は、涙液、血清、脳脊髄液、便、痰、及び細胞抽出物を含む。具体的な実施形態では試料は尿又は血清である。特定の実施形態では試料は細胞を含む。他の実施形態では試料は細胞を含まない。

【0106】

本明細書において使用される用語「対照試料」は、例えば耐糖能障害、血糖の増加、インスリン抵抗性、糖尿病若しくは前糖尿病のいずれも罹患していない健康な対象由来の試料、又は対象の早い時点から、例えば処置前、処置のより早い段階での対象由来の試料を含む任意の臨床的に関連する比較試料を指す。対照試料は、キットと共に提供される精製された試料、タンパク質、及び/又は核酸であってよい。そのような対照試料は、例えば検査試料中の分析物の定量的測定のために希釈系列に希釈されてよい。対照試料は1つ以上の対象由来の試料を含んでよい。対照試料は、評価される対象由来のより早い時点で作られた試料であってよい。例えば対照試料は、異常な血糖レベル又はA1cレベルが生じる前、疾患のより早期の段階で又は処置若しくは一部の処置投与の前に、評価される対象から取られた試料であってよい。対照試料は、動物モデル由来又は耐糖能障害、血糖の増加、インスリン抵抗性、糖尿病若しくは前糖尿病の動物モデルからの組織若しくは細胞株由来の試料であってよい。測定の群からなる対照試料におけるEno1活性又は発現のレベルは

、例えば平均、中央値又はモーダル値を含む中心傾向の測定などの、例えば任意の適切な統計的測定に基づいて決定されてよい。

【0107】

用語「対照レベル」は、対象又は対象試料における耐糖能障害、血糖の増加、インスリン抵抗性、糖尿病又は前糖尿病の徴候の認められた又は予め決定されたレベルを指す。次のレベルが正常レベルと考えられている：

- 空腹時血糖100mg/dl以下
- HbA1c 5.7%以下
- 経口耐糖能検査140mg/dl以下。

【0108】

これらのレベルを超えるレベルは病理学的レベルであると理解される。

【0109】

本明細書において使用されるバイオマーカーの「予め定めた閾値」は、正常又は健康な対象から得られた、例えば異常な血糖を有さない対象から得られた対応する対照/正常試料又は対照/正常試料の群における、バイオマーカー(例えば生物学的試料における発現レベル又は量(例えばng/ml))又は血糖の上昇の他の指標のレベルを指す。予め定めた閾値は、生物学的試料におけるマーカーレベルの測定より先に又は同時に決定され得る。対照試料は、先行する時点での同じ対象から又は異なる対象からであってよい。

【0110】

本明細書において使用される「より早い時点」で得られた試料は臨床関連情報が後の時点と比較してより早い時点由来の試料において得られうる十分な時間だけ過去に得られた試料である。特定の実施形態ではより早い時点は、少なくとも4週間早い。特定の実施形態ではより早い時点は、少なくとも6週間早い。特定の実施形態ではより早い時点は、少なくとも2ヵ月早い。特定の実施形態ではより早い時点は、少なくとも3ヵ月早い。特定の実施形態ではより早い時点は、少なくとも6ヵ月早い。特定の実施形態ではより早い時点は、少なくとも9ヵ月早い。特定の実施形態ではより早い時点は、少なくとも1年早い。複数の対象試料(例えば3、4、5、6、7個以上)を経時的に定期的又は不定期に得ることができ、マーカーレベルにおける変化の傾向について分析され得る。具体的な対象の検査についての適切な間隔は、通常の検討事項に基づいて当業者によって決定され得る。

【0111】

本明細書において使用される用語「得ること」は、製造すること、購入すること又は他の場合には所持するようになることを指すと理解される。

【0112】

本明細書において使用される「検出する」、「検出」などは、試料中の具体的な分析物、例えば試料中のEno1発現又は活性レベルの同定のために実施されるアッセイを指すと理解される。試料中で検出された分析物又は活性の量は、なし又はアッセイ若しくは方法の検出レベルより下であってよい。検出すること又は検出は、グルコース及びHbA1cのレベルを測定することを含む。

【0113】

用語「調節する(modulate)」又は「調節(modulation)」は、レベルの上方制御(すなわち活性化若しくは刺激)、下方制御(すなわち阻害若しくは抑制)又は組合せ若しくは別々でのその2つを指す。「調節物質(modulator)」は調節する化合物又は分子であり、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、活性化因子、刺激因子、抑制因子又は阻害物質であってよい。

【0114】

用語「発現」は本明細書においてポリペプチドがDNAから産生される工程を意味して使用される。工程は、mRNAへの遺伝子の転写及びこのmRNAのポリペプチドへの翻訳を含む。それが使用される内容に応じて「発現」は、RNA又はタンパク質又は両方の産生を指す場合がある。

【0115】

10

20

30

40

50

用語「遺伝子の発現レベル」又は「遺伝子発現レベル」は、mRNA及びmRNA前駆体新生転写物(複数可)、転写プロセッシング中間体、成熟mRNA(複数可)並びに分解産生物のレベル又は細胞中の遺伝子によってコードされているタンパク質のレベルを指す。

【0116】

本明細書において使用される用語「増幅」は、標的核酸配列又はその相補物又はその断片の複数の複製物(「増副産物」)を得るための任意の公知のin vitro手順を指す。in vitro増幅は、完全な標的領域配列又はその相補物に満たないものを含有する場合がある増幅された核酸の産生を指す。公知のin vitro増幅方法は、例えば転写媒介増幅、レプリカーゼ媒介増幅、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅、リガーゼ連鎖反応(LCR)増幅及び鎖置換増幅(複数鎖置換増幅法(MSDA)を含むSDA)を含む。レプリカーゼ媒介増幅は、自己複製RNA分子及びQ- β -レプリカーゼなどのレプリカーゼを使用する(例えばKramer et al., 米国特許第4,786,600号)。PCR増幅は、周知であり、DNA又はcDNAの2つの相補鎖の複数の複製物を合成するためにDNAポリメラーゼ、プライマー及び熱サイクルを使用する(例えばMullis et al., 米国特許第4,683,195号、第4,683,202号及び第4,800,159号)。LCR増幅は、ハイブリダイゼーション、ライゲーション及び変性の複数のサイクルを使用することによって標的及びその相補鎖を増幅するために少なくとも4個の別々のオリゴヌクレオチドを使用する(例えばEP特許出願公開第0320308号)。SDAは、プライマーが制限エンドヌクレアーゼのための認識部位を含有し、それが標的配列を含むヘミ修飾DNA二重鎖の1本の鎖にエンドヌクレアーゼがニックを入れられるようにし、一連のプライマー伸長及び鎖置換ステップでの増幅が続く方法である。(例えばWalker et al., 米国特許第5,422,252号)。2つの他の公知の鎖置換増幅方法はエンドヌクレアーゼニックングを必要としない(Dattagupta et al., 米国特許第6,087,133号及び米国特許第6,124,120号(MSDA))。当業者は、本発明のオリゴヌクレオチドプライマー配列が、ポリメラーゼによるプライマー伸長に基づく任意のin vitro増幅方法において容易に使用され得ることを理解する(一般にKwoh et al., 1990, Am. Biotechnol. Lab. 8:14~25及び(Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173~1177; Lizardi et al., 1988, BioTechnology 6:1197~1202; Malek et al., 1994, Methods Mol. Biol., 28:253~260;及びSambrook et al., 2000, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, Third Edition, CSH Laboratoriesを参照されたい)。一般的に当技術分野において公知であるとおり、オリゴは選択された条件下で相補的配列に結合するように設計される。

【0117】

本明細書において使用される用語「抗原」は、対象において抗体応答を引き起こす又は抗体によって認識及び結合される分子、例えばペプチド、ポリペプチド、タンパク質、断片又は他の生物学的部分を指す。

【0118】

本明細書において使用される用語「相補性」は、2本の核酸鎖の領域間又は同じ核酸鎖の2つの領域間の配列相補性の幅広い概念を指す。第1の核酸領域のアデニン残基は、残基がチミン又はウラシルである場合に第1の領域に逆平行である第2の核酸領域の残基と特異的水素結合(「塩基対合」)を形成できることが公知である。同様に、第1の核酸鎖のシトシン残基は、残基がグアニンである場合に第1の鎖に逆平行である第2の核酸鎖の残基と塩基対合できることが公知である。核酸の第1の領域は同じ又は異なる核酸の第2の領域に相補的であり、2つの領域が逆平行様式で配置される場合に、第1の領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基は第2の領域の残基と塩基対合できる。好ましくは第1の領域は第1の部分を含み、第2の領域は第2の部分を含み、それにより第1の及び第2の部分が逆平行に配置される場合、第1の部分のヌクレオチド残基の少なくとも約50%及び好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%又は少なくとも約95%は、第2の部分中のヌクレオチド残基と塩基対合できる。より好ましくは第1の部分のすべてのヌクレオチド残基は、第2の部分中のヌクレオチド残基と塩基対合できる。

【0119】

本明細書で使用される句「特異的結合」又は「特異的に結合する」は、抗体及びタンパ

ク質又はペプチドの相互作用に関連して使用される場合に相互作用がタンパク質上の具体的な構造(すなわち抗原決定基又はエピトープ)の存在に依存すること、言い換えると抗体がタンパク質全般よりも特異的なタンパク質構造を認識及びそれに結合していることを一般に意味する。例えば抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、標識化「A」を含有する反応物中のエピトープA(又は遊離、未標識A)を含有するタンパク質、及び抗体の存在は、抗体に結合する標識Aの量を低減する。

【0120】

句「特異的同定」は、検出方法が診断上で有用であるように十分に低いアッセイのバックグラウンド及び使用された試薬の交差反応性を伴う目的のマーカの検出として理解される。特定の実施形態ではマーカの特異的同定のための試薬は、マーカの1つだけのアイソフォームに結合する。特定の実施形態ではマーカの特異的同定のための試薬は、マーカの1つより多いアイソフォームに結合する。特定の実施形態ではマーカの特異的同定のための試薬は、マーカの公知のすべてのアイソフォームに結合する。

10

【0121】

本明細書において使用される句「血糖の上昇を有することが疑われる対象」は、血糖の上昇の指標となる若しくはそれに関連する1つ以上の徴候若しくは症状を示す、又は血糖の上昇についてスクリーニングされる(例えば通常検診の際に)対象を指す。血糖の上昇を有することが疑われる対象は、1つ以上のリスク因子も有する場合がある。血糖の上昇を有することが疑われる対象は、一般に異常なグルコースレベル、代謝又は応答について検査されていない。しかし「血糖の上昇を有することが疑われる対象」は、最初の診断(例えば確認されていない血糖の上昇が1回発生)を受けているが、グルコースの上昇の程度は既知ではない個体を包含する。用語は、1度血糖の上昇を有した人々(例えば血糖の上昇について処置され、正常血糖及び/又はHbA1cレベルを、例えば少なくとも3ヵ月、少なくとも6ヵ月など、長期間維持している個体)をさらに含む。

20

【0122】

冠詞「a」、「an」及び「the」は、他に反対と明らかに示す場合を除いて、冠詞の文法的目的の1つ又は1つより多く(すなわち少なくとも1つの)を指して本明細書において使用される。例として、「要素(an element)」は1つの要素又は1つより多い要素を意味する。

【0123】

用語「含む」は、本明細書において句「これだけに限らないが含む」を意味して使用され、互換的に使用される。

30

【0124】

用語「又は」は、内容が他を明確に示す場合を除いて本明細書において用語「及び/又は」を意味して使用され、互換的に使用される。

【0125】

用語「などの」は、句「これだけに限らないが～など」を意味して使用され、互換的に使用される。

【0126】

具体的に述べる又は内容から明らかである場合を除いて、本明細書において使用される用語「約」は、当技術分野における通常の許容範囲内、例えば平均の2標準偏差内にあるとして理解される。約は、述べられた値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%又は0.01%以内として理解されてよい。内容から明らかである場合を除いて、本明細書で提供されるすべての数値は用語「約」によって改変され得る。

40

【0127】

本明細書における異形(variable)の任意の定義での化学基(複数可)の列举の記述は、任意の単一の基又は列举された基の組合せとしてのその異形(variable)の定義を含む。異形又は態様についての実施形態の記述は、任意の単一実施形態又は任意の他の実施形態若しくはその部分との組合せとしての実施形態を含む。

【0128】

本明細書で提供する任意の組成物又は方法は、本明細書で提供する他の組成物及び方法

50

のいずれかの1つ以上と組み合わせられ得る。

【0129】

本明細書で提供する範囲は、範囲内のすべての値についての略記であるとして理解される。例えば1から50の範囲は、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又は50からなる群由来の任意の数、数の組合せ又は部分的な範囲を含むと理解される。

【0130】

本発明の好ましい実施形態について詳細に述べられる。本発明は好ましい実施形態と関連して記載されるが、本発明をこれらの好ましい実施形態に限定すると意図されないことは理解される。反対に、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神及び範囲内に含まれ得る代替物、変更及び等価物を網羅することは意図される。

【0131】

IIA. エノラーゼ1

ENO1L、アルファエノラーゼ、エノラーゼアルファ、タウクリスタリン、非神経性エノラーゼ(NNE)、アルファエノラーゼ様1、ホスホピルベートヒドラターゼ(PPH)、プラスミノーゲン結合タンパク質、MYCプロモーター結合タンパク質1(MPB1)及び2-ホスホ-D-グリセレートヒドロ-リアーゼとしても公知のエノラーゼ1、(アルファ)は、哺乳動物において見出される3つのエノラーゼアイソザイムの1つである。各アイソザイムは、2アルファ、2ガンマ又は2ベータサブユニットからなるホモ二量体であり、解糖酵素として機能する。アルファエノラーゼは、付加的にモノマー形態で構造的な水晶体タンパク質(タウクリスタリン)として機能する。この遺伝子の代替的スプライシングは、c-mycプロモーターに結合することが示されており、腫瘍抑制因子として機能する短いアイソフォームを生じる。染色体1の長腕上の1つを含むいくつかの偽遺伝子が同定されている。アルファエノラーゼは、橋本脳症において自己抗原として同定されている。ヒトEno1に関するさらなる情報は、例えばNCBI遺伝子データベースにおいてGene ID No. 2023に見出すことができる(参照により本明細書に組み込まれる本出願の出願日に利用可能であるバージョンwww.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2023を参照されたい)。

【0132】

Eno1変種

ヒトEno1の2つのアイソフォームが公知である。ヒト(Homo sapiens)エノラーゼ1、(アルファ)(ENO1)のタンパク質及びmRNA配列、転写物変種1、mRNAは、GenBankアクセッション番号NM_001428に見出し得る(参照により本明細書に組み込まれる本出願の出願日に利用可能であるバージョンwww.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001428.3を参照されたい)。この変種は、長いアイソフォームをコードしており、サイトゾルに局在しており、アルファエノラーゼ活性を有する。このアイソフォームのモノマー形態が構造的な水晶体タンパク質(タウクリスタリン)として、二量体形態がエノラーゼとして機能することが報告されている。本発明の好ましい実施形態ではEno1はEno1の転写物変種1である。

【0133】

ヒト(Homo sapiens)エノラーゼ1、(アルファ)(ENO1)のタンパク質及びmRNA配列、転写物変種2、mRNAは、GenBankアクセッション番号NM_001201483に見出し得る(参照により本明細書に組み込まれる本出願の出願日に利用可能であるバージョンwww.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001201483.1を参照されたい)。この変種は、変種1と比較して5'末端で異なっており、インフレーム下流開始コドンから翻訳を開始し、短いアイソフォーム(MBP-1)を生じる。このアイソフォームは、核に局在しており、そのプロモーターに結合することによってc-myc癌原遺伝子の転写抑制因子として機能する。本発明の特定の実施形態ではEno1はEno1の転写物変種2である。

【0134】

Eno1タンパク質のいくつかの追加的変種は、例えばUniProtKB/Swiss-Protデータベースにアクセッション番号P06733で記載されている。Eno1タンパク質変種の例は下の表1に示

されている。

【0135】

【表1】

表1. Enol変種

	AA残基	修飾
AA修飾	2	N-アセチルセリン
AA修飾	5	N6-アセチルリジン
AA修飾	44	ホスホチロシン
AA修飾	60	N6-アセチルリジン、代替
AA修飾	60	N6-サクシニルリジン、代替
AA修飾	64	N6-アセチルリジン
AA修飾	71	N6-アセチルリジン
AA修飾	89	N6-アセチルリジン、代替
AA修飾	89	N6-サクシニルリジン、代替
AA修飾	92	N6-アセチルリジン
AA修飾	126	N6-アセチルリジン
AA修飾	193	N6-アセチルリジン
AA修飾	199	N6-アセチルリジン
AA修飾	202	N6-アセチルリジン
AA修飾	228	N6-アセチルリジン、代替
AA修飾	228	N6-サクシニルリジン、代替
AA修飾	233	N6-アセチルリジン、代替
AA修飾	233	N6-マロニルリジン、代替
AA修飾	254	ホスホセリン
AA修飾	256	N6-アセチルリジン
AA修飾	263	ホスホセリン
AA修飾	272	ホスホセリン
AA修飾	281	N6-アセチルリジン
AA修飾	285	N6-アセチルリジン
AA修飾	287	ホスホチロシン
AA修飾	335	N6-アセチルリジン
AA修飾	343	N6-アセチルリジン
AA修飾	406	N6-アセチルリジン
AA修飾	420	N6-アセチルリジン、代替
AA修飾	420	N6-マロニルリジン、代替
AA修飾	420	N6-サクシニルリジン、代替
天然変種	177	N→K. 変種rs11544513[dbSNP Ensembl]に対応する

10

20

30

40

天然変種	325	P→Q. 変種rs11544514[dbSNP Ensembl]に対応する
変異導入	94	M→I:MBP1タンパク質産生 MBP1タンパク質を産生しない、I-97と関連する場合
変異導入	97	M→I:MBP1タンパク質産生 MBP1タンパク質を産生しない、I-94と関連する場合
変異導入	159	劇的に減少した活性レベル
変異導入	168	劇的に減少した活性レベル
変異導入	211	劇的に減少した活性レベル
変異導入	345	劇的に減少した活性レベル
変異導入	384	L→A:転写抑制及び細胞増殖阻害の消失、A-388と関連する場合
変異導入	388	L→A:転写抑制及び細胞増殖阻害の消失、A-384と関連する場合
変異導入	396	劇的に減少した活性レベル

【0136】

本発明の特定の実施形態ではEno1は表1に列挙する変種の内の1つである。

【0137】

Eno1活性

Eno1は、異化分解糖系の最後のステップで2-ホスホ-D-グリセレート(PGA)のホスホエノールピルベート(PEP)への脱水を触媒する鍵となる解糖酵素である。Diaz-Ramos et al., 2012, J Biomed Biotechnol. 2012: 156795及び図33。エノラーゼ酵素は、Emden Mayerhoff-Parnas解糖系(異化方向)においてPGAのPEPへの脱水を触媒する。糖新生の際の同化経路(逆反応)では、Eno1はPEPのPGAへの水和を触媒する。したがってEno1は、ホスホピルベートヒドラーゼとしても公知である。金属イオンは、エノラーゼ活性の増加を損なう補因子であり、そのためEno1金属活性化金属酵素とも呼ばれる。マグネシウムは最も高い活性をもたらす天然補因子であり、酵素が触媒的に活性になるために必要とされる。酵素活性に参与する追加的金属イオンの相対活性化強度プロフィールは、次の順 $Mg^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Fe(II)^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+}$ 、 Ni^{2+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 及び他のほとんどの二価金属イオン、であることが明らかである。エノラーゼによって触媒される反応では、PGAのカルボキシレート基に隣接する炭素由来のアルファプロトンは除去され、PGAはエノラートアニオン中間体に転換される。この中間体は、ラセミ化、シクロ異性化及び水又はアンモニアのベータ脱離を含む種々の化学的反応においてさらにプロセッシングされる。Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology database、atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_ENO1.htmlを参照されたい。

【0138】

酵素的に活性なエノラーゼは二量体(ホモ又はヘテロ二量体)形態で存在し、逆平行様式で互いに向き合っている2つのサブユニットからなる。酵母及びヒト由来エノラーゼの結晶構造は、決定されており、触媒機序は提案されている。上に引用のDiaz-Ramos et al. この酵素の触媒活性に参与している5個の残基は、進化を通じて高度に保存されている。in vitro研究は、位置Glu168、Glu211、Lys345、Lys396又はHis159で異なっている変異体エノラーゼ酵素が、劇的に減少したレベルを実証することを明らかにした。エノラーゼの複合的に保存された部分は、エノラーゼの活性部位のコンホメーション変化に参与し、基質又はその類似物の結合を可能にする2つの Mg^{2+} イオンである。上に引用のAtlas of Genetics and Cytogenetics in Oncologyデータベース。特定の実施形態では本発明の組成物は、金属イオン補因子を含む。金属イオン補因子は、組成物中のEno1の安定性増加及び/又はin vivoでのEno1の活性の増加を提供する。一実施形態では金属イオン補因子は、二

10

20

30

40

50

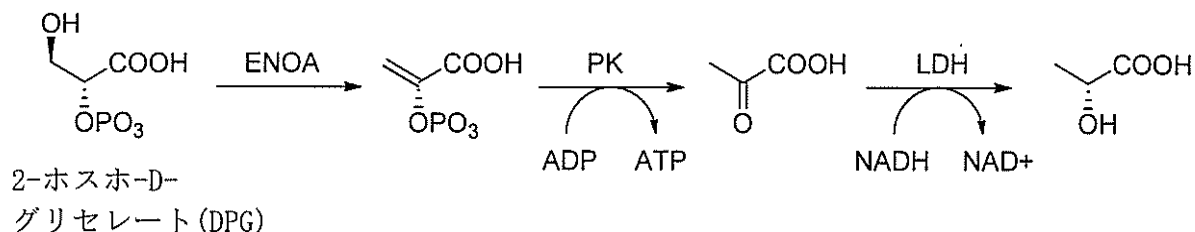
価である。一実施形態では二価金属イオン補因子は、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 $Fe(II)^{2+}$ 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 又は Ni^{2+} である。一実施形態では金属イオン補因子は、三価、例えば Sm^{3+} 又は Tb^{3+} である。

【0139】

Eno1活性は、例えばピルベートキナーゼ(PK)/乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)アッセイを使用して決定され得る。このエノラーゼアッセイに関する反応は下に示されている。

【0140】

【化1】



10

【0141】

NADHの NAD^+ への転換の反応速度は、例えばPhoton Technology International, Inc. (pti-nj.com)からのPTI Quantamaster 40 spectrophotometerを使用することによってNADHの蛍光の減少を測定することによって決定され得る。比色分析ピルベートキナーゼ/乳酸デヒドロゲナーゼアッセイによってEno1活性を測定するためのキットは、例えばABCAM (Cambridge, MA、カタログ番号ab117994)から商業的に入手できる。ABCAM Eno1活性アッセイは下の実施例5にさらに記載される。

20

【0142】

Eno1活性は、実施例2に記載のとおりヒト骨格筋筋管(HSMM)でのグルコース取り込みへのEno1の効果を測定することによっても決定され得る。

【0143】

特定の実施形態ではEno1又はその断片は、精製された内在性ヒトEno1ポリペプチドの活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、300%、400%又は500%を有する。特定の実施形態ではEno1、その断片及び精製された内在性ヒトEno1ポリペプチドの活性は、ピルベートキナーゼ/乳酸デヒドロゲナーゼアッセイ又は上に記載のHSMMグルコース取り込みアッセイによって決定され得る。

30

【0144】

特定の実施形態では、本明細書に記載のデンドリマーと複合体となっているEno1ポリペプチドは、デンドリマーとの複合体となっていない精製された内在性Eno1ポリペプチドの活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、300%、400%又は500%を有する。特定の実施形態では、デンドリマーと複合したEno1ポリペプチドの活性及びデンドリマーとの複合体となっていない精製された内在性Eno1ポリペプチドの活性は、ピルベートキナーゼ/乳酸デヒドロゲナーゼアッセイ又は上に記載のHSMMグルコース取り込みアッセイによって決定される。

40

【0145】

特定の実施形態では本明細書に記載のデンドリマー及び標的化ペプチドと複合体となっているEno1ポリペプチドは、デンドリマー又は標的化ペプチドとの複合体となっていない精製された内在性Eno1ポリペプチドの活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、300%、400%又は500%を有する。特定の実施形態ではデンドリマー及び標的化ペプチドと複合体となっているEno1ポリペプチドの活性及びデンドリマー又は標的化ペプチドとの複合体となっていない精製された内在性Eno1ポリペプチドの活性は、上に記載のピルベートキナーゼ/乳酸デヒドロゲナーゼアッセイ又はHSMMグルコース取り込みアッセイによって

50

決定される。

【0146】

一実施形態では、金属イオン補因子(例えば二価金属イオン補因子、例えば Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 $Fe(II)^{2+}$ 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 若しくは Ni^{2+} 又は三価金属イオン補因子、例えば Sm^{3+} 若しくは Tb^{3+})を含む本発明の組成物中のEno1又はその断片は、精製された内在性ヒトEno1ポリペプチドの活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、300%、400%又は500%を有する。特定の実施形態では、上に記載の金属イオン補因子を含む組成物中のEno1又はその断片の活性及び精製された内在性ヒトEno1ポリペプチドの活性は、上に記載のピルベートキナーゼ/乳酸デヒドロゲナーゼアッセイ又はHSMMグルコース取り込みアッセイによって決定される。

10

【0147】

グルコース流

筋肉グルコース取り込みの調節は:(1)筋肉へのグルコースの送達、(2)グルコーストランスポートーGLUT4による筋肉へのグルコースの輸送及び(3)ヘキソキナーゼ(HK)による筋肉内のグルコースのリン酸化からなる3ステップ工程を含む。筋肉グルコース取り込みの生理学的調節は、血液から間質、細胞内腔へのグルコース移動を必要とし、次いでG6Pにリン酸化される。血糖濃度、筋肉血流及び毛細血管の筋肉への動員は、血液から間質へのグルコース移動を決定する。血漿膜GLUT4含有量は、細胞へのグルコース輸送を制御する。筋肉ヘキソキナーゼ(HK)活性、細胞性HK区画化及びHK阻害物質、G6Pの濃度は、グルコースをリン酸化する能力を決定する。これらの3ステップー送達、グルコースの輸送及びリン酸化ーは、グルコース流を含み、3つすべてのステップは、グルコース流コントロールのために重要である。しかしグルコースリン酸化の下流ステップは、グルコース取り込みにも影響を与える場合がある。例えば解糖又はグリコーゲン合成の促進は、G6Pを低減でき、HK活性を増加させることができ、グルコースリン酸化の能力を増加させることができ、筋肉グルコース取り込みを刺激する可能性がある。Wasserman et al., 2010, J Experimental Biology, Vol. 214, pp. 254~262。

20

【0148】

本発明は、グルコーストランスポートーGLUT1及びGLUT4並びにヘキソキナーゼHK2の発現の増加、並びに解糖系中間体G6P及びPEPのレベルの増加を含んで、Eno1がグルコース経路のいくつかの構成成分に影響を与え、それによりEno1処置がグルコース流を増加させるように作用することを示しているという発見に、少なくとも部分的に基づいている。

30

【0149】

本発明は、Eno1が正常な対象由来の筋細胞と2型糖尿病を有する対象由来の筋細胞とは異なって制御されているという発見に少なくとも部分的に基づいている。本発明は、Eno1での筋細胞の処置が細胞へのグルコース取り込みを増加させ、食餌性肥満を有するマウスへのEno1の投与が耐糖能及びインスリン応答を正常化するという驚くべき発見にさらに基づいている。

【0150】

したがって本発明は、対象へのEno1の投与による、少なくとも1型糖尿病、前糖尿病、2型糖尿病及び妊娠糖尿病を含む糖尿病に典型的には関連する血糖の上昇の処置のための方法を提供する。さらに本発明は、哺乳動物における血糖の上昇状態、例えば糖尿病を診断及び/又はモニタリング(例えば疾患進行又は処置のモニタリング)及び/又は予測するための方法を提供する。本発明は、血糖が上昇している対象の血液又は血清中のEno1のレベルに関連する診断情報に基づいて処置する又は治療レジメンを調整するための方法も提供する。本発明は、本発明の方法を実行するための群(panel)及びキットをさらに提供する。

40

【0151】

本発明は、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを含む、対象においてグルコース流を増加させるための方法も提供する。特定の実施形態では対象に投与される医薬組成物は、本明細書に記載の医薬組成物のいずれかである。本発明は、対象の骨

50

格筋細胞におけるグルコース流を増加させる方法であって、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを含む方法も提供する。特定の実施形態では対象に投与される医薬組成物は、本明細書に記載の医薬組成物のいずれかである。

【0152】

本発明は、対象の骨格筋細胞における解糖活性を増加させる方法であって、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを含む方法も提供する。特定の実施形態では、対象に投与される医薬組成物は、本明細書に記載の医薬組成物のいずれかである。

【0153】

本発明は、対象の骨格筋細胞においてミトコンドリアの遊離脂肪酸酸化を増加させる方法であって、Eno1又はその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを含む方法も提供する。特定の実施形態では対象に投与される医薬組成物は、本明細書に記載の医薬組成物のいずれかである。

【0154】

本明細書において使用される「グルコース流を増加させる」は(1)筋肉へのグルコースの送達、(2)筋肉へのグルコースの輸送、及び(3)筋肉内のグルコースのリン酸化の少なくとも1つ以上の増加として理解される。具体的な実施形態ではグルコース流を増加させることは、解糖活性又は筋細胞におけるミトコンドリアの遊離脂肪酸酸化を増加させることを含む。

【0155】

IIA. エノラーゼ2及びエノラーゼ3

エノラーゼ2(Eno2)は、ガンマエノラーゼ、ニューロナルエノラーゼ、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)又はHEL-S-279としても公知であり、ENO2遺伝子によってコードされている。Eno2はホスホピルベートホスファターゼ(解糖酵素)である。Eno2はホモ二量体であり、中枢神経系(CNS)の成熟ニューロンにおいて、及びニューロン起源の細胞において見出される。種々の種類のストレス下でニューロンは、全身循環にEno2を放出する。Yee, et al., 2012, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. Vol. 53, No. 10, pp. 6389~6392. ENO2 mRNAの核酸配列及びEno2のアミノ酸配列は、それぞれ図36A及び36Bに示されている。

【0156】

エノラーゼ3(Eno3)はベータエノラーゼ、筋肉エノラーゼ、筋肉特異的エノラーゼ(MSE)又はGSD13としても公知であり、ENO3遺伝子によってコードされている。Eno3は、2-ホスホグリセレートとホスホエノールピルベートとの相互変換を触媒する。Eno3は、成体骨格筋細胞において見出され、そこで筋肉発達及び再生において役割を果たしうる。成体ヒト筋肉では、エノラーゼ活性の90%超がEno3による。Eno3をコードしている遺伝子中の変異は、糖原病と関連している。Comi et al., 2001, Ann Neurol. Vol. 50, No. 2, pp. 202~207. ENO3 mRNAの3つの変種は、変種1、2及び3と同定されている。変種1及び2はEno3タンパク質のアイソフォーム1をコードしており、変種3はEno3タンパク質のアイソフォーム2をコードしている。ENO3 mRNAの変種3は変種1と比較して5'UTRにおいて異なっており、5'コード領域中の2個のエクソンを欠いている。Eno3タンパク質のアイソフォーム2はアイソフォーム1よりも短いが、同じN及びC末端を有している。変種1、2及び3の核酸配列並びにEno3のアイソフォーム1及び2のアミノ酸配列は図37A~37Eに示されている。

【0157】

Eno2及び/又はEno3も、本明細書に記載の方法、医薬組成物、群(panel)及びキットにおいてEno1と代替的に使用され得る。例えばEno2及び/又はEno3は、少なくとも1型糖尿病、前糖尿病、2型糖尿病及び妊娠糖尿病を含む糖尿病に典型的には関連する血糖の上昇の処置のための、Eno2及び/又はEno3を含む医薬組成物の対象への投与による方法において使用され得る。さらにEno2及び/又はEno3は、哺乳動物における血糖の上昇状態、例えば糖尿病を診断及び/又はモニタリング(例えば疾患進行又は処置のモニタリング)及び/又は予測するための方法において使用され得る。Eno2及び/又はEno3は、血糖が上昇している対象の血液又は血清中のEno2又はEno3のレベルに関連する診断情報に基づいて処置する又は治療レジメンを調整するため並びに本発明の方法を実施するための群(panel)及びキット

のための方法においても使用され得る。本発明は、Eno2及び/又はEno3を含む、例えば筋細胞への送達のための医薬組成物にも関する。

【0158】

III. 糖尿病診断及び分類

しばしば単に糖尿病と称される真性糖尿病(DM)は、身体が十分なインスリンを産生しないため、又は細胞が産生されたインスリンに応答しないためのいずれかの理由でヒトが高い血糖を有する代謝疾患群である。この高血糖は、多尿症(frequent urination)、多飲症(increased thirst)及び過食症(increased hunger)の古典的症状を生じる。

【0159】

2型糖尿病は、インスリン抵抗性、細胞がインスリンを適切に使用できない状態から生じ、時には完全なインスリン欠失を伴っている。インスリンへの身体組織の欠損性応答は、少なくとも部分的にインスリン受容体に関連すると考えられている。しかし特異的欠損は未知である。

【0160】

2型糖尿病の初期段階では、主な異常性はインスリン感受性の低減である。この段階では高血糖症は、インスリン感受性を改善する又は肝臓によるグルコース産生を低減する種々の方策及び薬物療法によって逆行され得る。前糖尿病は、ヒトの血糖レベルが正常より高いが2型糖尿病の診断のために十分高くはない場合に生じる状態を示す。

【0161】

2型糖尿病は、インスリン抵抗性の背景でのベータ細胞からの不十分なインスリン産生が原因である。細胞が正常レベルのインスリンに適切に応答できないことであるインスリン抵抗性は、主に筋肉、肝臓及び脂肪組織において生じる。肝臓では、通常インスリンはグルコース放出を抑制する。しかしインスリン抵抗性の背景では、肝臓はグルコースを血液に不適切に放出する。インスリン抵抗性対ベータ細胞機能障害の比は、主にインスリン抵抗性を有しインスリン分泌の欠損はほんのわずかである個体と、インスリン抵抗性はわずかで主にインスリン分泌の欠損を有する個体とでは異なっている。

【0162】

2型糖尿病及びインスリン抵抗性に関連する他の重要である可能性がある機序は：脂肪細胞内での脂質の分解の増加、インクレチンへの抵抗性及び欠如、血液中の高グルカゴンレベル、腎臓による塩及び水の保持の増加並びに中枢神経系による代謝の不適切な制御を含む。しかし膵臓ベータ細胞によるインスリン分泌の障害(impairment)も必要とされることから、インスリン抵抗性を有するすべてのヒトが糖尿病を発症するとは限らない。

【0163】

1型糖尿病は、インスリンを産生するための身体の障害から生じ、現在注射可能なインスリンでの処置を必要とする。1型糖尿病は、膵臓中の膵ランゲルハンス島のインスリン産生ベータ細胞の喪失によって特徴付けられ、インスリン欠失を生じる。罹患したヒトのほとんどは、他は健康であり、発症した時は健康的な体重である。インスリンへの感受性及び応答性は、特に初期段階では通常正常である。しかし特に後期では、投与されたインスリンの免疫系クリアランスによるインスリン抵抗性を含むインスリン抵抗性が生じる場合がある。

【0164】

A. 診断基準

真性糖尿病の診断及び分類のための基準は、種々の種類の糖尿病のさらに詳細な定義を提供する、参照により本明細書に組み込まれるDiabetes Care, 36:S67~74, 2013においてAmerican Diabetes Associationによって公開された。糖尿病についての診断基準は、下にさらに考察されている。参考文献は1型糖尿病又は2型糖尿病を次のとおり分類する：

I. 1型糖尿病(β 細胞破壊、通常完全なインスリン欠失をもたらす)

A. 免疫媒介

B. 特発性

II. 2型糖尿病(相対的インスリン欠失を伴うインスリン抵抗性が主なものから、インスリ

10

20

30

40

50

ン抵抗性を伴う分泌欠損が主なもののまでの範囲にわたる場合がある)

III. 他の具体的種類

IV. 妊娠真性糖尿病

【0165】

診断を実施するための方法又は評価方法は本明細書で提供される。糖尿病のための本明細書で提供される診断基準は次のとおりである：

【0166】

糖尿病の診断のための基準

HbA1c $\geq$ 6.5%。検査は、Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)アッセイ*に標準化され National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP)で認定された方法を使用して検査室で実施されるべきである。
又は
空腹時血漿グルコース(FPG) $\geq$ 126mg/dl(7.0mmol/l)。空腹(絶食)は少なくとも8時間のカロリー未摂取と定義される。*
又は
経口耐糖能検査(OGTT)の際の2時間血漿グルコース $\geq$ 200mg/dl(11.1mmol/l)。検査は水に溶解した75g無水物グルコースの等価物を含有するグルコース負荷を使用して世界保健機関によって記載されたとおり実施されなければならない。
又は
高血糖症又は高血糖症発作の古典的症状を有する患者において、ランダム血漿グルコース $\geq$ 200mg/dl(11.1mmol/l)。

*明白な高血糖症の非存在において、基準1～3は繰り返し検査によって確認されなければならない。

【0167】

本明細書で提供される糖尿病/前糖尿病のリスクの増加についての診断基準は次のとおりである：

【0168】

糖尿病(前糖尿病)のリスクの増加についての基準*

空腹時血漿グルコース(FPG)100mg/dl(5.6mmol/l)から125mg/dl(6.9mmol/l)[空腹時グルコース不良 IFG]
75g 経口耐糖能検査(OGTT)での2時間血漿グルコース(PG)140mg/dl(7.8mmol/l)から199mg/dl(11.0mmol/l)[耐糖能障害 IGT]
A1C 5.7-6.4%

*3つすべての検査について、リスクは連続的であり、範囲の下限の下に拡張しており、範囲の上限で非比例的に増大している。

【0169】

本明細書で提供される妊娠糖尿病についての診断基準は次のとおりである：

【0170】

妊娠真性糖尿病(GDM)のスクリーニング及び診断

空腹時並びに1及び2時間での血漿グルコース測定を伴う75g OGTTを実施、顕性糖尿病を有すると以前診断されていない女性での妊娠24～28週	
OGTTは、少なくとも8時間の一晚絶食後の朝に実施されるべきである。	
GDMの診断は、次のいずれかの血漿グルコース値を超える場合に行われる:	
	- 空腹時: $\geq 92\text{mg/dl}(5.1\text{mmol/l})$
	- 1時間: $\geq 180\text{mg/dl}(10.0\text{mmol/l})$
	- 2時間: $\geq 153\text{mg/dl}(8.5\text{mmol/l})$

10

【0171】

血糖の上昇又は糖尿病の診断及び/又はモニタリングのための血糖測定は、摂食に関連した特異的な時期必要要件、例えば空腹時血糖又は、例えば経口耐糖能検査のような検査を実施するために要する時間のために煩雑である場合がある。さらに診断基準は、明らかな高血糖を欠く場合には基準1～3が反復検査によって確認されなければならないことを明確に必要とする。診断指標としてのHbA1cレベルの使用は、それが経時的な、すなわち1～2ヵ月前についての血糖レベルの指標を提供し、検査を行うために特別なスケジュールを必要としないことから有利である場合がある。同様にEno1レベルは、特別なスケジュール必要要件又は食品消費制限若しくは必要要件を伴わずに決定できる。

20

【0172】

したがっていくつかの態様では本発明は:(a)Eno1に選択的に結合する試薬に生物学的試料を接触させること、(b)試薬とEno1との間で複合体を形成させること、(c)複合体のレベルを検出すること、及び(d)複合体のレベルを予め定めた閾値と比較すること、を含む対象における血糖の上昇の存在を診断するための方法であって、予め定めた閾値より低い試料中の複合体のレベルが血糖の上昇を対象が罹患していることを示している方法に関する。特定の実施形態ではEno1に選択的に結合する試薬は抗Eno1抗体である。特定の実施形態では抗体は、検出可能な標識を含む。

30

【0173】

上に記載の方法のいくつかの実施形態では、複合体のレベルを検出するステップは、複合体を検出可能な二次抗体に接触させること及び二次抗体のレベルを測定することをさらに含む。方法は、血糖の上昇の1つ以上の追加的指標のレベルを検出することもさらに含む場合がある。血糖の1つ以上の追加的指標は、HbA1cレベル、空腹時グルコースレベル、食後グルコースレベル及び耐糖能からなる群から選択され得る。

【0174】

前述の方法のいくつかの実施形態では生物学的試料は、血液又は血清である。いくつかの実施形態では複合体のレベルは、イムノアッセイ又はELISAによって検出される。いくつかの実施形態では対象における血糖の上昇の存在は、前糖尿病、2型糖尿病、1型糖尿病及び妊娠糖尿病からなる群から選択される疾患又は状態の指標となる。

40

【0175】

B. 糖尿病、インスリン抵抗性及びインスリン機能不全の二次病態

糖尿病、1型及び2型の両方、インスリン抵抗性及びインスリン機能不全から生じる異常なグルコース制御は、二次病態に関連し、その多くは循環不良から生じる。そのような二次病態は、黄斑変性症、末梢ニューロパチー、潰瘍及び創傷治癒の低下並びに腎機能の低下を含む。正常範囲内のグルコースレベル及び/又はHbA1cレベルの維持がこれらの二次病態の発症を低下させることが示唆されている。血糖、インスリン及びHbA1cレベルの正常化が、一次性病態例えば耐糖能障害、血糖の増加を限定することによって二次病態の発生を低減することは理解される。特定の実施形態ではEno1は、耐糖能障害、血糖の増加

50

、インスリン抵抗性、インスリン機能不全、糖尿病又は前糖尿病に関連する二次病態の処置のために使用されない。特定の実施形態では、Eno1は、耐糖能障害、血糖の増加、インスリン抵抗性、インスリン機能不全、糖尿病又は前糖尿病に関連する二次病態の処置のために使用される。

【0176】

IV. 投与の投与量及び様式

投与のための技術及び投与量は、化合物の種類(例えばタンパク質及び/又は核酸、単独又はマイクロ粒子、リポソーム若しくはデンドリマーとの複合体化)に応じて変化し、当業者に周知又は容易に決定され得る。

【0177】

本発明の治療化合物は、薬学的に許容される希釈剤、担体又は賦形剤と共に単位投与形態で投与され得る。投与は非経口、静脈内、皮下、経口、局所(topical)又は局所(local)であってよい。特定の実施形態では投与は経口ではない。特定の実施形態では投与は局所(topical)ではない。特定の好ましい実施形態では投与は全身性である。薬剤を投与することは、協働する多数の人々によって実施され得る。薬剤を投与することは、直接又は他を通じて、具体的な薬剤を摂取するために、例えば経口送達、皮下送達、セントラルラインを通じた静脈内送達によるなどの自己送達(self-delivery)によって、又は例えば静脈内送達、筋肉内送達、皮下送達など訓練を受けた専門家による送達のためのいずれかで、例えば対象に投与される薬剤を処方すること及び/又は説明書を提供することを含む。

【0178】

組成物は、経口投与用の丸剤、錠剤、カプセル、液体若しくは徐放錠剤の形態、又は静脈内、皮下若しくは非経口投与用の液体、又は全身性投与用のポリマー若しくは他の徐放ビヒクルの形態であってよい。

【0179】

製剤を行うための当技術分野において周知の方法は、例えば"Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20th ed., ed. A. R. Gennaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.)において見出される。非経口投与用の製剤は、例えば賦形剤、滅菌水、生理食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物由来の油、又は水素化ナフタレンを含有する場合がある。生体適合性、生分解性ラクチドポリマー、ラクチド/グリコリド共重合体又はポリオキシエチレンポリオキシプロピレン共重合体は、化合物の放出をコントロールするために使用され得る。ナノ粒子製剤(例えば生分解性ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、リポソーム)は、化合物の生体内分布をコントロールするために使用され得る。他の有用である可能性がある非経口送達系は、エチレン酢酸ビニル共重合体粒子、浸透圧ポンプ、埋め込み型注入系及びリポソームを含む。製剤中の化合物の濃度は、投与される薬剤の投与量及び投与の経路を含む多数の要因に依存して変化する。

【0180】

化合物は、製薬業界において一般に使用される無毒性酸付加塩又は金属錯体などの薬学的に許容される塩として任意選択で投与されてよい。酸付加塩の例は、酢酸、乳酸、パモン酸、マレイン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、安息香酸、パルミチン酸、スベリン酸、サリチル酸、酒石酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸又は、トリフルオロ酢酸などの有機酸;タンニン酸、カルボキシメチルセルロースなどのポリマー酸;塩酸、臭化水素酸、スルホン酸リン酸などの無機酸を含む。金属錯体は、亜鉛、鉄などを含む。

【0181】

経口使用のための製剤は、活性成分(複数可)を無毒性の薬学的に許容される賦形剤との混合物中に含有する錠剤を含む。これらの賦形剤は、例えば不活性希釈剤又は注入剤(例えばショ糖及びソルビトール)、潤滑剤、流動促進剤並びに抗接着剤(例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、シリカ、水素化植物油又はタルク)であってよい。経口使用のための製剤は、チュアブル錠剤として、又は活性成分が不活性固

10

20

30

40

50

体希釈剤と混合されている硬ゼラチンカプセルとして、又は活性成分が水若しくは油媒体と混合されている軟ゼラチンカプセルとしても提供されてよい。

【0182】

化合物を投与する投与量及び時期は、対象の健康全般及び疾患、例えば糖尿病、前糖尿病の症状の重症度を含む種々の臨床的要因に依存する。

【0183】

A. 長時間作用性の注射可能な薬物のための製剤

高率の初回通過クリアランスに供される生物製剤及び他の薬剤は、経口投与に適していない場合があり、非経口経路による投与を必要とする。しかし対象が注射による薬剤の自己投与、例えば皮下注射を特に疾患が対象の気分を悪くしない場合にしばしば嫌うことから注射可能な薬物に関する治療レジメンの遵守は低い場合がある。注射による他の投与の経路、例えば静脈内、筋肉内は、典型的には訓練を受けた専門家による投与を必要とし、薬剤の頻回の投与を不便でしばしば苦痛なものにする。

【0184】

製剤は、これだけに限らないが、油ベース注射、注射可能な薬物懸濁物、注射可能なミクロスフェア及び注射可能なin situ系を含む注射可能な薬剤の徐放を提供するために作られている。長時間作用性の注射可能な製剤は、同じ化合物の従来の製剤と比較して多くの有利点を提示する。これらの有利点は、少なくとも以下:各注射後の規定時間中の予測可能な薬物放出プロファイル、よりよい患者コンプライアンス、容易な適用、初回通過代謝の回避による全身性利用率の改善、処置の効果を損なわない投与頻度の低減(すなわち、より少ない注射)、副作用頻度の減少及び医療の全般的費用の低減を含む。

【0185】

1. 油ベース注射可能溶液及び注射可能な薬物懸濁物

従来の長時間作用性注射は、懸濁物としての水性溶媒中の親油性薬物又は植物油に溶解した親油性薬物のいずれかからなる。商業的に入手可能なオイルベースの注射可能な筋肉内投与用の薬物は、これだけに限らないが、ハロペリドールデカノエート、フルフェナジンデカノエート、テストステロンエナントエート及びエストラジオールバレレートを含む。これらの長時間作用性製剤についての投与頻度は、数週間ごとなどである。懸濁剤では薬物吸収の律速段階は、製剤中又は薬物製剤周辺の液中の薬物粒子の溶解である。低水溶性塩形成は、吸収を延長するように薬物粒子の溶解速度をコントロールするために使用され得る。しかし、注射部位、注射容積、注射部位でのデポーの広がり、並びに油性ビヒクルそれ自体の吸収及び分布などのいくつかの他の要因は、薬物の全体的な薬物動態プロファイルに影響を与える場合がある。所望の薬物放出プロファイルを提供するためのこれらの要因の調節は、当業者の能力の範囲内である。

【0186】

2. ポリマーベースミクロスフェア及びin situ形成

ポリマーベースの長時間作用性注射可能剤の開発は、ペプチド及びタンパク質薬物などの巨大分子のための最も好適な戦略の1つである。商業的に入手できるミクロスフェア調製物は、これだけに限らないが、リユーピロリドアセテート、トリプトレリンパモエート、オクトレオチドアセテート、ランレオチドアセテート、リスベリドン及びナルトレキソンを含む。商業的に入手できるin situ形成インプラントはリユーピロリドアセテートを含み、パクリタキセル及びブピバカインを含有するin situ形成インプラントは臨床試験中である。これらの製剤は筋肉内投与用である。巨大分子のためのポリマーベース製剤の有利点は:巨大分子のin vitro及びin vivo安定化、全身性利用率の改善、生物学的半減期の延長、患者の利便性及びコンプライアンスの増強並びに投与頻度の低減を含む。

【0187】

注射可能なミクロスフェア及びin situ形成物の設計において最も重要な要因は、適切な生分解性ポリマーの選択である。生分解性ミクロスフェアからの薬物分子の放出は、ポリマーマトリクス及びポリマー分解を通じた拡散によってコントロールされている。組成物の共重合体比、ポリマー結晶化度、ガラス転移温度及び親水性などのポリマーの性質は

、放出工程において重要な役割を果たす。構造、内在性ポリマー特性、コア溶解度、ポリマー親水性及びポリマー分子量は、薬物放出動態学に影響を与えるが、ミクロスフェアからの薬物放出の可能性がある機序は次のとおりである：表面からの初期放出、ポアを通じた放出、無処置ポリマー障壁を通じた拡散、水膨張障壁を通じた拡散、ポリマー浸食及びバルク分解。これらすべての機序は、一緒に放出工程に関与する。ミクロスフェア及びin situ形成物における使用のためのポリマーは、これだけに限らないがポリラクチド(PLA)、ポリグリコリド(PGA)、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)(PLGA)、ポリ(ϵ -カプロラクトン)(PCL)、ポリグリコネート、ポリ酸無水物、ポリオルトエステル、ポリ(ジオキサノン)及びポリアルキルシアノアクリレートを含む過去数十年にわたって集中的に研究されたコントロールされた薬物送達のための種々の生分解性ポリマーを含む。in situ形成物で使用される熱的に誘発されるゲル化系は熱可逆的ゾル/ゲル転移を示し、低い臨界溶液温度によって特徴付けられる。それらは室温で液体であり、低い臨界溶液温度で及びそれ以上でゲルを生じる。in situで凝固するオルガノゲルは、水不溶性両親媒性脂質からなり、水中で膨潤し、種々の種類のリオトロピック液晶を形成する。

10

【0188】

B. 標的化薬物送達

薬物のそれらの作用部位への送達は、所望の全身性効果を提供するために必要とされる薬物の量を低減することによって治療指数を増加させ得る。薬物は、全身性曝露を制限する方法又は製剤、例えば筋肉内注射、滑液嚢内注射、くも膜下腔内注射、眼球内注射を使用する薬物の標的組織への投与によって作用部位に送達され得る。上に考察した多数の徐放製剤は、筋肉内投与用であり、筋肉組織への局所送達を提供する。代替的に標的化部分

20

は、標的部位への投与のために治療ペイロードと関連している又は連結されている場合がある。標的化部分は、特異的細胞型に結合する任意の多数の部分を含む場合がある。

【0189】

1. 標的化部分

本発明の特定の実施形態は、上に考察した比較的小さなペプチド(例えば25アミノ酸以下、20アミノ酸以下、15アミノ酸以下、10アミノ酸以下)、平滑筋及び/又は骨格筋標的化ペプチドを含む筋肉標的化ペプチド(MTP)、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンリガンド(例えばRGDペプチド及びペプチド類似体)、 $\alpha v \beta 5$ インテグリンリガンド、又はCD46リガンドを含む、標的化部分の使用を含む。そのようなペプチドが、ペプチドの薬物動態及び/又は薬力学の特性を修飾するために、Eno1との複合体の形成を可能にする1つ以上の化学的修飾を含む場合があることは理解される。特定の実施形態では標的化部分は、小分子、例えばRGDペプチド模倣物であってよい。特定の実施形態では標的化部分は、タンパク質及び任意選択でアデノウイルス35由来線維タンパク質を含む場合がある。特定の実施形態ではウイルスタンパク質は、ウイルス粒子上に存在する。特定の実施形態ではウイルスタンパク質は、ウイルス粒子上に存在しない。特定の実施形態では標的化部分は、抗体、抗体断片、抗体模倣物又はT細胞受容体であってよい。

30

【0190】

2. 標的化複合体

標的化Eno1複合体は、Eno1から筋肉への送達を提供しながら筋肉内注射(例えば皮下注射、静脈内注射)以外の経路によって投与され得る。標的化複合体は、直接又は間接的にEno1に結合した1つ以上の標的化部分を含み得る。標的化複合体の形成は、Eno1の活性を阻害せず、血糖レベル正常化及びインスリン応答へのその効果を実質的に又は不可逆的に阻害しない。特定の実施形態では標的化複合体の使用は、有効用量を提供するために必要とされるEno1の総量を低減できる。標的化複合体のいくつかの例示的非限定的な実施形態は下に考察される。

40

【0191】

特定の実施形態ではペイロード及び標的化部分は、約1:1モル比で複合体中に存在する。特定の実施形態では標的化部分は、ペイロードのモル過剰(例えば2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、2

50

0:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、26:1、27:1、28:1、29:1、30:1以上、又は任意の2つの値によって囲まれた任意の範囲)で複合体中に存在する。特定の実施形態では、ペイロード対標的化部分は約1:5~1:15、約1:7~1:13、約1:8~1:12である。

【0192】

本発明の組成物及び方法が1つより多い、すなわち標的化部分ペイロード複合体の集団の投与を含むことは理解される。したがって、ペイロードあたりの標的化部分の数が複合体の集団中のペイロードあたりの標的化部分の平均数で表される場合があることは理解される。特定の実施形態では、複合体の少なくとも70%が標的化部分対ペイロードの選択されたモル比を有する。特定の実施形態では複合体の少なくとも75%は標的化部分対ペイロードの選択されたモル比を有する。特定の実施形態では複合体の少なくとも80%は標的化部分対ペイロードの選択されたモル比を有する。特定の実施形態では複合体の少なくとも85%は標的化部分対ペイロードの選択されたモル比を有する。特定の実施形態では複合体の少なくとも90%は標的化部分対ペイロードの選択されたモル比を有する。

【0193】

a. リンカー

多数の化学的リンカーが当技術分野において公知であり、商業的供給源から入手可能である(例えばPierce Thermo Fisher Scientific Inc.、例えばwww.piercenet.com/cat/crosslinking-reagentsを参照されたい)。そのような薬剤は、1つ以上の標的化部分をEno1に可逆的に又は不可逆的に化学的に連結するために使用されてよい。リンカーは、標的化部分を直接Eno1に結合させるよりも、標的化部分及びEno1を構造、例えばマイクロ粒子、デンドリマーに結合させるためにも使用されてよい。特定の実施形態ではEno1を標的化複合体に結合させるリンカーは可逆的であり、そのためEno1は投与後に、好ましくは実質的に筋肉で複合体から放出される。

【0194】

b. ペプチド結合

本明細書において使用される標的化複合体はペプチド標的化部分を有するEno1の翻訳を含み得る。Eno1を標的化するためのアミノ酸配列を含む発現構築物を生成する方法は十分に当業者の能力の範囲内である。

【0195】

c. リポソーム

リポソーム送達系は、全身性曝露を制限する製剤を含めて当技術分野において公知であり、それにより全身性曝露及びオフターゲット効果を低減する。例えばDoxil(登録商標)は、ある種のがんの処置のためのコレステロールをさらに含む長期間循環PEG化リポソームにドキシソルビンが封入されている組成物である。Ambisome(登録商標)、Abelcet(登録商標)及びAmphotec(登録商標)を含むアンホテリシンBの種々のリポソーム製剤が種々のリン脂質、コレステロール及びコレステロール硫酸を含有するリポソーム又は脂質複合体の静脈内投与用に製剤化されている。Visudine(登録商標)は、卵ホスファチジルグリセロール(egg phosphatidyl glycerol)中のリポソームとして及び静脈内投与用のDMPCとして製剤化されたベルテポルフィンである。リポソーム製剤は、筋肉内注射のためにも公知である。Epaxal(登録商標)は不活性化A型肝炎ウイルスであり、Inflexal V(登録商標)は、インフルエンザウイルス株A及びBの不活性化ヘマグルチニンである。両方のウイルス性調製物は、DOPC及びDOPEとの組合せで処方される。そのようなリポソーム、又は他の生理学的に許容されるリポソームは、Eno1のパッケージングのため及び筋肉にEno1を送達するための標的化部分での続く表面装飾のために使用され得る。リポソームの細胞内輸送を調節するための追加的部分も含まれ得る。リポソームの細胞への取り込みで、リポソームはEno1を放出し、それによりその治療効果を有するようになる。

【0196】

d. デンドリマー

デンドリマーは、複数の標的化部分のEno1の1つ以上の分子との結合のためのスキャホールドとして使用され得る。特定の実施形態ではデンドリマーは、Eno1とのカップリング

の前に標的化部分で装飾される。

【0197】

e. マイクロ粒子

マイクロ粒子は、マイクロ粒子に結合されて又は封入されてのいずれかで、複数の標的化部分のEno1の1つ以上の分子との付着のためのスキャホールドとして使用され得る。特定の実施形態ではマイクロ粒子は、Eno1とのカップリングの前に標的化部分で装飾される。

【0198】

f. ウイルス性ベクター

ウイルス親和性は、長期間研究されており、ウイルスを目的の細胞に方向付けるために使用されている。Parker et al., 2013 (Gene Therapy, 20:1158~64)は、骨格及び/又は平滑筋細胞への送達を増強する血清型35の線維及びペトン(peton)を有するアデノウイルス血清型5キャップ部位を開発した。そのようなウイルス性ベクター及び他のウイルス性ベクターは、Eno1発現構築物の筋細胞への送達のために使用され得る。

【0199】

C. デンドリマー

デンドリマーは本発明の文脈では、非筋肉内に投与されたEno1の筋肉への送達のための標的化複合体の骨格として使用され得る。代替的にデンドリマーは、筋肉内に投与されたEno1の薬物動態的及び薬力学的特性を調節するために使用され得る。本発明の組成物及び方法ではデンドリマーは、薬学的に許容されるデンドリマーであると理解される。

【0200】

デンドリマーに基づくプラットフォームは、医薬的応用における使用のための注目を達成した。他のポリマー担体と同様にデンドリマーは、構造的毒性及び免疫原性を回避するように合成され得る。ヒトタンパク質のサイズ、溶解度及び形状を模倣するデンドリマーの能力は、技術を多数の治療用及び診断用応用のための理想的選択にする。サイズ1~10ナノメートルであることは、デンドリマーを血管内皮を通して効率的に拡散でき、細胞内に内部移行でき、及び腎臓によって迅速に排除されるようにする。これは、長期毒性を回避し、迅速に分解可能なプラットフォームの必要性を低減することを補助する。複数の反応性表面基の利用能は、デンドリマーが機能性分子のより高いペイロードを保有できるようにし、作用部位への標的化送達を増強し、それにより有効性を増加させる。

【0201】

デンドリマーは、いくつかの生物医学的適用のために産生された又は商業的に開発されている。局所、ポリリジンデンドリマーベースの殺菌剤、VivaGel(商標)はStarpharmaによって開発された。SuperFect(登録商標)は、遺伝子トランスフェクションのために使用されるデンドリマーベースの材料である。デンドリマーベースの診断ツールは、Gadomer-17、ガドリニウムキレートで機能化されたポリリジンデンドリマーを含有する磁気共鳴画像法(MRI)造影剤、及びStratus(登録商標)CS、心臓発作を迅速に診断するための心臓マーカーについてのバイオマーカーを含む。

【0202】

デンドリマーは、それらのコアシェル構造によって定義され、デンドリマーのサイズ及び数はコアに追加された各追加的シェル(又は世代)を有する官能表面基のおよそ2倍である。シェルは、当技術分野において十分公知の手段によってモノマー反応を変更することによって合成される。特異的なデンドリマー骨格は、モノマー単位を変更することによって合成される。デンドリマーの生物学的特性は、化学的骨格及び表面終結によって大きく影響される。デンドリマーをin vivo薬物送達のために適切なビヒクルにするために、それらは無毒性、非免疫原性で、循環中に残るために十分に安定である一方で適切な障壁を越えることによって特異的な場所に標的化でき、達することができなければならない。合成及び文献で公開されたデンドリマーの大部分は、生理的条件下で不溶性である又は機能性分子の添加後に可溶性であるままでいることができず、生物学的適用には不適切である。しかしいくつかのクラスのデンドリマーは、生物医学的適用に有用なスキャホールドであ

ることが示されている、例はポリエステル、ポリリジン及びポリプロピレンイミン(PPI又はDAB)デンドリマーを含む。

【0203】

生物医学的適用において最も広く使用されているデンドリマーは、ポリ(アミドアミン)(PAMAM)デンドリマーである。メチルアクリレートとエチレンジアミンとの反復反応から合成されるポリアミド骨格は、巨大分子が水溶解度を維持し、免疫原性を最小化することを補助する。異なる世代のPAMAMデンドリマーも身体において容易に見出される球状タンパク質のサイズ及び特性を模倣できる。全世代のPAMAMデンドリマーのアミン終結表面は、容易な表面修飾を可能にし、生理的条件下でプラットフォームがメトトレキサートなどの疎水性治療用分子を保有し、可溶化できるようにする。PAMAMデンドリマーは、表面アミンが中和されている又は適切に修飾されている場合(例えばアシル化)にわずかな非特異的毒性を表す。

10

【0204】

活性標的化は、細胞特異的分子への結合によってそのペイロード(薬物又は他)の細胞への送達を媒介するために標的化部分などの分子を使用する。本明細書で提供するものなどの標的化部分は、標的細胞上で高度に発現されている受容体を通じてしばしば結合する。標的化リガンドと細胞表面受容体との間の相互作用は、治療剤又はペイロードが選択的に筋細胞に達することができるようにし、受容体媒介工程を介して内側に導かれるようにさせる。

【0205】

20

デンドリマー表面上の複数の結合リガンドの提示に関連する多価効果は、単一リガンドと比較して樹状のスキヤホールドの取り込みを増強する。複数のリガンドの同時結合によって生じる多価相互作用は、個々のリガンドが標的化受容体に対して低い親和性を有する場合でさえ、デンドリマーがプラットフォームの結合アビディティを増加できるようにする。PAMAMプラットフォームは、抗体、ペプチド、T抗原及び葉酸を含む多価標的化分子の結合のためのスキヤホールドとしてうまく使用されている。標的化リガンドは、特異的受容体が細胞表面上に発現されている場所にデンドリマーを固着させる。標的化デンドリマー薬物は、正常細胞を回避しながら、すなわち潜在的な全身性毒性を回避しながら、標的細胞に特異的に高用量を送達するようにコンジュゲートする。

【0206】

30

アセチル基を有するPAMAMデンドリマーの表面アミンを中和することは、毒性及び非特異的デンドリマー取り込みを最小化する。デンドリマーのアセチルカップリングも身体からのクリアランスの増加を可能にし、長期処置からの影響を最小化する。アミノ終結PAMAMデンドリマーのPEG化は、免疫原性を低減し、溶解度を増加させる。PEG終結デンドリマーは、カチオン性親材料と比較して血流半減期が増加している。ヒドロキシル及びメチオキシル終結ポリエステルデンドリマーは、濃度40mg/kgまでin vivoで無毒性であることが示されている。カチオン性とアニオン性デンドリマーとの間の毒性の差異は、in vivoでも確認されている。ゼブラフィッシュ胚モデルを使用して、カルボキシル終結デンドリマーは、G4アミン終結デンドリマーよりも顕著に毒性でなかった。同じ研究においてRGDでの表面修飾も毒性を低減する。

40

【0207】

上に及び本明細書に記載のすべてのデンドリマーは、本発明のEno1組成物及びそれらの使用方法において使用され得ることは理解される。

【0208】

特定の実施形態では、デンドリマー及びEno1を含む複合体中のデンドリマー分子の数対Eno1分子の数の比は約1:1から約10:1の間、例えば約1:1、約2:1、約3:1、約4:1、約5:1、約6:1、約7:1、約8:1、約9:1又は約10:1である。一実施形態では、デンドリマー及びEno1を含む複合体中のデンドリマー分子の数対Eno1分子の数の比は約3:1から7:1の間、例えば3:1、4:1、5:1、6:1又は7:1である。一実施形態では、デンドリマー及びEno1を含む複合体中のデンドリマー分子の数対Eno1分子の数の比は、4:1から6:1の間、例えば3:1、4:1又

50

は5:1である。一実施形態では、デンドリマー及びEno1を含む複合体中のデンドリマー分子の数対Eno1分子の数の比は3:1から5:1の間、例えば3:1、4:1又は5:1である。さらに別の実施形態ではデンドリマー及びEno1を含む複合体中のデンドリマー分子の数対Eno1分子の数の比は4:1から5:1の間である。別の実施形態ではデンドリマー及びEno1を含む複合体中のデンドリマー分子の数対Eno1分子の数の比は3:1から4:1の間である。さらに好ましい実施形態ではデンドリマー及びEno1を含む複合体中のデンドリマー分子の数対Eno1分子の数の比は約5:1である。

【0209】

複合体中のデンドリマー対Eno1の最適な比は、例えばピルベートキナーゼ(PK)/乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)アッセイ又は本明細書に記載の任意の他のアッセイなどの当技術分野において公知の任意の日常的方法を使用して、デンドリマー/Eno1複合体のEno1活性をアッセイすることによって検査及び選択され得る(例えば未複合体化Eno1と比較するなど)。デンドリマー対Eno1の最適な比は、例えば本明細書実施例2に記載のヒト骨格筋筋管(HSMM)でのグルコース取り込みを測定すること又は当技術分野において公知の任意の類似するアッセイによって、*in vitro*アッセイでのグルコース取り込みへのデンドリマー/Eno1複合体の効果を評価することによって検査及び選択され得る。デンドリマー対Eno1の最適な比は、*in vivo*血糖レベルへのデンドリマー/Eno1複合体の効果を測定することによって、例えば明細書実施例7及び8に記載の糖尿病マウスモデル、若しくは任意の類似のモデルでの血糖へのデンドリマー/Eno1複合体の効果を測定すること又は当技術分野において公知のアッセイによって検査及び選択され得る。複合体中のデンドリマー対Eno1の最適な比は、好ましくは*in vitro*及び/若しくは*in vivo*でEno1活性を保持し、並びに/又はEno1の細胞への送達を提供する。

【0210】

本発明の組成物及び方法が、デンドリマーEno1標的化ペプチド複合体の、1つより多い、すなわち集団の投与を含むことは理解される。したがって、Eno1分子あたりのデンドリマーの数が複合体の集団中でのEno1分子あたりのデンドリマーの平均数を表し得ることは理解される。特定の実施形態では複合体の少なくとも70%は、デンドリマー対Eno1の選択されたモル比を有する。特定の実施形態では複合体の少なくとも75%は、デンドリマー対Eno1の選択されたモル比を有する。特定の実施形態では複合体の少なくとも80%は、デンドリマー対Eno1の選択されたモル比を有する。特定の実施形態では複合体の少なくとも85%は、デンドリマー対Eno1の選択されたモル比を有する。特定の実施形態では複合体の少なくとも90%は、デンドリマー対Eno1の選択されたモル比を有する。

【0211】

特定の実施形態では、デンドリマー/Eno1/標的化ペプチド複合体中のデンドリマー分子の数対標的化ペプチドの数の比は、1:0.1から1:10の間、1:1から1:10の間、1:1から1:5の間又は1:1から1:3の間である。特定の実施形態ではデンドリマー分子の数対標的化ペプチドの数の比は、約1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9又は1:10である。好ましい実施形態では、デンドリマー/Eno1/標的化ペプチド複合体中のデンドリマー分子の数対標的化ペプチドの数の比は、約1:1である。好ましい実施形態では、デンドリマー/Eno1/標的化ペプチド複合体中のデンドリマー分子の数対標的化ペプチドの数の比は、約1:2である。好ましい実施形態では、デンドリマー/Eno1/標的化ペプチド複合体中のデンドリマー分子の数対標的化ペプチドの数の比は、約1:3である。

【0212】

特定の実施形態では、デンドリマー/Eno1/標的化ペプチド複合体中のデンドリマー分子の数対標的化ペプチドの数の比は、少なくとも1:1、少なくとも2:1、少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1、少なくとも6:1、少なくとも7:1、少なくとも8:1、少なくとも9:1又は少なくとも10:1である。一実施形態では、デンドリマー/Eno1/標的化ペプチド複合体中のデンドリマー分子の数対標的化ペプチドの数の比は少なくとも3:1である。

【0213】

本発明の組成物及び方法が、標的化ペプチドEno1デンドリマー複合体の、1つより多い

、すなわち、集団の投与を含むことは理解される。したがって、デンドリマーあたりの標的化ペプチドの数が複合体の集団中でのデンドリマーあたりの標的化ペプチドの平均数を表し得ることは理解される。特定の実施形態では複合体の少なくとも70%は、標的化ペプチド対デンドリマーの選択されたモル比を有する。特定の実施形態では複合体の少なくとも75%は、標的化ペプチド対デンドリマーの選択されたモル比を有する。特定の実施形態では複合体の少なくとも80%は、標的化ペプチド対デンドリマーの選択されたモル比を有する。特定の実施形態では複合体の少なくとも85%は、標的化ペプチド対デンドリマーの選択されたモル比を有する。特定の実施形態では複合体の少なくとも90%は、標的化ペプチド対デンドリマーの選択されたモル比を有する。

【0214】

デンドリマー対標的化ペプチドの最適な比は、デンドリマー/Eno1/標的化ペプチド複合体の特異的組織へのin vivo標的化を測定することによって、例えば本明細書実施例6に記載の、検出可能に標識化されたデンドリマー/Eno1/標的化ペプチド複合体のin vivo標的化を測定することによって選択されてよい。

【0215】

V. 血糖レベル及びコントロールの指標の検出及び測定

血糖の上昇及び血糖コントロールの指標の検出及び測定のための方法は、測定される指標の性質に応じて変化する。血糖の上昇、並びにそれによる血糖レベルコントロールの喪失及び糖尿病の重症度は直接、例えば血液中のグルコースの量を決定することによって、又は間接的に、例えば糖化ヘモグロビン(HbA1c)、ヘモグロビンとグルコースとの反応産生物の量を検出することによって測定され得る。本発明は、Eno1を使用する血糖コントロールを検出するための方法をさらに提供する。

【0216】

本発明は、本発明の血糖レベル指標を検出及び/又は測定するための任意の好適な手段、技術及び/又は手順を検討する。当業者は、本発明の指標を測定するために用いられる方法が検出又は測定される指標の種類(例えばグルコース、ケトン、mRNA又は糖化ポリペプチドを含むポリペプチド)及び生物学的試料(例えば全血、血清)に少なくとも依存することを理解する。特定の生物学的試料は、本発明のバイオマーカーを測定することの前にある種の特異化した処置、例えばmRNAバイオマーカー例えばEno1 mRNAが測定される場合のmRNAの調製、も必要とする場合がある。

【0217】

A. 確立された指標を使用する血糖及び血糖コントロールの直接及び間接測定

血糖モニタリングは、血液中のグルコース濃度(糖血症)を1時点で直接検査する方法である。真性糖尿病の場合に特に重要なことに血糖検査は、血液を取るために皮膚を(典型的には指を)刺すことによって実施され、次いで血液を化学的に活性なディスプレイ「検査ストリップ」に適用する。さまざまな製造者がさまざまな技術を使用しているが、大部分の系は電気的性質を測定し、これを血液中のグルコースレベルを決定するために使用している。検査は通常末梢血血糖と称される。定期的又は継続的な使用のために商業的に入手できる血糖モニターは、当技術分野において公知である。血糖レベルの定期的検出のためのグルコースモニターは、これだけに限らないが、TRUEResult Blood Glucose Meter (TRUE)、ACCU-CHEK Glucose Meter (ACCU-CHEK)、OneTouch Glucose Meter (ONETOUCH)及びFreeStyle Lite Blood Glucose (FREESTYLE LITE)を含む。直接測定された正常血糖レベルは、正常空腹時血糖レベルが正常食後血糖レベルよりも低いために、食物が最後に消費されてからの時間の長さに依存して変化することは理解される。直接血糖モニタリングは、高用量のグルコースの消費への応答及び血液からのグルコースクリアランスの速度をモニターするための耐糖能検査においても使用される。

【0218】

糖化ヘモグロビン(ヘモグロビンA1c、HbA1c、A1C、Hb1c、HbA1c)は、長期間の平均血漿グルコース濃度を主に同定するために測定されるヘモグロビンの形態である、すなわち血糖の間接測定。HbA1cは、ヘモグロビンの血漿グルコースへの曝露によって非酵素的糖化

経路で形成される。グルコースが正常レベルである場合、総ヘモグロビンのパーセントとして測定される糖化ヘモグロビンの正常量又は特異的血液濃度が産生される。血糖レベルが高い場合、上昇したレベルの糖化ヘモグロビンが産生される。糖化は不可逆反応である。したがって赤血球内の糖化ヘモグロビンの量は、細胞が曝露されてきたグルコースの平均レベルを反映する。糖化ヘモグロビンを測定することは、グルコースモニタリングによって提供されるスナップショットイメージよりも長期血清グルコース制御をモニタリングすることによって治療の有効性を評価する。HbA1cレベルは、その前4週間から3ヵ月にわたる平均血糖濃度に比例する。HbA1cレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 又はイムノアッセイを使用して測定され得る。タンパク質分析物の検出及び測定のための方法は、下に詳細に考察される。

10

【0219】

B. 核酸指標の検出

特定の実施形態では本発明は、対象における糖尿病及び/又はグルコースコントロールをモニターするために核酸バイオマーカー、例えばEno1 mRNAバイオマーカーの検出を、任意選択で血糖の他の指標、例えば血糖、ケトン及び/又はHbA1cの直接測定との組合せで含む。

【0220】

種々の実施形態では本発明の診断的/予後の方法は、血液試料中のEno1の発現レベルの決定を一般的には含む。発明の方法を実行する際の遺伝子発現レベルの決定は、好適な方法によって実施されてよい。例えば遺伝子発現レベルの決定は、目的の遺伝子から発現されるmRNAの発現を検出することによって及び/又は遺伝子によってコードされているポリペプチドの発現を検出することによって実施されてよい。

20

【0221】

Eno1をコードしている核酸を検出するために、これだけに限らないがサザンブロット分析、ノーザンブロット分析、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(例えば米国特許第4,683,195号、第4,683,202号及び第6,040,166号、"PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis et al. (Eds), 1990, Academic Press: New Yorkを参照されたい)、逆転写PCR(RT-PCR)、アンカードPCR、競合的PCR(例えば米国特許第5,747,251号を参照されたい)、cDNA末端の急速増幅(RACE)(例えば"Gene Cloning and Analysis: Current Innovations, 1997, pp. 99~115を参照されたい)、リガーゼ連鎖反応(LCR)(例えばEP 01320308を参照されたい)、ワンサイド(one-sided)PCR (Ohara et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1989, 86: 5673~5677)、in situハイブリダイゼーション、タックマンベース(Taqman-based)アッセイ(Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1991, 88: 7276~7280)、ディファレンシャルディスプレイ(例えばLiang et al., Nucl. Acid. Res., 1993, 21: 3269~3275を参照されたい)及び他のRNAフィンガープリンティング技術、核酸配列ベース増幅(NASBA)並びに他の転写ベース増幅系(例えば米国特許第5,409,818号及び第5,554,527号を参照されたい)、Qベータレプリカーゼ、鎖置換増幅(SDA)、修復鎖反応(RCR)、ヌクレアーゼ保護アッセイ、サブトラクションに基づく方法、Rapid-Scan(登録商標)などを含む任意の好適な方法が使用され得る。

30

【0222】

他の実施形態ではEno1の遺伝子発現レベルは、mRNAから産生される相補的DNA(cDNA)又は相補的RNA(cRNA)を増幅すること及びマイクロアレイを使用して分析することによって決定され得る。多数の異なるアレイ配置及びそれらの産生方法は当業者に公知である(例えば米国特許第5,445,934号、第5,532,128号、第5,556,752号、第5,242,974号、第5,384,261号、第5,405,783号、第5,412,087号、第5,424,186号、第5,429,807号、第5,436,327号、第5,472,672号、第5,527,681号、第5,529,756号、第5,545,531号、第5,554,501号、第5,561,071号、第5,571,639号、第5,593,839号、第5,599,695号、第5,624,711号、第5,658,734号及び第5,700,637号を参照されたい)。マイクロアレイ技術は、多数の遺伝子の定常状態mRNAレベルの測定を同時に可能にする。現在広く使用されているマイクロアレイは、cDNAアレイ及びオリゴヌクレオチドアレイを含む。マイクロアレイを使用する分析は、マ

40

50

マイクロアレイの既知の位置に固定された核酸プローブにハイブリダイズする試料由来のcDNA配列を検出するために使用される標識化プローブから受けるシグナルの強度の測定に一般に基づいている(例えば米国特許第6,004,755号、第6,218,114号、第6,218,122号及び第6,271,002号を参照されたい)。アレイに基づく遺伝子発現方法は、当技術分野において公知であり、多数の科学刊行物及び特許に記載されている(例えばM. Schena et al., Science, 1995, 270: 467~470; M. Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93: 10614~10619; J. J. Chen et al., Genomics, 1998, 51: 313~324; 米国特許第5,143,854号、第5,445,934号、第5,807,522号、第5,837,832号、第6,040,138号、第6,045,996号、第6,284,460号及び第6,607,885号を参照されたい)。

【0223】

10

具体的な一実施形態では本発明は、任意選択で血糖の上昇の1つ以上の追加的指標との組合せでEno1に対応する核酸を増幅及び検出することによって、異常な血糖を罹患している対象の同定のための方法を含む。

【0224】

増幅のための鋳型として使用される核酸は、生物学的試料に含有される細胞から標準的方法(Sambrook et al., 1989)に従って単離され得る。核酸は、ゲノムDNA又は分画された若しくは全細胞RNAであってよい。RNAが使用される場合、RNAを相補的cDNAに転換することは望ましい場合がある。一実施形態ではRNAは全細胞RNAであり、増幅のための鋳型として直接使用される。

【0225】

20

本明細書で同定するEno1ヌクレオチド配列のいずれかに対応する核酸にハイブリダイズするプライマーの対は、選択的ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で単離された核酸に接触される。ハイブリダイズすると、核酸:プライマー複合体は、鋳型依存核酸合成を促進する1つ以上の酵素と接触される。「サイクル」とも称される増幅の複数ラウンドは、十分な量の増幅産生物が産生されるまで実行される。次に増幅産生物が検出される。特定の応用では検出は、視覚的手段によって実施される場合がある。代替的に検出は、化学発光、組み込まれた放射標識の放射性シンチグラフィ若しくは蛍光標識を介する、又はさらに電氣的若しくは熱的シグナルを使用する系(AFFYMAX technology; Bellus, 1994)を介する産生物の間接的同定を含んでよい。検出に続いて、所与の患者において見られた結果を正常患者及び血糖の上昇を有する患者、例えば前糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病又は1型糖尿病を有する患者の統計的に有意な基準群と比較できる。このように、検出された核酸の量を種々の臨床状況に関連付けることが可能である。

30

【0226】

本明細書で定義される用語プライマーは、鋳型依存的工程での新生核酸の合成を誘発できる任意の核酸を包含して意味される。典型的にはプライマーは、長さ10から20オリゴヌクレオチド、好ましくは15から20ヌクレオチドであるが、より長い配列も用いられてよい。プライマーは、1本鎖形態が好ましいが2本鎖又は1本鎖形態で提供されてよい。

【0227】

多数の鋳型依存工程が所与の鋳型試料中に存在する核酸配列を増幅するために利用可能である。公知の最良の増幅方法の1つは、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第4,683,195号、第4,683,202号及び第4,800,159号並びにInnis et al., 1990に詳細に記載されるポリメラーゼ連鎖反応(PCRと称される)である。

40

【0228】

PCRでは標的核酸配列の反対の相補鎖上の領域に相補的な2つのプライマー配列が調製される。過剰のデオキシヌクレオシド三リン酸はDNAポリメラーゼ、例えばTaqポリメラーゼと共に反応混合物に加えられる。標的核酸配列が試料中に存在する場合、プライマーは標的核酸に結合し、ポリメラーゼは、ヌクレオチドを加えることによってプライマーを標的核酸配列に沿って伸長させる。反応混合物の温度を上昇及び低下させることによって、伸長されたプライマーは反応産生物を形成するように標的核酸から解離し、過剰なプライマーは標的核酸及び反応産生物に結合し、工程が反復される。

50

【0229】

逆転写PCR増幅手順は、増幅されたmRNAの量を定量するために実施され得る。RNAをcDNAに逆転写するための方法は周知でありSambrook et al., 1989に記載されている。逆転写のための代替法は、耐熱性DNAポリメラーゼを利用する。これらの方法はWO 90/07641、1990年12月21日出願に記載されている。ポリメラーゼ連鎖反応の方法は当技術分野において周知である。

【0230】

増幅のための別の方法はリガーゼ連鎖反応(「LCR」)であり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる欧州出願第320308号に開示されている。LCRでは、2つの相補的プローブ対が調製され、標的配列の存在下で、各対はそれらが隣接するように標的の反対の相補鎖に結合する。リガーゼの存在下で、2つのプローブ対は単一の単位を形成するように連結する。温度サイクルによってPCRにおいてと同様に、結合したライゲーション単位は標的から解離し、次いで過剰のプローブ対のライゲーションのための「標的配列」として役立つ。米国特許第4,883,750号は、プローブ対を標的配列に結合させるためのLCRに類似の方法を記載している。

【0231】

PCT出願第PCT/US87/00880号に記載のQベータレプリカーゼも本発明におけるさらに別の増幅方法において使用され得る。本方法では、標的に相補的な領域を有するRNAの複製配列がRNAポリメラーゼの存在下で試料に加えられる。ポリメラーゼは、次いで検出され得る複製配列を複製する。

【0232】

制限部位の1本鎖中にヌクレオチド5'-[α-チオ]-三リン酸を含有する標的分子の増幅を達成するために制限エンドヌクレアーゼ及びリガーゼが使用される等温性増幅方法は、本発明における核酸の増幅において有用であり得る。Walker et al. (1992)、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0233】

鎖置換増幅(SDA)は、鎖置換及び合成、すなわちニック翻訳の複数ラウンドを含む核酸の等温性増幅を実行する別の方法である。修復鎖反応(Repair Chain Reaction)(RCR)と称される類似の方法は、増幅のために標的化された領域全体に通じるいくつかのプローブをアニーリングすることを含み、4個の塩基の2個だけが存在する修復反応が続く。他の2個の塩基は、容易な検出のためにビオチン化誘導体として加えられる。同様の手法がSDAにおいて使用される。標的特異的配列は、循環プローブ反応(cyclic probe reaction)(CPR)を使用しても検出され得る。CPRでは非特異的DNAの3'及び5'配列並びに、特異的RNAの間配列を有するプローブが試料中に存在するDNAにハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションでは反応物は、RNase Hで処置され、プローブの産生物は消化後に放出される特有の産生物として同定される。元の鋳型は別の循環プローブにアニールし、反応は反復される。

【0234】

それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれるGB出願第2202328号及びPCT出願第PCT/US89/01025号に記載のさらに他の増幅方法は、本発明により使用され得る。前者の出願において「修飾される」プライマーはPCR様の、鋳型及び酵素依存合成において使用される。プライマーは、捕捉部分(例えばビオチン)及び/又は検出部分(例えば酵素)での標識化によって修飾され得る。後者の出願では過剰の標識化プローブが試料に加えられる。標的配列の存在下でプローブは、結合し、触媒的に切断される。切断後、標的配列は無処理で放出され過剰なプローブで結合される。標識化プローブの切断は標的配列の存在を知らせる。

【0235】

他に検討された核酸増幅手順は、核酸配列ベース増幅(NASBA)及び3SRを含む転写ベース増幅系(TAS)を含む。Kwoh et al. (1989); Gingeras et al., PCT出願WO 88/10315、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。NASBAでは核酸は、標準的フェノール/クロロ

ホルム抽出、臨床試料の熱変性、溶解緩衝液並びにDNA及びRNAの単離のためのミニスピカラムでの処置又はRNAのグアニジン塩化物抽出によって増幅のために調製され得る。これらの増幅技術は、標的特異的配列を有するプライマーをアニーリングすることを含む。重合に続いて、DNA/RNAハイブリッドをRNase Hで消化し、2本鎖DNA分子を再び熱変性する。いずれの場合でも1本鎖DNAを第2の標的特異的プライマーの付加に続く重合によって完全な2本鎖にする。次いで2本鎖DNA分子はT7又はSP6などのポリメラーゼによって数倍に(multiply)転写される。等温性循環反応ではRNAは2本鎖DNAに逆転写され、T7又はSP6などのポリメラーゼで一度反対に転写される。生じた産生物は、切断型又は完全に関わらず、標的特異的配列を示す。

【0236】

Davey et al., 欧州出願第329822号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)は、本発明により使用され得る1本鎖RNA(「ssRNA」)、ssDNA及び2本鎖DNA(dsDNA)を循環的に合成することを含む核酸増幅工程を開示している。ssRNAは第1のプライマーオリゴヌクレオチドのための第1の鋳型であり、逆転写酵素(RNA依存性DNAポリメラーゼ)によって伸長される。次いでRNAは、生じたDNA:RNA二重鎖からリボヌクレアーゼH(RNase H、DNA又はRNAのいずれかを含む二重鎖のRNAに対して特異的なRNase)の作用によって除去される。生じたssDNAは、鋳型へのその相同性からRNAポリメラーゼプロモーター(T7 RNAポリメラーゼによって増幅される)5'の配列も含む第2のプライマーのための第2の鋳型である。次いでこのプライマーは、DNAポリメラーゼ(大腸菌(E. coli)DNAポリメラーゼ1の大きな「クレノウ」断片によって例示される)によって伸長され、元のRNAのプライマー間のものと同じの配列を有し、追加的に一方の末端にプロモーター配列を有する2本鎖DNA(「dsDNA」)分子を生じる。このプロモーター配列は、DNAの多数のRNA複製物を作るために適切なRNAポリメラーゼによって使用され得る。次いでこれらの複製物は、非常に迅速な増幅を導く循環に再び入ることができる。酵素の正しい選択でこの増幅は、各サイクルでの酵素の添加を伴わずに等温性に行われ得る。この工程の循環的性質のために開始配列は、DNA又はRNAのいずれの形態で選択されてよい。

【0237】

Miller et al., PCT出願WO 89/06700(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)は、プロモーター/プライマー配列の標的1本鎖DNA(「ssDNA」)へのハイブリダイゼーションに続く配列の多数のRNA複製物の転写に基づく核酸配列増幅スキームを開示している。このスキームは循環ではない、すなわち、生じたRNA転写物から新たな鋳型は產生されない。他の増幅方法は「race」及び「片側PCR.TM」を含む。Frohman(1990)及びOhara et al. (1989)、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0238】

生じる「ジオリゴヌクレオチド」の配列を有する核酸の存在下での2つ(又はそれより多い)オリゴヌクレオチドのライゲーション、それによるジオリゴヌクレオチドの増幅に基づく方法は、本発明の増幅ステップにおいても使用され得る。Wu et al. (1989)、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0239】

本発明のオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーは、具体的なアッセイフォーマット並びに具体的な必要性及び用いられた標的化配列に応じて任意の好適な長さであってよい。好ましい実施形態ではオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーは、長さ少なくとも10ヌクレオチド(好ましくは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32…)、好ましくは長さ少なくとも15ヌクレオチド(15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32…)であり、それらは選んだ核酸増幅系及び/又は使用するハイブリダイゼーション系に特に適するように適合され得る。より長いプローブ及びプライマーも当技術分野において十分公知のとおり本発明の範囲内である。30より多い、40より多い、50より多いヌクレオチドを有するプライマー並びに長さ100より長い、200より長い、300より長い、500より長い800より長い及び1000より長いヌクレオチドを有するプローブも本発明により網羅される。当

然のことながらより長いプライマーは、より高価である不利点を有し、それにより長さ15から30の間のヌクレオチドを有するプライマーが当技術分野において通常設計され、使用される。当技術分野において十分公知のとおり、長さ10から2000を超えるヌクレオチド範囲のプロープは本発明の方法において使用され得る。上に記載の同一性%について、プロープ及びプライマーの特定せずに記載したサイズ(例えば16、17、31、24、39、350、450、550、900、1240ヌクレオチド…)も本発明の範囲内である。一実施形態では本発明のオリゴヌクレオチドプロープ又はプライマーは、Eno1 RNA(若しくはその相補的配列)又はEno1 mRNAに特異的にハイブリダイズする。より好ましくはEno1プライマー及びプロープは、例えば前糖尿病、2型糖尿病、1型糖尿病若しくは妊娠糖尿病に関連する血糖の上昇又は異常な血糖制御に伴うEno1 RNAを検出するために選ばれる。

10

【0240】

他の実施形態では検出手段は、例えば特異プライマー又はプロープが目的の標的バイオマーカー、例えばEno1にアニールするために選択される場合ハイブリダイゼーション技術を利用でき、それにより選択的ハイブリダイゼーションの検出が行われる。一般に当技術分野において公知のとおり、オリゴヌクレオチドプロープ及びプライマーは、その標的化配列とのハイブリダイゼーションの融点を考慮して設計され得る(下記及びSambrook et al., 1989, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, 2nd Edition, CSH Laboratories; Ausubel et al., 1994, in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., N.Y.を参照されたい)。

20

【0241】

本発明のアッセイ条件下でハイブリダイゼーションが生じるようにするために、オリゴヌクレオチドプライマー及びプロープは、Eno1ポリヌクレオチドの一部に少なくとも70%(少なくとも71%、72%、73%、74%以上)、好ましくは少なくとも75%(75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%以上)及びより好ましくは少なくとも90%(90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%)同一性を有するオリゴヌクレオチド配列を含むべきである。本発明のプロープ及びプライマーは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするもの、及び少なくとも中程度にストリンジェントな条件下でEno1相同体にハイブリダイズするものである。特定の実施形態では本発明のプロープ及びプライマーは、Eno1遺伝子配列(例えばcDNA又はmRNA)に完全な配列同一性を有する。他のプロープ及びプライマーが、当技術分野において公知のコンピューター配列比較及び配列分析の方法を使用することによって、本明細書に開示のEno1配列に基づいて本発明において容易に設計され、使用され得ることは理解されるべきである(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, edited by Cold Spring Harbor Laboratory, 2000を参照されたい)。

30

【0242】

C. 血糖コントロールの血糖のポリペプチド指標の検出

本発明は、Eno1及びHbA1cを含む血糖のポリペプチド指標を検出するための任意の好適な方法を検討する。特定の実施形態では検出方法は、Eno1及びヘモグロビンの1つ以上に特異的に、特に糖化ヘモグロビンに特異的に結合する抗体を含む免疫検出法である。種々の有用な免疫検出法のステップは、参照により本明細書に組み込まれる、例えばNakamura et al. (1987)などの科学文献に記載されている。

40

【0243】

一般に、免疫結合方法は、血糖の上昇のタンパク質又はペプチド指標を含有することが疑われる試料を得ること、試料を本発明による抗体と接触させることを含み、この場合は免疫複合体の形成を可能にするために有効な条件下であってよい。

【0244】

免疫結合方法は、試料中の反応性構成成分を検出する又はその量を定量する方法を含み、方法は結合工程の際に形成された任意の免疫複合体の検出又は定量を必要とする。ここで、血糖の上昇のタンパク質又はペプチド指標を含有することが疑われる試料を得て、試料を抗体と接触させ、次いで特定の条件下で形成される免疫複合体を検出又はその量を定

50

量する。

【0245】

血糖の指標の検出に関して分析される生物学的試料は、Eno1又はHbA1cなどの血糖のタンパク質又はペプチド指標を含有することが疑われる任意の試料であってよい。生物学的試料は、例えばHbA1cの場合は血液又はEno1の場合は血液若しくは血清であってよい。

【0246】

免疫複合体(一次性免疫複合体)の形成を可能にするために有効な条件下及び十分な時間、選ばれた生物学的試料を抗体(例えば生物学的試料中でEno1、HbA1c又はヘモグロビンに結合する検出試薬として)と接触させること。一般に複合体形成は、組成物を単に生物学的試料に加え、混合物を抗体が存在する任意の抗原と免疫複合体を形成する、すなわちそれに結合するために十分な時間インキュベートするだけのことである。この後、組織セクション、ELISAプレート、ドットプロット又はウエスタンブロットなどの試料抗体組成物は、一般に一次性免疫複体内に特異的に結合した抗体だけが検出され得るように、いかなる非特異的に結合した抗体種も除去するために洗浄される。

【0247】

一般に免疫複合体形成の検出は当技術分野において周知であり、多数の手法の適用を通じて達成され得る。これらの方法は、一般に当技術分野における標準的使用の任意の放射性、蛍光、生物学的若しくは酵素的タグ又は標識などの標識又はマーカーの検出に基づいている。そのような標識の使用に関連する米国特許は、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号及び第4,366,241号を含む。当然のことながら、当技術分野において公知である二次抗体又はビオチン/アビジンリガンド結合配置などの二次結合リガンドの使用を通じて追加的有利点を見出すことができる。

【0248】

検出において用いられる抗体(例えば抗Eno1抗体、抗ヘモグロビン又は抗糖化ヘモグロビン抗体)は、それ自体が検出可能な標識に連結されていてよく、この場合単にこの標識を検出し、それにより組成物中の一次性免疫複合体の量を決定できるようにする。

【0249】

代替的に、一次性免疫複体内に結合するようになる最初に加えられた構成成分は、結合した抗体に結合親和性を有する第2の結合リガンドの手段によって検出され得る。これらの場合第2の結合リガンドは、検出可能な標識に連結され得る。第2の結合リガンドはそれ自体が、多くの場合抗体であり「二次」抗体と呼ばれる場合がある。一次性免疫複合体は、標識化された、二次結合リガンド又は抗体と、二次免疫複合体の形成を可能にするために有効な条件下及び十分な時間接触される。二次免疫複合体は、次いでいかなる非特異的に結合した標識化二次抗体又はリガンドも除去するために一般に洗浄され、二次免疫複合体中の残っている標識は検出される。

【0250】

さらに方法は、2ステップ手法による一次性免疫複合体の検出を含む。コードされたタンパク質、ペプチド又は対応する抗体に対して結合親和性を有する抗体などの第2の結合リガンドは、上に記載の二次免疫複合体を形成するために使用される。洗浄後、二次免疫複合体は、二次抗体に対して結合親和性を有する第三の結合リガンド又は抗体と、再度免疫複合体(三次免疫複合体)の形成を可能にするために有効な条件下及び十分な時間接触される。第3のリガンド又は抗体は、検出可能な標識に連結され、形成された三次免疫複合体の検出を可能にする。この系は、これが望ましい場合にシグナル増幅を提供できる。

【0251】

本発明の免疫検出法は、血糖の上昇、血糖コントロールの喪失及び糖尿病などの状態の診断において明らかな有用性を有する。本明細書において、コードされたタンパク質又は糖化ペプチドのいずれかを含有することが疑われる生物学的又は臨床的試料が使用される。しかしこれらの実施形態は、抗原又は抗体試料の力価測定において、ハイブリドーマの選択においてなどの非臨床試料への適用も有する。

【0252】

本発明は具体的には、免疫検出アッセイの一種としてのELISAの使用を検討する。本発明のバイオマーカータンパク質又はペプチドが、異常な血糖及び糖尿病を診断及び予後的にモニタリングするELISAアッセイにおいて免疫原としての有用性を見出すことが検討される。イムノアッセイは、それらの最も簡易で直接の意味で、結合アッセイである。特定の好ましいイムノアッセイは、当技術分野において公知の種々の種類の酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及び放射線イムノアッセイ(RIA)である。組織セクションを使用する免疫組織化学検出は有用である場合がある。しかし検出がそのような技術に限定されないことは容易に理解され、ウエスタンブロット、ドットブロットなども使用され得る。

【0253】

一例示的ELISAでは本発明のタンパク質指標に結合している抗体は、ポリスチレンマイクロタイタープレートのウェルなどのタンパク質親和性を表している選択された表面に固定される。次いで血液又は血清試料などの、血糖レベルの指標を含有することが疑われる検査組成物は、ウェルに加えられる。結合及び、非特異的に結合した免疫複合体を除去するための洗浄後、結合した抗原は検出され得る。検出は、指標タンパク質に対して特異的で、検出可能な標識に連結された二次抗体の付加によって一般に達成される。この種類のELISAは、試料「サンドイッチELISA」である。検出は、二次抗体の付加に続く、二次抗体に結合親和性を有する三次抗体の付加によっても、三次抗体が検出可能な標識に連結されていて、達成され得る。

【0254】

別の例示的ELISAでは、血糖指標タンパク質を含有することが疑われる試料は、ウェル表面に固定化され、次いで指標に結合するための特異的抗体に接触される。結合及び、非特異的に結合した免疫複合体を除去するための洗浄後、結合した抗原が検出される。初期抗体が検出可能な標識に連結されている場合、免疫複合体は直接検出できる。再度免疫複合体は、検出可能な標識に連結されている二次抗体と共に、一次抗体に結合親和性を有する二次抗体を使用して検出され得る。

【0255】

用いられるフォーマットに無関係にELISAはコーティング、インキュベーション又は結合、非特異的に結合した分子種を除去するための洗浄及び、結合した免疫複合体を検出することなどのある種の一般的特性を有する。これらは下に記載されている。

【0256】

抗原又は抗体のいずれかを含むコーティングプレートでは、一般にプレートのウェルを抗原又は抗体の溶液で一晩又は具体的な期間についてインキュベートする。次いでプレートのウェルは、不完全に吸着した材料を除去するために洗浄される。ウェルの残っているすべての利用可能な表面は、次いで検査高抗血清に関して抗原的に中性である非特異的タンパク質で「コートされる」。これらは、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン及び粉末ミルクの溶液を含む。コーティングは、固定している表面上の非特異的吸着部位のブロッキングを可能にし、それにより表面上の抗血清の非特異的によって生じるバックグラウンドを低減する。

【0257】

ELISAでは、直接手順より二次又は三次検出手段を使用することは日常的である。したがって、タンパク質又は抗体のウェルへの結合、バックグラウンドを低減するための非反応性材料でのコーティング及び非結合材料を除去するための洗浄後、固定化表面を対照生物学的試料、例えば免疫複合体(抗原/抗体)形成を可能にする有効な条件下で検査される正常な血糖及び/又は十分な血糖コントロールを有する対象由来の血液又は血清、と接触させる。次いで免疫複合体の検出は、標識化二次結合リガンド若しくは抗体、又は二次結合リガンド若しくは抗体を、標識化三次抗体若しくは第3の結合リガンドと共に必要とする。

【0258】

句「免疫複合体(抗原/抗体)形成を可能にするために有効な条件下」は、抗原及び抗体

10

20

30

40

50

をBSA、ウシガンマグロブリン(BGG)及びリン酸緩衝生理食塩水(PBS)/Tweenなどの溶液で希釈することを好ましくは含む条件を意味する。これらの加えられる薬剤は、非特異的バックグラウンドの低減に役立つ傾向もある。

【0259】

「好適な」条件は、インキュベーションが有効な結合を可能にするための温度及び十分な時間であることも意味する。インキュベーションステップは、典型的には約1から約4時間好ましくは約25から27℃程度の温度であり、又は一晩約4℃などであってもよい。

【0260】

ELISAでのすべてのインキュベーションステップに続いて、非複合体化材料を除去するために接触表面を洗浄する。好ましい洗浄手順は、PBS/Tween又はホウ酸緩衝液などの溶液での洗浄を含む。検査試料と本来の結合材料との間の特異的免疫複合体の形成及び続く洗浄の後、わずかな量の免疫複合体の発生も検出され得る。

10

【0261】

検出手段を提供するために、二次又は三次抗体は検出を可能にするための結合された標識を有する。好ましくは、標識は、適切な発色基質とのインキュベーションで発色を生じる酵素である。したがって例えば第1の又は第2の免疫複合体は、尿素、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ又は水素ペルオキシダーゼ(hydrogen peroxidase)コンジュゲート抗体と一定期間、さらなる免疫複合体形成の発達に有利な条件下で接触され、インキュベートされる(例えば2時間、室温、PBS-TweenなどのPBS含有溶液中でのインキュベーション)。

20

【0262】

標識化抗体とのインキュベーション後、非結合材料を除去するための洗浄に続いて、例えば尿素及びプロモクレゾールパープルなどの発色基質とのインキュベーションによって標識の量が定量される。次いで定量は、発色の程度を例えば可視スペクトル分光光度計を使用して測定することによって達成される。

【0263】

タンパク質バイオマーカー/本発明の指標(例えばEno1、HbA1c)は、タンパク質質量分析法及び装置を使用しても測定、定量、検出及び他に分析され得る。タンパク質質量分析は、質量分析のタンパク質の研究への適用を指す。限定する意図はないが、2つの手法は典型的には質量分析を使用してタンパク質を特徴付けるために使用される。最初に未処置タンパク質は、イオン化され、次いで質量分析機に導入される。この手法はタンパク質分析の「トップダウン」戦略と称される。全タンパク質のイオン化のための2つの主な方法は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)及びマトリクス支援レーザー脱離/イオン化(MALDI)である。第2の手法では、タンパク質は、トリプシンなどのプロテアーゼを使用して小さなペプチドに酵素的に消化される。続いてこれらのペプチドは質量分析計に導入され、ペプチド質量フィンガープリンティング又はタンデム質量分析によって同定される。それにより、この後者の手法(「ボトムアップ」プロテオミクスとも称される)は、ペプチドレベルでの同定をタンパク質の存在を推定するために使用する。

30

【0264】

本発明のバイオマーカーの全タンパク質質量分析は、飛行時間型(TOF)MS、又はフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(FT-ICR)を使用して実施され得る。これらの2つの種類の装置は、それらの広い質量範囲及びFT-ICRの場合はその高い質量精度から有用である。ペプチド質量分析のために最も広く使用されている装置は、高いペース(1PMFはおよそ10秒間で分析され得る)でのペプチド質量フィンガープリント(PMF)の取得を可能にすることからMALDI飛行時間型装置である。多段階四重極飛行時間型及び四重極イオントラップも本出願における使用を見出す。

40

【0265】

タンパク質指標も生物学的培地又は試料と共存するタンパク質及び分子の複合体混合物中で測定され得るが、試料の分画が必要とされる場合があり、本明細書において検討される。タンパク質の複合体混合物のイオン化は、より豊富なタンパク質が同じ試料中のあま

50

り豊富ではないタンパク質からのシグナルを「かき消す(drown)」又は抑制する傾向がある状況を生じ得ることは理解される。付加的に、複合体混合物からの質量スペクトルは、混合物構成成分の圧倒的な数から解釈することが困難である場合がある。分画は、質量分析の前にタンパク質の任意の複合体混合物を最初に分離するために使用されうる。2つの方法がタンパク質又は酵素消化からのそれらのペプチド産生物を分画するために広く使用されている。第1の方法は、全タンパク質を分画し、2次元ゲル電気泳動と呼ばれる。第2の方法は、高速液体クロマトグラフィー(LC又はHPLC)が酵素消化後にペプチドを分画するために使用される。いくつかの状況では、これらの技術の両方を組み合わせることは望ましい場合がある。タンパク質混合物を分画するための当技術分野において公知の任意の他の好適な方法も本明細書において検討される。

10

【0266】

2Dゲル上に同定されるゲルスポットは、通常1つのタンパク質に起因する。タンパク質の同一性が望まれる場合、目的のタンパク質スポットが切り出され、タンパク質分解的に消化される場所でゲル中消化の方法が通常適用される。消化から生じるペプチド質量はペプチド質量フィンガープリンティングを使用する質量分析によって決定され得る。この情報がタンパク質の明解な同定を可能にしない場合、そのペプチドはデノボ配列決定のためにタンデム質量分析に供されてよい。

【0267】

HPLC/MSを使用するタンパク質混合物の特徴付けは、当技術分野において「ショットガンプロテオミクス」及びMuDPIT(多次元タンパク質同定技術)と称される場合もある。タンパク質混合物の消化から生じるペプチド混合物は1又は2ステップの液体クロマトグラフィー(LC)によって分画される。クロマトグラフィー段階からの溶出物は、エレクトロスプレーイオン化を通じて質量分析計に直接に導入されてよい、又はMALDIを使用する後の質量分析のために一連の小さなスポットに置かれる、のいずれであってもよい。

20

【0268】

タンパク質指標(例えばEno1又はHb1Ac)は、そのすべてが本明細書において検討される種々の技術を使用するMSを使用して同定され得る。ペプチド質量フィンガープリンティングは、公知のタンパク質のリストの消化から生じる予測される質量のデータベースの検索のための入力としてタンパク質分解性ペプチドの質量を使用する。参照リスト中のタンパク質配列が実験値と合致するかなりの数の予測される質量を生じる場合、このタンパク質が元の試料中に存在したことのいくらかの証拠になる。マイクロキャピラリー液体クロマトグラフィー(LC)及びデータベース検索を備えた自動化、データ依存エレクトロスプレーイオン化(ESI)タンデム質量分析(MS/MS)のための方法及び装置の開発が、ゲル分離タンパク質の同定の感度及び速度を顕著に増加させたことはさらに理解される。マイクロキャピラリーLC-MS/MSは、ゲル電気泳動的分離を伴わずに混合物から直接での個々のタンパク質の大規模同定のために成功裏に使用されている(Link et al., 1999; Opitek et al., 1997)。

30

【0269】

いくつかの近年の方法は、質量分析によるタンパク質の定量を可能にしている。例えば炭素(^{13}C)又は窒素(^{15}N)の安定な(例えば非放射性)より重い同位体は、1つの試料に組み込まれることができ、一方他の1つは対応する軽い同位体(例えば ^{12}C 及び ^{14}N)で標識化され得る。2つの試料は分析の前に混合される。異なる試料由来のペプチドは、それらの質量の差異から識別され得る。それらのピーク強度の比は、ペプチド(及びタンパク質)の相対存在比に対応する。同位体標識のための最も一般的な方法は、SILAC(細胞培養中でのアミノ酸による安定同位体標識化)、トリプシン触媒 ^{18}O 標識化、ICAT(同位体コード親和性タグ化)、iTRAQ(相対的及び絶対的定量的のための等圧性タグ)である「半定量的」質量分析は、試料の標識化を伴わずに実施され得る。典型的にはこれは、MALDI分析(直鎖状様式)で行われる。個々の分子(典型的にはタンパク質)からのピーク強度又はピーク面積は、ここで試料中のタンパク質の量に比例する。しかし個々のシグナルはタンパク質の一次構造、試料の複合度及び装置の設定に依存する。他の種類の「標識不含有」定量的質量分析は

40

50

、相対的タンパク質量を決定するための手段として消化されたタンパク質のスペクトルカウント(又はペプチドカウント)を使用する。

【0270】

一実施形態では、任意の1つ以上のタンパク質指標(例えばEno1、HbA1c)が本発明又は他の質量分析に基づく方法の使用を限定することを意図しない、次の例示的方法に従って質量分析を使用して複合体生物学的試料から同定及び定量され得る。

【0271】

本実施形態の第1のステップでは、(A)タンパク質の複合体混合物(少なくとも1つの目的の指標を含む)を含む、生物学的試料、例えば血糖が上昇していることが疑われる生物学的試料は、断片化及び安定同位体Xで標識化される。(B)次に内部標準の既知の量が生物学的試料に加えられ、ここで内部標準は少なくとも1つの目的の標的バイオマーカーと同一である標準タンパク質を断片化することによって調製され、安定同位体Yで標識化される。(C)この得られた試料は次にLC-MS/MSデバイスに導入され、多重反応モニタリング(MRM)分析がMRMクロマトグラムを得るための内部標準のために選択されたMRM遷移(transition)を使用して実施される。(D)MRMクロマトグラムは、次いで内部標準由来のペプチド(内部標準ペプチド)と同じ保持時間を示す生物学的試料由来の標的ペプチドバイオマーカーを同定する、及び内部標準ペプチドのピーク面積と標的ペプチド指標のピーク面積とを比較することによって、検査試料中の標的タンパク質指標を定量するために観察される。

【0272】

任意の好適な生物学的試料は、血液、尿、唾液、毛髪、細胞、細胞組織、生検材料由来の生物学的試料及びそれらの処置された産物、並びに遺伝子組換え技術によって調製されるタンパク質含有試料を含んでLC-MS/MS/MRM分析のための出発点として使用され得る。本発明の好ましい実施形態は血液又は血清試料の使用を含む。

【0273】

上のステップ(A)から(D)それぞれは下にさらに記載される。

【0274】

ステップ(A)(断片化及び標識化)。ステップ(A)では標的タンパク質指標は、ペプチドの集合に断片化され、次に安定同位体Xで標識化される。標的タンパク質を断片化するために、例えばトリプシンなどのタンパク質分解性酵素(プロテアーゼ)で標的タンパク質を消化する方法、及び、臭化シアンを使用する方法などの化学的な切断方法は使用され得る。プロテアーゼによる消化は好ましい。所与のモル量タンパク質は、タンパク質分解性消化が完了に向けて進行している場合、各トリプシンペプチド切断産物について同じモル量を産生することは公知である。したがって、所与のタンパク質のトリプシンペプチドのモル量を決定することは、試料中の元のタンパク質のモル量の決定を可能にする。標的タンパク質の絶対的定量は、プロテアーゼ消化(ペプチドの集合)に含有される標的タンパク質由来ペプチドの絶対量を決定することによって達成される。したがって、タンパク質分解性消化を完了まで進行させるために、還元及びアルキル化処置は、標的タンパク質に含有されるジスルフィド結合を還元及びアルキル化するために好ましくはトリプシンでのプロテアーゼ消化の前に行われる。

【0275】

次に得られた消化物(生物学的試料中の標的バイオマーカーのペプチドを含むペプチドの集合物)は、安定同位体Xでの標識化に供される。安定同位体Xの例は、水素原子についての1H及び2H、炭素原子についての12C及び13C並びに窒素原子についての14N及び15Nを含む。任意の同位体がそれらから適切に選択され得る。安定同位体Xによる標識化は、消化物(ペプチドの集合物)を、安定同位体を含有する試薬と反応させることによって実施され得る。商業的に入手できるそのような試薬の好ましい例は、アミン特異的安定同位体試薬キットであるmTRAQ(登録商標)(Applied Biosystemsによって製造)を含む。mTRAQ(登録商標)は、同位体標識化の結果としてその間に一定の質量差を有し、ペプチドのN-末端又はリジン残基の一級アミンに結合している2又は3種類の試薬からなる(mTRAQ(登録商標)-軽及びmTRAQ(登録商標)-重、又はmTRAQ(登録商標)-D0、mTRAQ(登録商標)-D4、及びmTRAQ(登録商標)-

録商標)-D8)。

【0276】

ステップ(B)(内部標準の付加)。ステップ(B)では、既知の量の内部標準がステップ(A)で得られた試料に加えられる。本明細書で使用する内部標準は、測定される標的タンパク質(標的バイオマーカー)と同じアミノ酸配列からなるタンパク質(標準タンパク質)の断片化及び得られた消化物(ペプチドの集合物)の安定同位体Yでの標識化によって得られる消化物(ペプチドの集合物)である。断片化処置は、上の標的タンパク質についてと同じ様式で実施されてよい。安定同位体Yでの標識化は、上の標的タンパク質と同じ様式で実施されてよい。しかし本明細書で使用する安定同位体Yは、標的タンパク質消化物を標識化するために使用される安定同位体Xとは異なる質量を有する同位体でなければならない。例えば前述のmTRAQ(登録商標)(Applied Biosystemsによって製造)を使用する場合、mTRAQ-軽が標的タンパク質消化物を標識化するために使用される時は、mTRAQ-重が標準タンパク質消化物を標識化するために使用されなければならない。

10

【0277】

ステップ(C)(LC-MS/MS及びMRM分析)。ステップ(C)ではステップ(B)において得られた試料が最初にLC-MS/MSデバイスに置かれ、次いで多重反応モニタリング(MRM)分析が内部標準について選択されたMRM遷移を使用して実施される。LC-MS/MSデバイスを使用するLC(液体クロマトグラフィー)によって、ステップ(B)において得られた試料(安定同位体で標識化されたペプチドの集合物)が一次元又は多次元高速液体クロマトグラフィーによって最初に分離される。そのような液体クロマトグラフィーの具体的な例は、分離がペプチド間の電荷の差異を利用することによって行われるカチオン交換クロマトグラフィー、及び分離がペプチド間の疎水性差異を利用することによって行われる逆相クロマトグラフィーを含む。これらの方法の両方は、組合せて使用されてよい。

20

【0278】

続いて分離された各ペプチドは、直列に繋がれた2台の質量分析計を含むタンデム質量分析計(MS/MS分析計)を使用することによるタンデム質量分析に供される。そのような質量分析計の使用は、標的タンパク質の数fmolレベルの検出を可能にする。さらにMS/MS分析は、ペプチド上の内部配列情報の分析を可能にし、それにより誤検出を伴わない同定を可能にする。磁場型質量分析計(Sector MS)、四重極質量分析計(QMS)、飛行時間型質量分析計(TOFMS)及びフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計(FT-ICRMS)並びにこれらの分析機の組合せを含む他の種類のMS分析機も使用され得る。

30

【0279】

続いて得られたデータは、スペクトル割り当てを実施するため及び各タンパク質について実験的に検出されたペプチドを列挙するために検索エンジンに通される。検出されたペプチドは、各タンパク質について好ましくは分類され、好ましくは前駆体イオンのものより大きいm/z値を有する少なくとも3つの断片及び好ましくは500以上のm/z値を有する少なくとも3つの断片がスペクトル上のシグナル強度の降順に各MS/MSスペクトルから選択される。これらから2つ以上断片が強度の降順で選択され、強度の平均はMRM遷移の予測される感度として定義される。複数のペプチドが1つのタンパク質から検出される場合、最も高い感度の少なくとも2つのペプチドが指標として予測される感度を使用して標準ペプチドとして選択される。

40

【0280】

ステップ(D)(検査試料中の標的タンパク質の定量)。ステップ(D)は、ステップ(C)で検出されたMRMクロマトグラムにおいて、内部標準(内部標準ペプチド)由来のペプチドと同じ保持時間を示す標的タンパク質(目的の標的バイオマーカー)由来のペプチドを同定すること、及び内部標準ペプチドのピーク面積を標的ペプチドのピーク面積と比較することによって検査試料中の標的タンパク質を定量することを含む。標的タンパク質は予め調製された標準タンパク質の校正曲線を利用することによって定量され得る。

【0281】

校正曲線は、次の方法によって作成され得る。最初に標的バイオマーカータンパク質の

50

ものと同一のアミノ酸配列からなる組換えタンパク質はトリプシンなどのプロテアーゼで、上に記載のとおり消化される。次に、既知の濃度の前駆体断片遷移選択標準物質(PTFS)は、2つの異なる種類の安定同位体で個々に標識化される(すなわち、一方は内部標準ペプチド(ISで標識)を標識化するために使用される安定異性体で標識化され、他方は標的ペプチドを標識化するために使用される安定異性体で標識化される(Tで標識化))。複数の試料は、一定量のIS-標識化PTFSを種々の濃度のT-標識化PTFSと混ぜることによって産生される。これらの試料は、MRM分析を実施するために前述のLC-MS/MSデバイスに置かれる。得られたMRMクロマトグラム上でのT-標識化PTFS対IS-標識化PTFS(T-標識化PTFS/IS-標識化PTFS)の面積比は、校正曲線を作成するためにT-標識化PTFSの量に対してプロットされる。検査試料中に含有される標的タンパク質の絶対量は校正曲線を参照することによって算出され得る。

10

【0282】

D. 抗体及び標識(例えば蛍光部分及び色素)

いくつかの実施形態では本発明は、本発明の生体分子、例えばEno1単独若しくは血糖及び血糖コントロールのための少なくとも1つの他の指標、例えばHbA1c、ケトンとの組合せで高感度検出及び定量、又は血糖の直接測定のための標識を含む方法及び組成物を提供する。当業者は多数の戦略が、標的分子の検出及び粒子の混合物中での識別を可能にするために標的分子を標識化するために使用され得ることを認識する(例えば標識化抗Eno1抗体若しくは標識化二次抗体、又はEno1 mRNAに特異的にハイブリダイズする標識化オリゴヌクレオチドプローブ)。標識は、標識及び標的の非特異的又は特異的相互作用を利用する

20

【0283】

いくつかの実施形態では標識は、目的の指標に結合する結合パートナーを含み、ここで結合パートナーは蛍光部分に結合している。本発明の組成物及び方法は高度な蛍光部分を利用できる、例えば部分の励起波長でレーザー発光によって刺激される場合に、少なくとも約200光子を発光できる部分、ここでレーザーは部分を含有している直径約5ミクロン以上のスポットに焦点を合わせられ、レーザーによってスポットに方向付けられる総エネルギーは約3マイクロジュール以下である。本発明の組成物及び方法のために好適な部分は

30

【0284】

いくつかの実施形態では本発明は、蛍光部分に結合している生物学的分子に対する結合パートナーを含む生物学的分子を検出するための標識を提供し、ここで蛍光部分は、部分の励起波長でレーザー発光によって刺激される場合に、少なくとも約200光子を発光でき、ここでレーザーは部分を含有している直径約5ミクロン以上のスポットに焦点を合わせられ、レーザーによってスポットに方向付けられる総エネルギーは約3マイクロジュール以下である。いくつかの実施形態では部分は、複数の蛍光実体、例えば約2個から4個、2個から5個、2個から6個、2個から7個、2個から8個、2個から9個、2個から10個又は約3個から5個、3個から6個、3個から7個、3個から8個、3個から9個若しくは3個から10個の蛍光実体を含む。いくつかの実施形態では部分は、約2個から4個の蛍光実体を含む。いくつかの実施形態では生物学的分子はタンパク質又は小分子である。いくつかの実施形態では生物学的分子はタンパク質である。蛍光実体は蛍光色素分子であってよい。いくつかの実施形態では蛍光色素分子は、インドリウム環(indolium ring)の3-炭素上の置換基が化学的に反応性の基又はコンジュゲートされた物質を含有する少なくとも1つの置換されたインドリウム環系を含む。いくつかの実施形態では色素分子は、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 680又はAlexa Fluor 700からなる群から選択されるAlexa Fluor分子である。いくつかの実施形態では色素分子は、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 680又はAlexa Fluor 700からなる群から選択されるAlexa Fluor分子である。いくつかの実施形態では色素分子は、Alexa Fluor 647色素分子である

40

50

。いくつかの実施形態では色素分子は、第1の型及び第2の型の色素分子、例えば2つの異なるAlexa Fluor分子を含み、例えば第1の型及び第2の型の色素分子が異なる発光スペクトルを有する。第1の型対第2の型の色素分子の数の比は、例えば4対1、3対1、2対1、1対1、1対2、1対3又は1対4であってよい。結合パートナーは例えば抗体であってよい。

【0285】

いくつかの実施形態では本発明は、本発明の生物学的指標の検出のための標識を提供し、ここで標識は指標及び蛍光部分に対する結合パートナーを含み、ここで蛍光部分は、部分の励起波長でレーザー発光によって刺激される場合に、少なくとも約200光子を発光でき、ここでレーザーは部分を含むしている直径約5ミクロン以上のスポットに焦点を合わせられ、レーザーによってスポットに方向付けられる総エネルギーは約3マイクロジュール以下である。いくつかの実施形態では蛍光部分は蛍光分子を含む。いくつかの実施形態では蛍光部分は複数の蛍光分子、例えば約2から10個、2から8個、2から6個、2から4個、3から10個、3から8個又は3から6個の蛍光分子を含む。いくつかの実施形態では標識は、約2から4個の蛍光分子を含む。いくつかの実施形態では蛍光色素分子は、インドリウム環の3-炭素上の置換基が化学的に反応性の基又はコンジュゲートされた物質を含むする少なくとも1つの置換されたインドリウム環系を含む。いくつかの実施形態では蛍光分子は、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 680又はAlexa Fluor 700からなる群から選択される。いくつかの実施形態では蛍光分子はAlexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 680又はAlexa Fluor 700からなる群から選択される。いくつかの実施形態では蛍光分子はAlexa Fluor 647分子である。いくつかの実施形態では結合パートナーは抗体を含む。いくつかの実施形態では抗体はモノクローナル抗体である。他の実施形態では抗体はポリクローナル抗体である。

【0286】

種々の実施形態では目的の指標、例えばEno1又はHbA1cを検出するための結合パートナーは、抗体又はその抗原結合断片である。本明細書において使用される用語「抗体」は、広義語であり、非限定的に、例えば1本鎖抗体、キメラ、二機能性及びヒト化抗体並びにそれらの抗原結合断片を含む天然に存在する抗体及び天然に存在しない抗体を指すことを含んで一般的意味で使用される。抗体の「抗原結合断片」は、抗原結合に関与する抗体の部分の指す。抗原結合部位は、重(「H」)及び軽(「L」)鎖のN末端可変(「V」)領域のアミノ酸残基によって形成される。抗体を生じさせる分子のエピトープ又は領域の選択が、例えば、存在する場合は、分子の種々の形態に対する又は全体(例えば分子のすべて又は実質的にすべて)に対するその特異性を決定することは理解される。

【0287】

抗体を産生するための方法は十分に確立されている。当業者は多数の手順が抗体の産生のために利用可能であることを認識している、例えばAntibodies, A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y.に記載のとおり。当業者は、抗体を模倣する結合断片又はFab断片が種々の手順によって遺伝的情報から調製され得ることも理解する(Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebaeck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914~3920 (1992))。分子、例えばタンパク質及びマーカーに対するモノクローナル及びポリクローナル抗体も商業的に入手できる(R and D Systems、Minneapolis、Minn.; HyTest、HyTest Ltd.、Turku Finland; Abcam Inc.、Cambridge、Mass.、USA、Life Diagnostics、Inc.、West Chester、Pa.、USA; Fitzgerald Industries International、Inc.、Concord、Mass. 01742~3049 USA; BiosPacific、Emeryville、Calif.)。

【0288】

いくつかの実施形態では抗体はポリクローナル抗体である。他の実施形態では抗体はモノクローナル抗体である。

【0289】

抗体は、当業者に公知の種々の技術のいずれかによって調製され得る(例えばHarlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参

照されたい)。一般に抗体は、本明細書に記載のモノクローナル抗体の生成を含む細胞培養技術によって又は抗体遺伝子の好適な細菌性若しくは哺乳動物細胞宿主へのトランスフェクションを介して産生され、組換え抗体の産生を可能にし得る。

【0290】

モノクローナル抗体は、Kohler及びMilsteinの技術(Eur. J. Immunol. 6:511~519, 1976)などの融合細胞法及びその改善法を使用して調製され得る。これらの方法は、所望の特異性を有する抗体を産生できる不死細胞株の調製を含む。モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載のものなどの組換えDNA法によって作られてもよい。開示された方法で用いられる抗体をコードしているDNAは従来の手順を使用して単離及び配列決定されてよい。組換え抗体、抗体断片及び/又はその融合物はin vitroで又は原核細胞(例えば細菌)若しくは真核細胞(例えば酵母、昆虫若しくは哺乳動物細胞)で発現されてよく、さらに必要に応じて周知の方法を使用して精製されてよい。

【0291】

さらに具体的にはモノクローナル抗体(MAb)は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,196,265号に例示のものなどの周知の技術の使用を通じて容易に調製され得る。典型的にはこの技術は、好適な動物を選択された免疫原組成物、例えば精製された又は部分的に精製された発現タンパク質、ポリペプチド又はペプチドで免疫化することを含む。免疫化組成物は、抗体産生細胞を刺激するために有効な様式で投与される。モノクローナル抗体(MAb)を生成するための方法は、一般にポリクローナル抗体を調製するためのものと同じ系で開始する。マウス及びラットなどのげっ歯類は、好ましい動物であるが、しかしウサギ、ヒツジ又はカエル細胞の使用も可能である。ラットの使用は、ある種の有利点を提供できる(Goding, 1986, pp. 60~61)が、BALB/cマウスが最も日常的に使用され、一般に安定な融合を高いパーセントでもたらしことから最も好ましいため、マウスが好ましい。

【0292】

動物は、上に記載の抗原を注射される。抗原は、必要に応じてキーホールリンペットヘモシアニンなどの担体分子にカップルされ得る。抗原は、フロイントの完全又は不完全アジュバントなどのアジュバントと典型的には混合される。同じ抗原を含む追加免疫注射は、およそ2週間間隔で行われる。免疫処置に続いて、抗体を産生する潜在力を有する体細胞、具体的にはBリンパ球(B細胞)はMab生成プロトコールにおける使用のために選択される。これらの細胞は、生検された脾臓、扁桃性若しくはリンパ節から又は末梢血液試料から得ることができる。脾臓細胞及び末梢血液細胞は、前者はそれらが分割している形質芽細胞段階にある抗体産生細胞の豊富な供給源であること、及び後者は末梢血液が容易に利用できることから好ましい。しばしば一群の動物は免疫化され、最も高い抗体力価を有する動物の脾臓は除去され、脾臓リンパ球は脾臓をシリンジでホモジナイズすることによって得られる。

【0293】

免疫化された動物由来の抗体産生Bリンパ球は、次いで、一般に免疫化された動物と同じ種の1つの不死骨髄腫細胞と融合される。融合細胞産生融合手順における使用のために適する骨髄腫細胞系は、好ましくは非抗体産生であり、高い融合効率及び、所望の融合細胞(ハイブリドーマ)だけの増殖を支持する特定の選択培地において増殖できなくする酵素欠損を有する。

【0294】

選択されたハイブリドーマは、次いで系列希釈され、個々の抗体産生細胞株にクローン化され、次いでクローンはMabを提供するように無期限に増殖される。細胞系は、2つの基本的な方法でMab産生のために活用され得る。融合細胞の試料は、体細胞及び元の融合のための骨髄腫細胞を提供するために使用された種類の組織適合性動物に(しばしば腹腔に)注射されてよい。注射された動物は、融合細胞ハイブリッドによって産生された特異的モノクローナル抗体を分泌している腫瘍を発達させる。血清又は腹水などの動物の体液は、Mabを高濃度で提供するために採取され得る。個々の細胞系もin vitro培養でき、Mabは培

養培地に自然に分泌され、それから容易に高濃度で得ることができる。いずれの手段によって産生されたMabも所望によりろ過、遠心分離及び、HPLC又は親和性クロマトグラフィーなどの種々のクロマトグラフィー法を使用してさらに精製されてよい。

【0295】

本発明の多量のモノクローナル抗体は、in vivoで融合細胞を増殖させることによって得られる。細胞クローンは、抗体産生腫瘍の増殖をもたらすために、親細胞と組織適合性である哺乳動物、例えば同系マウスに注射される。任意選択で動物は、注射前に炭化水素、特に、プリスタン(テトラメチルペンタデカン)などの油で予備刺激される。

【0296】

本発明により本発明のモノクローナル抗体の断片は、上に記載のとおり産生されたモノクローナル抗体から、ペプシン又はパパインなどの酵素での消化及び/又は化学的還元によるスルフィド結合の切断を含む方法によって得られる。代替的に、本発明により包含されるモノクローナル抗体断片は、自動化ペプチド合成機を使用して合成され得る。

【0297】

抗体は、コンピューターで設計され、合成的に生成されたポリヌクレオチドによってコードされたアミノ酸配列に基づいている組換え抗体ライブラリー由来であってもよい。コンピューターで作られた配列について設計され、得られた方法は当技術分野において公知である(Knappik et al., J. Mol. Biol. 296:254:57~86, 2000; Krebs et al., J. Immunol. Methods 254:67~84, 2001; 米国特許第6,300,064号)。

【0298】

その抗原結合断片を産生するための抗体の消化は、当技術分野において十分公知の技術を使用して実施され得る。例えばタンパク質分解性酵素パパインは、優先的にIgG分子を切断し、数個の断片を生じ、その(「F(ab)」断片)の2つは、それぞれ未処置抗原結合部位を含む共有結合ヘテロ二量体を含む。酵素ペプシンは、IgG分子を切断し、両方の抗原結合部位を含む「F(ab')₂」断片を含むいくつかの断片を産生する。「Fv」断片はIgM、IgG又はIgA免疫グロブリン分子の優先的タンパク質分解性切断によって産生され得るが、さらに一般的には当技術分野において公知の組換え技術を使用することによって由来する。Fv断片は、天然抗体分子の抗原認識及び結合能力の大部分を保持している抗原結合部位を含む非共有結合V_H::V_Lヘテロ二量体を含む(Inbar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2659~2662 (1972); Hochman et al., Biochem. 15:2706~2710 (1976); 及びEhrlich et al., Biochem. 19:4091~4096 (1980))。

【0299】

本明細書で開示のポリペプチド指標に特異的に結合する抗体断片は、米国特許第5,885,793号に記載のものなどの公知の技術を使用してscFvのライブラリーから単離され得る。

【0300】

多種多様な発現系がFab断片、scFv、VL及びVHを含む抗体断片の産生のために当技術分野において利用可能である。例えば原核及び真核起源の両方の発現系は、抗体断片の大規模産生のために使用され得る。特に有利なのは、培養培地への多量の抗体断片の分泌を可能にする発現系である。抗体断片及び抗体融合タンパク質の大規模産生のための真核生物発現系は、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物、トランスジェニック動物及び下等真核生物のものに基づいて記載されている。例えば費用効果の高い、抗体断片の大規模産生は、酵母発酵系で達成され得る。これらの生物の大規模発酵は、当技術分野において十分公知であり、いくつかの組換えタンパク質のバルク産生のために現在使用されている。

【0301】

本方法で用いられるポリペプチドバイオマーカーに結合する抗体は、当業者に十分公知であり、いくつかの場合では商業的に利用可能である又は過度の実験を伴うことなく得ることができる。

【0302】

さらに他の実施形態では、具体的にはオリゴヌクレオチドがmRNAバイオマーカー又は他の核酸に基づくバイオマーカーを検出及びハイブリダイズするための結合パートナーとし

10

20

30

40

50

て使用される場合、結合パートナー(例えばオリゴヌクレオチド)は、標識、例えば蛍光部分又は色素を含み得る。付加的に本発明の任意の結合パートナー、例えば抗体は、蛍光部分でも標識化され得る。本明細書において使用される用語「蛍光部分」は、その全蛍光は、部分が本明細書に記載の単一分子検出機で検出され得る1つ以上の蛍光実体を含む。したがって蛍光部分は、単一の実体(例えば量子ドット若しくは蛍光分子)又は複数の実体(例えば複数の蛍光分子)を含み得る。本明細書において使用される用語「部分」が蛍光実体の群、例えば複数の蛍光色素分子を指し、個々の実体それぞれが結合パートナーに別々に結合されていてよい、又は実体が群としての実体が検出されるために十分な蛍光を提供する限り、一緒に結合していてよいことは理解される。

【0303】

典型的には部分の蛍光は、アッセイの所望の検出限界、正確さ及び精度のために必要な整合性を有して、部分が単一分子検出機においてバックグラウンドレベルを超えて検出可能である十分な量子効率及び光退色の欠如の組合せを含む。例えばいくつかの実施形態では蛍光部分の蛍光は、本明細書に記載の装置において約10、5、4、3、2、1、0.1、0.01、0.001、0.00001又は0.000001pg/ml未満の検出限界で及び約20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1%以下、例えば約10%以下の変動係数で、分子、例えばマーカの検出及び/又は定量を可能にする。いくつかの実施形態では蛍光部分の蛍光は、本明細書に記載の装置において約5、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001pg/ml未満の検出限界及び約10%未満の変動係数で分子、例えばマーカの検出及び/又は定量を可能にする。本明細書において使用される用語「検出限界」又はLoDは、そこで目的の物質の分子を含有するとして試料を同定できる最低濃度、例えば最初のゼロでない値を含む。それは、ゼロの変性及び標準曲線の傾きによって定義され得る。例えばアッセイの検出限界は、標準曲線を実行すること、標準曲線ゼロ値を決定すること及び値に2標準偏差を個加えることによって決定され得る。この値と等しいシグナルを産生する目的の物質の濃度は、「検出の下限」濃度である。

【0304】

さらに部分は、選択のアッセイにおけるその使用と一致する特性を有する。いくつかの実施形態ではアッセイはイムノアッセイであり、そこで蛍光部分は抗体に結合されており、部分は他の抗体又はタンパク質と凝集しない特性を有さなければならず、又はアッセイの必要とされる正確さ及び精度と一致するように凝集を経験しない。いくつかの実施形態では好ましい蛍光部分は、蛍光部分、例えば1)高吸光計数、2)高量子収量、3)高い光安定性(低光退色)、及び4)目的の分子(例えばタンパク質)を標的化する適合性の組合せを有する色素分子であり、そのため本発明の分析機及び系を使用して分析され得る(例えば目的のタンパク質の沈殿、又はそれに部分が結合されるタンパク質の沈殿を生じない)。

【0305】

任意の好適な蛍光部分が使用され得る。例はこれだけに限らないが、Alexa Fluor色素(Molecular Probes, Eugene, Oreg.)を含む。Alexa Fluor色素は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,977,305号、第6,974,874号、第6,130,101号、及び第6,974,305号に開示されている。本発明のいくつかの実施形態は、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700及びAlexa Fluor 750からなる群から選択される色素を利用する。本発明のいくつかの実施形態は、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 700及びAlexa Fluor 750からなる群から選択される色素を利用する。本発明のいくつかの実施形態は、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700及びAlexa Fluor 750からなる群から選択される色素を利用する。本発明のいくつかの実施形態は、約650から660nmの間に吸収極大及び約660から670nmの間に発光極大を有するAlexa Fluor 647分子を利用する。Alexa Fluor 647色素は、単独又は他のAlexa Fluor色素との組合せで使用される。

【0306】

いくつかの実施形態では、本発明の分析系を使用して試料中の指標を検出するために使

用される蛍光標識部分は、量子ドットである。半導体ナノ結晶又は人工原子としても公知である量子ドット(QD)は、電子100から1,000個4の間の範囲及び2~10nmの範囲を含有する半導体結晶である。いくつかのQDは、直径10~20nmの間であってよい。QDは、高い量子収量を有し、それらを光学的適用のために特に有用にする。QDは、伝統的フルオロフォアの励起状態に類似しているが、200ナノ秒におよぶとても長い寿命を有し、励起子を形成することによって蛍光を発するフルオロフォアである。この特性は低い光退色を有するQDを提供する。QDのエネルギーレベルは、QDのサイズ及び形状並びにQDの電位の深度を変更することによってコントロールされ得る。小さな励起的QDの1つの光学的特性はドットのサイズによって決定される呈色である。ドットがより大きいとより赤く、又は蛍光スペクトルのさらに赤い末端に向かう。ドットがより小さいとより青く、さらに青い末端に向かう。エネルギー及びそれにより蛍光発光の色を決定するバンドギャップエネルギーはQDのサイズの二乗に反比例する。QDが大きいほどより密集しているより大きなエネルギーレベルを有し、QDがあまりエネルギーを含有していない光子、すなわちスペクトルの赤末端に近いものを吸収するようにする。ドットの発光周波数がバンドギャップに依存することから、極めて高い精度でドットの出力波長をコントロールすることができる。いくつかの実施形態では単一分子分析系で検出されるタンパク質はQDで標識化される。いくつかの実施形態では単一分子分析機は異なる波長での異なるタンパク質の検出を可能にするためのフィルターを使用して、1つのQDで標識化されたタンパク質を検出するために使用される。

10

【0307】

E. 血糖の単離された巨大分子指標

20

1. 単離されたポリペプチド指標

本発明の一態様は、単離された指標タンパク質及び生物学的に活性なその部分、並びに指標タンパク質又はその断片に対して方向付けられた抗体を生じさせるための免疫原としての使用のために好適なポリペプチド断片に関する。一実施形態では天然指標タンパク質は、標準タンパク質精製技術を使用する適切な精製スキームによって細胞又は組織供給源から単離され得る。別の実施形態では、指標タンパク質の全体又はセグメントを含むタンパク質又はペプチドは、組換えDNA技術によって産生される。組換え発現への代替として、そのようなタンパク質又はペプチドは、標準的ペプチド合成技術を使用して化学的に合成され得る。組換えタンパク質は、HbA1cの検出のための適切な抗原を提供するために修飾、例えば糖化され得る。同様にヘモグロビンの非糖化断片は、非糖化ヘモグロビン単独又は全ヘモグロビンのいずれかに結合する抗体を生じさせるために使用され得る。

30

【0308】

「単離された」若しくは「精製された」タンパク質又は生物学的に活性なその部分は、タンパク質が由来する細胞若しくは組織供給源からの細胞性物質若しくは他の混入タンパク質を実質的に含まない、又は化学的に合成された場合は化学的前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まない。語「実質的に細胞性物質を含まない」は、タンパク質が単離される又は組換え的に産生される細胞の細胞成分から分離されているタンパク質の調製物を含む。したがって実質的に細胞性物質を含まないタンパク質は、約30%、20%、10%又は5%未満(乾燥重量)の異種性タンパク質(本明細書において「混入タンパク質」とも称される)を有するタンパク質の調製物を含む。タンパク質又は生物学的に活性なその部分が組換え的に産生される場合、好ましくは実質的に培養培地を含まず、すなわち培養培地はタンパク質調製物の容積の約20%、10%又は5%未満を表す。タンパク質が化学合成によって産生される場合、それは好ましくは化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない、すなわちそれはタンパク質の合成に参与する化学的前駆体又は他の化学物質から分離されている。したがってタンパク質のそのような調製物は、化学的前駆体又は目的のポリペプチド以外の化合物を約30%、20%、10%、5%(乾燥重量)未満で有する。

40

【0309】

指標タンパク質の生物学的に活性な部分は、全長タンパク質よりも少ないアミノ酸を含み、対応する全長タンパク質の少なくとも1つの活性を表す指標タンパク質のアミノ酸配列と十分に同一である又は由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。典型的には

50

生物学的に活性な部分は、対応する全長タンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメイン又はモチーフを含む。指標タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば10、25、50、100以上のアミノ酸長であるポリペプチドであってよい。さらに、マーカータンパク質の他の領域が失われている他の生物学的に活性な部分は、組換え技術によって調製されてよく、指標タンパク質の天然形態の1つ以上の機能活性について評価され得る。

【0310】

好ましい指標タンパク質は、配列表に提供されているヌクレオチド配列によってコードされている。他の有用なタンパク質はこれらの配列の1つに実質的に同一(例えば少なくとも約40%、好ましくは50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%)であり、対応する天然に存在する指標タンパク質の機能活性を保持しているけれども、天然対立遺伝子の多様性又は変異導入のためにアミノ酸配列において異なっている。

10

【0311】

2つのアミノ酸配列又は2つの核酸の同一性パーセントを決定するために、配列は最適な比較目的のために配列比較される(例えばギャップは第1のアミノ酸又は核酸配列の配列に、第2のアミノ又は核酸配列との最適な配列比較のために導入されてよい)。対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置でアミノ酸残基又はヌクレオチドは、比較される。第1の配列中の位置が第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占められる場合、分子はその位置で同一である。好ましくは、2つの配列間の同一性パーセントは、網羅的配列比較を使用して算出される。代替的に、2つの配列間の同一性パーセントは局所配列比較を使用して算出される。2つの配列間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一位置の数の関数である(すなわち、%同一性=同一位置の数/位置の総数(例えばオーバーラップ位置) $\times 100$)。一実施形態では2つの配列は同じ長さである。別の実施形態では2つの配列は同じ長さではない。

20

【0312】

2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。2つの配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的例はKarlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873~5877においてのとおり修正されたKarlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264~2268のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムはAltschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403~410のBLASTN及びBLASTXプログラムに組み込まれる。BLASTヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子へのヌクレオチド配列相同性を得るためにBLASTNプログラム、スコア=100、ワード長=12で実施されてよい。BLASTタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子へのアミノ酸配列相同性を得るためにBLASTPプログラム、スコア=50、ワード長=3で実施されてよい。比較目的のギャップ配列比較を得るために、プログラムBLASTN、BLASTP及びBLASTXのためにギャップ局所配列比較を実施できる、Gapped BLASTと呼ばれるBLASTアルゴリズムの新たなバージョンがAltschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389~3402に記載のとおり利用され得る。代替的にPSI-Blastは、分子間の離れた環系を検出する繰り返し検索を実施するために使用され得る。BLAST、Gapped BLAST、及びPSI-Blastプログラムを利用する場合、各プログラム(例えばBLASTX及びBLASTN)の初期設定パラメーターは使用され得る。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的例はMyers and Miller, (1988) CABIOS 4:11~17のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、GCG配列配列比較ソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれる。ALIGNプログラムをアミノ酸配列の比較のために利用する場合、PAM120重量残基表、ギャップ長さペナルティー12、及びギャップペナルティー4が使用され得る。局所配列類似性及び配列比較の領域を同定するためのさらに別の有用なアルゴリズムはPearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444~2448に記載のFASTAアルゴリズムである。ヌクレオチド又はアミノ酸配列を比較するためにFASTAアルゴリズムを使用する場合、PAM120重量残基表は例えばk-タプル値2で利用され得る。

30

40

50

【0313】

2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップを考慮に入れて又は入れずに上に記載のものと同様の技術を使用して決定され得る。同一性パーセントの算出では、正確な一致だけが計数される。

【0314】

本発明の別の態様は、本発明のタンパク質に対して方向付けられた抗体に関する。好ましい実施形態では抗体は、マーカータンパク質又はその断片に特異的に結合する。用語「抗体(antibody)」及び「抗体(antibodies)」は、免疫グロブリン分子並びに、免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分を含むその断片及び誘導体を指して本明細書において互換的に使用される(すなわちそのような部分は、マーカータンパク質、例えばマーカータンパク質のエピトープなどの抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含有する)。本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体は、タンパク質に結合するが天然でタンパク質を含有する試料、例えば生物学的試料中の他の分子に実質的に結合しない抗体である。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例は、これだけに限らないが、1本鎖抗体(scAb)、F(ab)及びF(ab')₂断片を含む。

【0315】

本発明の単離されたタンパク質又はその断片は、抗体を生成するための免疫原として使用され得る。全長タンパク質は使用でき、又は代替的に本発明は免疫原としての使用のために抗原性ペプチド断片を提供する。本発明のタンパク質の抗原性ペプチドは、本発明の1つのタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも8個(好ましくは10個、15個、20個又は30個以上)のアミノ酸残基を含み、タンパク質の少なくとも1つのエピトープを、タンパク質と特異的免疫複合体を形成するように抗体がペプチドに対して生じるように包含する。特定の実施形態ではタンパク質は翻訳後修飾される。抗原性ペプチドによって包含される好ましいエピトープは、タンパク質の表面に位置する領域、例えば親水性領域である。疎水性配列分析、親水性配列分析又は同様の分析は、親水性領域を同定するために使用され得る。好ましい実施形態では単離されたマーカータンパク質又はその断片は免疫原として使用される。

【0316】

本発明は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体を提供する。本明細書において使用される用語「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」は、具体的なエピトープと免疫反応できる抗原結合部位の1種だけを含有する抗体分子の集団を指す。特に好ましいポリクローナル及びモノクローナル抗体調製物は、本発明のタンパク質に対して方向付けられた抗体について選択されたものである。具体的には好ましいポリクローナル及びモノクローナル抗体調製物は、マーカータンパク質又はその断片に対して方向付けられた抗体だけを含有しているものである。ポリクローナル、モノクローナル及び組換え抗体並びに抗体断片の作成方法は、当技術分野において周知である。

【0317】

2. 単離された核酸指標

本発明の一態様は、Eno1又はその部分をコードしている核酸を含む、単離された核酸分子に関する。本発明の単離された核酸は、Eno1核酸分子及びその断片を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用のために十分な核酸分子、例えば特異的産物の増幅又はマーカー核酸分子の変異導入のためのPCRプライマーとしての使用のために好適なものも含む。本明細書において使用される用語「核酸分子」は、DNA分子(例えばcDNA又はゲノムDNA)及びRNA分子(例えばmRNA)及びヌクレオチド類似体を使用して生成されたDNA又はRNAの類似体を含むことを意図する。核酸分子は1本鎖又は2本鎖であってよいが、好ましくは2本鎖DNAである。

【0318】

「単離された」核酸分子は、核酸分子の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離されたものである。一実施形態では「単離された」核酸分子(好ましくはタンパク質をコードしている配列)は、核酸が由来する生物のゲノムDNA中で核酸に天然で隣接している配

列(すなわち核酸の5'及び3'末端に位置している配列)を含まない。例えば種々の実施形態では単離された核酸分子は、核酸が由来する細胞のゲノムDNA中で核酸分子に天然で隣接している約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb又は0.1kb未満のヌクレオチド配列を含有する場合がある。別の実施形態ではcDNA分子などの「単離された」核酸分子は、他の細胞性物質、又は組換え技術によって産生された場合は培養培地を実質的に含まず、化学的に合成された場合は化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない。実質的に細胞性物質を含まない核酸分子は、約30%、20%、10%又は5%未満の異種性核酸(本明細書において「混入核酸」とも称される)を有する調製物を含む。

【0319】

本発明の核酸分子は、標準的分子生物学技術及び本明細書に記載のデータベース記録中の配列情報を使用して単離され得る。そのような核酸配列のすべて又は部分を使用して本発明の核酸分子は、標準的ハイブリダイゼーション及びクローニング技術を使用して単離され得る(例えばSambrook et al., ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載のとおり)。

【0320】

本発明の核酸分子は、cDNA、mRNA又はゲノムDNAを鋳型として及び好適なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して標準的PCR増幅技術により増幅され得る。そのように増幅された核酸は、好適なベクターにクローン化でき、DNA配列分析により特徴付けられ得る。さらに、本発明の核酸分子のすべて又は部分に対応するヌクレオチドは、例えば自動化DNA合成機を使用して、標準的合成技術により調製され得る。

【0321】

別の好ましい実施形態では本発明の単離された核酸分子は、マーカー核酸のヌクレオチド配列又はEno1をコードしている核酸のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有するEno1分子を含む。所与のヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、所与のヌクレオチド配列にハイブリダイズでき、それにより安定な二重鎖を形成できる所与のヌクレオチド配列に十分に相補的であるものである。

【0322】

さらに本発明の核酸分子は、核酸配列の一部だけを含むことができ、ここで全長核酸配列はEno1核酸を含む又はEno1タンパク質をコードする。そのような核酸は、例えばプローブ又はプライマーとして使用され得る。プローブ/プライマーは、1つ以上の実質的に精製されたオリゴヌクレオチドとして典型的には使用される。オリゴヌクレオチドは、Eno1の少なくとも約15、より好ましくは少なくとも約25個、50個、75個、100個、125個、150個、175個、200個、250個、300個、350個又は400個以上の連続したヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を典型的には含む。

【0323】

Eno1の配列に基づくプローブは、Eno1に対応する転写物又はゲノム配列を検出するために使用され得る。特定の実施形態ではプローブは、スプライスジャンクションを横切る核酸配列にハイブリダイズする。プローブはそれに結合している標識基、例えば放射性同位元素、蛍光化合物、酵素又は酵素補因子を含む。そのようなプローブは、対象からの試料においてEno1をコードしている核酸分子のレベルを測定することなどによって、例えばmRNAレベルを検出すること又はEno1をコードしている遺伝子若しくはその翻訳制御配列が変異導入若しくは失われているかどうかを決定することなどによって、Eno1タンパク質を発現する又は発現しない(mis-express)細胞、組織又は個体を同定するための診断検査キット又は群(panel)の一部として使用できる。

【0324】

本発明は、遺伝子コードの縮重のために、Eno1タンパク質(例えば配列表に提供される配列を有するタンパク質)をコードしている核酸のヌクレオチド配列と異なっており、したがって同じタンパク質をコードする核酸分子をさらに包含する。

【0325】

アミノ酸配列に変化を導くDNA配列多型が集団(例えばヒト集団)内に存在できることは当業者によって理解される。そのような遺伝子多型は、天然対立遺伝子の多様性のために集団内の個々の間に存在する場合がある。対立遺伝子は、所与の遺伝子座に代替的に生じる遺伝子の群の1つである。付加的に、RNA発現レベルに影響を与えるDNA多型も存在でき、遺伝子の全体の発現レベルに(例えば制御又は分解に影響を与えることによって)影響を与える場合があることは理解される。

【0326】

本明細書において使用される句「対立遺伝子の変種」は、所与の遺伝子座で又はヌクレオチド配列によってコードされたポリペプチドに生じるヌクレオチド配列を指す。

【0327】

本明細書において使用される用語「遺伝子」及び「組換え遺伝子」は、本発明の指標に対応するポリペプチドをコードしている翻訳領域を含む核酸分子を指す。そのような天然対立遺伝子の多様性は、所与の遺伝子のヌクレオチド配列において典型的には1~5%相違を生じる場合がある。代替的対立遺伝子は、多数の異なる個体において目的の遺伝を配列決定することによって同定され得る。これは、種々の個体で同じ遺伝子の遺伝子座を同定するためのハイブリダイゼーションプロブを使用して容易に実行され得る。任意及びすべてのそのようなヌクレオチド多様性及び生じるアミノ酸多型又は、天然対立遺伝子の変動から生じ、機能活性を変更しない多様性は、本発明の範囲内にあると意図される。

【0328】

別の実施形態では本発明の単離された核酸分子は、長さ少なくとも15、20、25、30、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、550、650、700、800ヌクレオチド以上であり、ストリンジェントな条件下でEno1核酸に又はEno1をコードしている核酸にハイブリダイズする。本明細書において使用される用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、互いに少なくとも60%(65%、70%好ましくは75%)同一なヌクレオチド配列が、典型的には互いにハイブリダイズしたままであるハイブリダイゼーション及び洗浄のための条件を記載することが意図される。そのようなストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989)の6.3.1~6.3.6章に見出すことができる。好ましいストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的例は、6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)、約45℃でのハイブリダイゼーションに続く、0.2X SSC、0.1% SDS、50~65℃での1回以上の洗

【0329】

F. 指標適用

本発明は、対象における血糖の上昇、例えば前糖尿病、2型糖尿病、1型糖尿病、妊娠糖尿病を診断するための方法を提供する。本発明は、診断する又は進行をモニタリングする又は血糖が上昇している対象の治療処置への応答をモニタリングするための方法をさらに提供する。

【0330】

一態様では本発明は、Eno1のレベルを血糖の少なくとも1つの他の指標、例えば血糖、例えば食後血糖、空腹時血糖、耐糖能、ケトンレベル、及びHb1Acレベルと共に分析、検出及び/又は測定することと関連して本発明の方法によって得られた診断情報の適用を構成する。

【0331】

例えば本明細書に記載のポリペプチド指標を検出及び/又は測定するための本発明の方法を実行する場合、生物学的試料を検出試薬、例えば目的の指標に選択的に結合し、タンパク質タンパク質複合体を形成するモノクローナル抗体に接触させ、次いで直接(抗体が標識を含む場合)又は間接(二次検出試薬、例えば次いで標識化される二次抗体が使用される場合)のいずれかでさらに検出される。それにより本発明の方法は、本発明のポリペプチド指標を、検出可能な一次抗体又は一次及びさらに二次抗体のいずれかを含むタンパク質タンパク質複合体に変換する。そのようなタンパク質タンパク質複合体を形成すること

は、目的のバイオマーカーの存在を同定するために必要とされ、本発明の方法を実行する結果として目的の指標の物理的特徴及び特性を必然的に変化させる。

【0332】

Eno1核酸を検出するために本発明の方法を実行する場合に同じ原理を適用する。具体的には増幅方法がEno1 mRNAを検出するために使用される場合、実際に増幅工程は、増副産物の新規集団、すなわち新たに合成され、元の生物学的試料中に存在しなかった分子の形成を生じ、それにより生物学的試料を物理的に変換する。同様にハイブリダイゼーションプローブがEno1を検出するために使用される場合、物理的に新たな分子種は、次いで検出される標的バイオマーカーmRNA(又は他の核酸)へのプローブ(任意選択で標識を含む)のハイブリダイゼーションによって実際に作られる。そのようなポリヌクレオチド産生物は、
10 効率的に新たに作られる又は本発明の方法を実行することの結果として形成される。

【0333】

一実施形態で本発明は、血糖の上昇、例えば前糖尿病、糖尿病、例えば2型糖尿病、1型糖尿病、妊娠糖尿病を診断するための方法を提供する。本発明の方法は、血糖の上昇及び/又は血糖の上昇について処置される対象の治療介入への応答の発症又は再発を予測するために熟練した開業医によって使用される任意の他の方法と合わせて実行されてよい。本明細書で提供する診断及び予測方法は、追加的及び/又は複合的な又は煩雑な検査又はモニタリング(例えば耐糖能検査、持続グルコースモニタリング)が対象に実施されるべきであるかどうかを決定するために使用され得る。前糖尿病又は糖尿病の複合としての疾患が単一の検査を使用して診断されることはほとんどないことは理解される。したがって、
20 本明細書で提供する予防的、予測的及びモニタリング方法は、当技術分野において典型的には公知の他の方法と合わせて使用されることは理解される。例えば本発明によって提供されたEno1のレベルの検出のための方法は、Hb1Acレベルの検出、空腹時若しくは食後状態で血糖レベルの検出、又は耐糖能検査と合わせて実施され得る。

【0334】

治療レジメン、例えば薬物処置、行動修正、手術又は対象における血糖の上昇を処置するために有用である任意の他の治療手法の有効性を評価する方法も提供される。これらの方法では一对の試料(治療レジメンの早期の時点又は前に対象から得られた第1の試料、及びその後の例えば対象が治療レジメンの少なくとも一部を受けた後の時点で得られた第2の試料)中のEno1の量は評価される。本発明の方法が2つより多い試料(例えば3個、4個、5
30 個、6個、7個、8個、9個以上の試料)を、マーカーレベルの評価のために定期的又は不定期に得ること及び分析することを含むことは理解される。対比較は連続的又は非連続的対象試料間で行われ得る。マーカーレベルの傾向及びマーカーレベルの変化率は、任意の2つ以上連続的又は非連続的対象試料について分析され得る。Eno1レベルの測定は、血糖のモニタリングの検出のための他の方法と合わせて実行され得る。

【0335】

本発明の方法は、Eno1発現又は活性の調節により血糖を調節できる化合物を選択するためにも使用され得る。本方法では、細胞、好ましくはインスリン感受性が変化している又はグルコース取り込みが変化している細胞は被験化合物と接触され、細胞中でEno1の発現及び/又は活性を調節する被験化合物の能力が決定され、それによりEno1発現又は活性を
40 調節できる、好ましくはEno1発現又は活性を増加させ、それにより細胞でのグルコース取り込みを増加させる化合物を選択する。

【0336】

本明細書に記載の方法を使用して種々の分子は、Eno1の発現及び/又は活性を調節する、好ましくは増加させる分子を同定するためにスクリーニングされてよい。そのように同定された化合物は、グルコース取り込みを増加させる、インスリン感受性を増加させる及び/又はインスリン抵抗性を減少させる、の1つ以上によって血糖を正常化するため、それにより血糖の上昇、例えば前糖尿病又は糖尿病、例えば2型糖尿病、1型糖尿病若しくは妊娠糖尿病を処置するために対象に提供され得る。

【0337】

10

20

30

40

50

本発明は、診断アッセイ、予測アッセイ、薬理ゲノミクス及び臨床試験モニタリングが予後的(予測的)目的で使用され、それにより個体を予防的に処置する予測医療の分野に関する。したがって本発明の一態様は、非限定的に前糖尿病又は2型糖尿病、1型糖尿病若しくは妊娠糖尿病を含む糖尿病などの血糖の上昇に関連する疾患又は障害を個体が発症するリスクがあるかどうかを決定するためにEno1タンパク質又は核酸の発現のレベルを決定する診断アッセイに関する。そのようなアッセイは、予後的又は予測的目的で、それにより障害の発症前に予防的に個体を処置するために使用され得る。

【0338】

本発明のさらに別の態様は、薬剤(例えば薬物又は他の治療用化合物)又は行動及び/又は食事改善の臨床試験でのEno1の発現又は活性への影響をモニタリングすることに関する。これら及び他の適用は、続くセクションにさらに詳細に記載される。

10

【0339】

1. 診断アッセイ

生物学的試料中の指標タンパク質又は核酸の存在又は非存在又は変化を検出するための例示的方法は、検査対象から生物学的試料(例えば血液又は血清)を得ること及び生物学的試料をポリペプチド又は核酸(例えばmRNA又はcDNA)を検出できる化合物又は薬剤に接触させることを含む。それにより本発明の検出方法は、例えば生物学的試料中in vitro及びin vivoでmRNA、cDNA又は翻訳後修飾されたタンパク質を含むタンパク質を検出するために使用され得る。

20

【0340】

生物学的試料中の指標タンパク質又は核酸の存在、非存在、レベルの変化を検出するために本明細書で提供する方法は、検出されるマーカータンパク質又は核酸を含有する可能性がある又はない生物学的試料を対象から得ること、試料を、検出される指標タンパク質又は核酸と複合体を形成できる指標特異的結合剤(すなわち、1つ以上のマーカー特異的結合剤)と接触させること、及び試料を、形成される場合、指標-指標特異的結合剤複合体のための検出試薬と接触させることを含む。生物学的試料中の指標のレベルを検出するために本明細書で提供する方法がアッセイを実施するためのステップを含むことは理解される。検出方法の特定の実施形態では試料中の指標タンパク質又は核酸のレベルは、ない又は検出のための閾値より低い。

【0341】

方法は、指標と指標特異的結合剤との間の一過性又は安定のいずれかの複合体の形成を含む。方法は、形成される場合複合体は、検出試薬が複合体に結合し、検出可能なシグナル(例えば蛍光シグナル、酵素反応、例えばペルオキシダーゼ反応、ホスファターゼ反応、ベータガラクトシダーゼ反応又はポリメラーゼ反応の産生物からのシグナル)を産生するために十分な時間をかけて形成されることを必要とする。

30

【0342】

特定の実施形態ではすべての指標が同じ方法を使用して検出される。特定の実施形態ではすべての指標は同じ生物学的試料(例えば同じ体液)を使用して検出される。特定の実施形態では異なる指標が異なる方法を使用して検出される。特定の実施形態では指標は異なる生物学的試料(例えば血液及び血清)において検出される。

40

【0343】

2. タンパク質検出

本発明の特定の実施形態では検出される指標はタンパク質である。特定の実施形態では検出される指標は翻訳後修飾されたタンパク質である。タンパク質は、例えば構成成分の1つが天然に存在する化合物ではない、又は検出のための指標及び指標特異的結合剤が同じ生物由来ではないため(例えばマウス、ラット又はヤギ由来指標特異的結合抗体を使用して検出されるヒト指標タンパク質)、検出される指標タンパク質と指標特異的結合剤との間の複合体が天然には存在しない多数のアッセイを使用して検出される。本発明の好ましい実施形態では、検出のための指標タンパク質はヒト指標タンパク質である。ある種の検出アッセイでは、検出のためのヒト指標は指標特異的、非ヒト抗体によって結合され、

50

それにより複合体は天然では形成されない。指標タンパク質の複合体は、例えば指標に直接結合する標識化指標特異的抗体の使用によって、又はさらなる構成成分の指標-指標特異的抗体複合体への結合によって直接検出され得る。特定の実施形態ではさらなる構成成分は、第1の指標特異的抗体と同時に指標に結合できる第2の指標特異的抗体である。特定の実施形態ではさらなる構成成分は、指標特異的抗体に結合する二次抗体であり、ここで二次抗体は好ましくは検出可能な標識(例えば蛍光標識、酵素標識、ビオチン)に連結する。二次抗体が酵素性の検出可能な標識(例えばペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ)に連結される場合、二次抗体は、発色、蛍光又は他の検出可能な、好ましくは定量的に検出できる産生物を産生するための適切な基質と共に酵素的に検出可能な標識を接触させることによって検出される。本発明の方法における使用のための抗体はポリクローナルであってよい、しかし好ましい実施形態ではモノクローナル抗体が使用される。未処置抗体又はその断片若しくは誘導体(例えばFab又はF(ab')₂)は本発明の方法において使用され得る。指標タンパク質検出のそのような戦略は、例えばELISA、RIA、ウエスタンブロット及び免疫蛍光アッセイ方法において使用される。

【0344】

特定の検出アッセイでは、生物学的試料中に存在する検出のための指標は酵素、例えばEno1であり、検出試薬は酵素基質(例えば2-ホスホグリセレート(2-PG)若しくはホスホエノールピルベート(PEP)、又は検出可能な産生物を産生するいずれかの化合物の類似物)である。好ましい実施形態では、検出される指標酵素と複合体を形成する基質はヒト対象中の酵素のための基質ではない。

【0345】

特定の実施形態では指標-指標特異的結合剤複合体は、指標の検出のために固体支持体に付着されている。複合体は、基質上に形成され得る又は捕捉より先に基質上に形成され得る。例えばELISA、RIA、免疫沈降アッセイ、ウエスタンブロット、免疫蛍光アッセイ、インゲル酵素アッセイにおいて検出のための指標は、固体支持体に直接又は間接的に付着されている。ELISA、RIA又は免疫蛍光アッセイでは指標は、抗体又は結合タンパク質を通じて固体支持体に間接的に典型的には付着されている。ウエスタンブロット又は免疫蛍光アッセイでは指標は、固体支持体に直接典型的には付着されている。インゲル酵素アッセイのために指標は、ゲル、典型的にはアクリルアミドゲルに溶解され、酵素のための基質は組み込まれている。

【0346】

3. 核酸検出

本発明の特定の実施形態では指標は核酸、例えばEno1核酸である。核酸は、検出される指標核酸と指標特異的プローブとの間の複合体は、例えば構成成分の1つが天然に存在しないことから天然に存在しない多数のアッセイを使用して検出される。特定の実施形態では分析物は、核酸を含み、プローブは1つ以上の合成1本鎖核酸分子、例えばDNA分子、DNA-RNAハイブリッド、PNA又は、1つ以上の人工塩基、糖若しくは骨格部分を含有する修飾される核酸分子を含む。特定の実施形態では合成核酸は、1本鎖であり、蛍光標識を含むDNA分子である。特定の実施形態では合成核酸は、長さ約12から約50ヌクレオチドの1本鎖オリゴヌクレオチド分子である。特定の実施形態では検出される核酸はmRNAであり、形成される複合体は、mRNAに相補的である1本鎖DNA分子にハイブリダイズするmRNAである。特定の実施形態ではRNAは、プライマー、例えばポリA RNAを転写する一般的ポリTプライマーとしてRNAにハイブリダイズする1本鎖DNAを使用して最初にRNA鋳型からのDNA分子(すなわちcDNA分子)の生成から検出される。次いでcDNAは、マーカー特異的プローブを使用する増幅反応、例えばPCR、プライマー伸長アッセイのための鋳型として使用され得る。特定の実施形態では標識化1本鎖DNAは、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)によるRNAの検出のため又はノーザンブロットによるRNAの検出のために試料中に存在するRNAにハイブリダイズされ得る。

【0347】

例えばmRNAの検出のためのin vitro技術は、ノーザンハイブリダイゼーション、in sit

uハイブリダイゼーション及びrtPCRを含む。ゲノムDNAの検出のためのin vitro技術は、サザンハイブリダイゼーションを含む。mRNAの検出のための技術は、PCR、ノーザンハイブリダイゼーション及びin situハイブリダイゼーションを含む。方法は、定性的及び定量的方法の両方を含む。

【0348】

そのような診断的、予後的及びモニタリングアッセイの一般的原理は、検出のための核酸及びプローブを、指標核酸とプローブとを相互作用及び結合させるための適切な条件下で十分な時間含有でき、それにより反応混合物中で除去及び/又は検出され得る複合体が形成される試料又は反応混合物を調製することを含む。これらのアッセイは、当技術分野において公知の種々の方法、例えばPCR、FISH、ノーザンブロットで実行され得る。

10

【0349】

4. 発現レベルの検出

Eno1レベルは、絶対発現レベル又は標準化された若しくは相対発現レベルに基づいて検出され得る。絶対Eno1レベルの検出は、対象の処置をモニタリングする又は対象での血糖レベル若しくは血糖制御に変化があるかどうかを決定する際に好ましい場合がある。例えばEno1発現レベルは、異常な血糖についての処置を受けている対象において、例えば月ごとなどの定期的にモニターされ得る。Eno1のレベルの調節は、Eno1レベルにおける変化の傾向を観察するために経時的にモニターされ得る。対象におけるEno1の発現レベルは正常試料中のEno1の発現レベルより高い場合があるが、前の発現レベルより高い場合があり、それは対象に対する治療レジメンの利益を示している。同様に、Eno1レベルの変化率は治療介入より行動又は食事改善で処置されている対象において重要である場合がある。個々の対象におけるEno1レベルの変化又は未変化は、集団に存在するEno1レベルよりも対象に対する処置判定にさらに関する場合がある。別の面では正常血糖を有する対象におけるEno1レベルにおける急速な変化は、マーカーが集団についての正常範囲内である場合でも、異常血糖又は異常血糖に関連する状態を発症する素因の指標となる可能性がある。Eno1レベルは、血糖の上昇の1つ以上の追加的指標、例えばHbA1c、食後若しくは空腹時血糖の上昇又は耐糖能検査におけるグルコースクリアランス速度の低下の1つ以上を含む血糖の上昇と併せて決定又はモニターされてよい。

20

【0350】

Eno1の絶対発現レベルに基づく決定を行うための代替として、決定はEno1の標準化された発現レベルに基づいてもよい。発現レベルは、指標の絶対発現レベルを指標ではない遺伝子、例えば恒常的に発現されているハウスキーピング遺伝子の発現と比較することによって標準化される。標準化のために好適な遺伝子は、アクチン遺伝子などのハウスキーピング遺伝子を含み、標準化のための血液又は血清中の好適なタンパク質はアルブミンを含む。この標準化は、1つの試料中での発現レベルの比較、例えば正常な血糖を有する対象からの試料と、別の試料、例えば異常な血糖を有することが疑われる若しくは有する対象からの試料又は異なる供給源からの試料間の比較を可能にする。

30

【0351】

代替的に発現レベルは、適切な対照、例えば集団対照、早期時点での対照などと比較した相対発現レベルとして提供されうる。好ましくはベースライン決定において使用される試料は、正常血糖を有する対象からの試料である。細胞源の選択は、相対発現レベルの使用に依存する。付加的により多いデータが蓄積されると、平均発現値は修正でき、蓄積されたデータに基づいて相対発現値の改善を提供する。

40

【0352】

5. モニタリング臨床試験

薬剤(例えば薬物化合物)の血糖の指標のレベルへの影響をモニタリングすることは、基本的な薬物スクリーニング又は単一の対象の処置をモニタリングすることに適用されるだけでなく、臨床試験にも適用される。例えばEno1発現に影響を与える薬剤の有効性は、血糖の上昇についての処置を受けている対象の臨床試験においてモニターされ得る。好ましい実施形態では本発明は、(i)薬剤の投与前に対象から投与前試料を得ること、(ii)投与

50

前試料において指標Eno1の発現及び任意選択で1つ以上のさらなる血糖の指標、例えば血糖、ケトン又はHbA1cのレベルを検出すること、(iii)対象から1つ以上の投与後試料を得ること、(iv)投与後試料において指標(複数可)の発現のレベルを検出すること、(v)投与前試料における指標(複数可)のレベルを1つ以上の投与後試料における指標(複数可)のレベルと比較すること、並びに(vi)それにより対象への薬剤の投与を変更すること、のステップを含む、薬剤(例えばアゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣薬、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子又は他の薬物候補)での対象の処置の有効性をモニタリングするための方法を提供する。例えば治療経過の際のEno1発現の減少及び他の指標(複数可)の標準化の欠如は、無効性用量及び用量増加の望ましさを示す場合がある。逆にEno1発現の上昇及び他の指標(複数可)の正常化は有効な処置を示すことができ、用量を変更する必要はない。

10

【0353】

VI. 血糖レベル不良、血糖レベルコントロール不良及び糖尿病の処置

本明細書において実証されるとおり、Eno1タンパク質の投与はグルコース取り込み及び応答、血糖レベル正常化並びに血糖レベルのコントロールを改善する。本発明は、状態の少なくとも1つの徴候又は症状を回復させるために対象にEno1を投与することによって、耐糖能障害、血糖上昇、インスリン抵抗性、インスリン機能不全並びに糖尿病、例えば2型糖尿病、1型糖尿病、前糖尿病及び妊娠糖尿病を罹患している対象の処置の方法を提供する。特定の実施形態では、Eno1、好ましくはEno1の転写物変種1は、対象に投与される場合があり、ここで耐糖能障害、血糖上昇、インスリン抵抗性、インスリン機能不全又は糖尿病の処置のための少なくとも1つの追加的薬剤は対象に投与される。本明細書において使用される薬剤は、いずれの順でも連続して又は同時に投与され得る。対象への複数の薬剤の投与は薬剤の共製剤(co-formulation)又は同じ投与レジメンを必要としない。

20

【0354】

Eno1を使用する耐糖能障害、血糖上昇、インスリン抵抗性、インスリン機能不全又は糖尿病、特に2型糖尿病の処置方法は、糖尿病の処置のための公知の方法及び薬剤と組み合わせられ得る。多数の薬剤及びレジメンが糖尿病の処置のために現在利用可能である。処置のために選択された特異的薬剤は、対象、具体的な症状及び疾患状態の重症度に依存する。例えば特定の実施形態ではEno1は、食事並びに/又は行動修正、例えばカロリー制限の単独又は肥満外科手術及び/若しくは身体活動性の増加との組合せと併せて投与され得る。特定の実施形態ではEno1は、2型糖尿病の処置のための薬剤、例えばメトホルミン(Glucophage、Glumetza他)、グリタゾン、例えばピオグリタゾン(Actos)、グリピジド(Glucotrol)、グリブリド(Diabetra、Glynase)、グリメピリド(Amaryl)、アカルボース(Precose)、メトホルミン(Glucophage)、シタグリブチン(Januvia)、サキサグリブチン(Onglyza)、レバグリニド(Prandin)、ナテグリニド(Starlix)、エキセナチド(Byetta)、リラグルチド(Victoza)又はインスリンと投与され得る。インスリンは、後期2型糖尿病の処置においてだけ典型的には使用され、速効型インスリン(インスリンアスパルト(NovoLog)、インスリングルリジン(Apidra)、及びインスリンリスプロ(Humalog));短期作用性インスリン(インスリンレギュラー(Humulin R、Novolin R));中期作用性インスリン(インスリンNPHヒト(Humulin N、Novolin N))及び長時間作用性インスリン(インスリングラルギン(Lantus)及びインスリンデテミル(Levemir))を含む。糖尿病のための処置は、運動並びに薬物及び手術の使用によって促進され得る体重減少を含む行動修正も含み得る。血糖の上昇及び糖尿病のための処置は、組み合わせられ得る。例えば薬物療法は、行動修正療法と組み合わせられ得る。1型糖尿病の処置における使用のためのインスリンは、これだけに限らないが後期2型糖尿病の処置において典型的には使用されるインスリンを含み、速効型インスリン(インスリンアスパルト(NovoLog)、インスリングルリジン(Apidra)及びインスリンリスプロ(Humalog));短期作用性インスリン(インスリンレギュラー(Humulin R、Novolin R));中期作用性インスリン(インスリンNPHヒト(Humulin N、Novolin N))及び長時間作用性インスリン(インスリングラルギン(Lantus)及びインスリンデテミル(Levemir))を含む。

30

40

【0355】

50

したがっていくつかの態様では本発明は、本発明は、対象における血糖の上昇を処置する方法であって、(a)血糖の上昇を有することが疑われる対象から生物学的試料を得るステップ、(b)Eno1のレベルに関する診断情報を得るための生物学的試料を提示するステップ、及び(c)試料中のEno1のレベルが閾値レベルを超えている場合に抗糖尿病治療の治療有効量を対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0356】

いくつかの態様では本発明は、対象における血糖の上昇を処置する方法であって、(a)対象からの生物学的試料中のEno1のレベルに関する診断情報を得るステップ、及び(b)試料中のEno1のレベルが閾値レベルを超えている場合に抗糖尿病治療の治療有効量を対象に投与するステップを含む方法に関する。

10

【0357】

いくつかの態様では本発明は、対象における血糖の上昇を処置する方法であって、(a)血糖の上昇を有することが疑われる対象から生物学的試料をEno1のレベルに関する診断情報を同定する際に使用するために得るステップ、(b)生物学的試料中のEno1のレベルを測定するステップ、(c)試料中のEno1のレベルが閾値レベルより低い場合に血糖低下療法を対象に施すように医療提供者に勧告するステップを含む方法に関する。

【0358】

上に記載の方法は、血糖の上昇の1つ以上の追加的指標のレベルとして診断情報を得るステップをさらに含む場合がある。いくつかの実施形態では方法は、血糖の上昇の1つ以上の追加的指標のレベルを測定するステップをさらに含む。血糖の上昇の1つ以上の追加的指標は、HbA1cレベル、空腹時グルコースレベル、食後グルコースレベル及び耐糖能からなる群から選択され得る。

20

【0359】

前述の方法のいくつかの実施形態では、ステップ(c)は、試料におけるEno1のレベルが閾値レベルより低く、血糖の上昇の少なくとも1つの追加的指標が検出される場合に、グルコース低下療法の治療有効量を対象に施すことをさらに含む。いくつかの実施形態ではステップ(c)は、試料におけるEno1のレベルが閾値レベルより低く、血糖の上昇の少なくとも1つの追加的指標が検出される場合に、グルコース低下療法を対象に施すことを医療提供者に勧告することをさらに含む。

【0360】

上に記載の方法のいくつかの実施形態では生物学的試料は、血液又は血清である。いくつかの実施形態ではEno1のレベルは、イムノアッセイ又はELISAによって決定される。いくつかの実施形態ではEno1のレベルは、(i)生物学的試料を、Eno1に選択的に結合してバイオマーカー複合体を形成する試薬と接触させること、及び(ii)バイオマーカー複合体を検出することによって決定される。いくつかの実施形態ではEno1に選択的に結合してバイオマーカー複合体を形成する試薬は、Eno1の少なくとも1つのエピトープに選択的に結合する抗Eno1抗体である。

30

【0361】

上に記載の方法のいくつかの実施形態ではEno1のレベルは、生物学的試料におけるEno1 mRNAの量を測定することによって検出される。Eno1 mRNAの量は、例えば増幅反応によって検出され得る。いくつかの実施形態では増幅反応は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、(b)核酸配列ベース増幅アッセイ(NASBA)、(c)転写媒介増幅(TMA)、(d)リガーゼ連鎖反応(LCR)、又は(e)鎖置換増幅(SDA)である。

40

【0362】

いくつかの実施形態ではハイブリダイゼーションアッセイは、生物学的試料中のEno1 mRNAの量を検出するために使用される。いくつかの実施形態では、Eno1 mRNAの一部分に相補的であるオリゴヌクレオチドは、Eno1 mRNAを検出するためのハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用される。

【0363】

VI. 糖尿病及びインスリン抵抗性の動物モデル

50

1型及び2型糖尿病、インスリン抵抗性、高脂血症などの代謝症候群の多数の遺伝的及び誘発動物モデルは、当技術分野において十分特徴付けられている。そのような動物は、インスリン抵抗性及び糖尿病の処置におけるEno1の効果を実証するために使用され得る。1型糖尿病のモデルは、これだけに限らないが、NODマウス並びにラット及びマウスでのストレプトゾトシン誘発糖尿病(1型糖尿病のモデル)を含む。2型糖尿病の遺伝的及び誘発モデルはこれだけに限らないが、レプチン欠損ob/obマウス、レプチン受容体欠損db/dbマウス及び高脂肪飼料マウス又はラットモデルを含む。各モデルにおいて特異的疾患特徴の発症についての時系列は十分公知である。Eno1は、これらの動物モデルでの糖尿病及び/又はインスリン抵抗性の予防又は処置におけるEno1の有効性を実証するために、糖尿病又はインスリン抵抗性の症状の出現の前又は後に投与されてよい。

10

【0364】

選択された具体的な動物モデル及び介入の時期、例えば糖尿病及び/又はインスリン抵抗性の出現前又は後、に応じて、動物モデルは、糖尿病及び/又はインスリン抵抗性の予防、処置、診断及びモニタリングのための本明細書で提供する方法の有効性を実証するために使用され得る。

【0365】

VII. 薬物スクリーニング

Eno1の投与は、誘発された糖尿病を有する動物での血糖の正常化を生じ、Eno1の発現を増強する化合物又は実体を検出するためのスクリーニングを介してEno1を新規治療剤の同定のための魅力的な標的にする。それにより本発明は、血糖及び糖尿病を調節する(modulating)ために有用である可能性がある化合物の同定のための方法を提供する。具体的には本発明は、Eno1を調節するために有用である可能性がある化合物の同定のための方法を提供し、ここで化合物は血糖及び糖尿病を調節する。

20

【0366】

そのようなアッセイは、Eno1と1つ以上のアッセイ構成要素、例えば被験化合物との間の反応を典型的には含む。他の構成成分は、被験化合物それ自体、又は被験化合物とEno1の天然結合パートナーとの組合せのいずれであってもよい。本明細書に記載のものなどのアッセイを介して同定される化合物は、例えば疾患を調節する、例えば抑制する、回復させる、処置する又は予防するために有用であり得る。Eno1の発現レベルを調節するために同定された化合物は、好ましくは異常な血糖及び/又は糖尿病の処置、例えば食後及び/又は空腹時グルコースを正常化する、グルコースクリアランス及び/又は耐糖能検査でのインスリンレベルを正常化する、HbA1cレベルを正常化することにおいて有用な活性についてさらに検査される。

30

【0367】

本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用される被験化合物は、天然及び/又は合成化合物の系統的ライブラリーを含む、任意の利用可能な供給源から得られてよい。被験化合物は:生物学的ライブラリー、ペプチドライブラリー(ペプチドの機能を有し、酵素分解に抵抗性であるが、それにも関わらず生理活性を保持している新規、非ペプチド骨格を有する分子のライブラリー;例えばZuckermann et al., 1994, J. Med. Chem. 37:2678~85)を参照されたい;空間的にアドレス可能な平行固相又は液相ライブラリー;逆重畳積分を必要とする合成ライブラリー法;「1ビーズ1化合物」ライブラリー法;及び親和性クロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法を含む当技術分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数の手法のいずれかによっても得られてよい。生物学的ライブラリー及びペプチドライブラリー手法はペプチドライブラリーに限定される一方で、他の4つの手法は、ペプチド、非ペプチドオリゴマー又は化合物の小分子ライブラリーに適用され得る(Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12:145)。

40

【0368】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、例えば: DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6909; Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422; Zuckermann et al. (1994). J. Med. Chem. 37:2678; Cho et al. (1993) Sci

50

ence 261:1303; Carrell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; and in Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37:1233において当技術分野において見出され得る。

【0369】

化合物のライブラリーは、溶液中(例えばHoughten, 1992, Biotechniques 13:412~421)、又はビーズ上(Lam, 1991, Nature 354:82~84)、チップ(Fodor, 1993, Nature 364:555-556)、細菌及び/又は孢子、(Ladner, USP 5,223,409)、プラスミド(Cull et al, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:1865~1869)又はファージ上(Scott and Smith, 1990, Science 249:386-390; Devlin, 1990, Science 249:404~406; Cwirla et al, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378~6382; Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222:301~310; Ladner 10 上記)に示され得る。

【0370】

本発明のスクリーニング方法は、細胞、例えば疾患細胞、特に異常なインスリン応答及び/又はグルコース取り込みを有する細胞を、被験化合物と接触させること、並びに細胞におけるEno1の発現及び/又は活性を調節する被験化合物の能力を決定することを含む。Eno1の発現及び/又は活性は、任意選択で血糖レベルの検出方法との組合せで、本明細書に記載のものなどの当技術分野において公知の任意の方法を使用して決定され得る。

【0371】

別の実施形態では本発明は、Eno1の基質又は生物学的に活性なその部分である候補又は被験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。さらに別の実施形態では本発明は、Eno1又は生物学的に結合する候補又は被験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。Eno1に直接結合する被験化合物の能力を決定することは、例えば当技術分野において公知の任意の方法によって達成され得る。

【0372】

本発明は、上に記載のスクリーニングアッセイによって同定される新規薬剤にさらに関する。したがって、適切な動物モデルにおいて本明細書に記載のとおり同定された薬剤をさらに使用することは本発明の範囲である。例えばEno1の発現及び/又は活性を調節できる薬剤は、そのような薬剤での処置の有効性、毒性又は副作用を決定するために動物モデルにおいて使用され得る。代替的に明細書に記載のとおり同定された薬剤は、そのような薬剤の作用機序を決定するために動物モデルにおいて使用され得る。さらに本発明は、上に記載の処置のために上に記載のスクリーニングアッセイによって同定された新規薬剤の使用に関する。

【0373】

特定の実施形態ではスクリーニング方法は、マルチウエルアッセイプレートの複数のウェルに含有される細胞を使用して実施される。そのようなアッセイプレートは、例えばStratagene Corp. (La Jolla, Calif.)及びCorning Inc. (Acton, Mass.)から商業的に入手でき、例えば48ウェル、96ウェル、384ウェル及び1536ウェルプレートを含む。

【0374】

結果の再現性は、同じ候補化合物の同じ濃度で1回より多く分析を実施することによって検査され得る(例えばアッセイプレートの1つより多いウェルで細胞をインキュベートすることによって)。追加的に候補化合物が化合物の性質及びその作用機序(複数可)の性質に依存してさまざまな濃度で有効である場合があることから、候補化合物のさまざまな濃度が検査され得る。一般に候補化合物濃度1fMから約10mMがスクリーニングのために使用される。好ましいスクリーニング濃度は、一般に約10pMから約100 μ Mの間である。

【0375】

本発明のスクリーニング方法は「ヒット」又は「リード」、すなわち、所望のものが最適化されていない生物学的活性を有する化合物を提供する。臨床的有用性のために必要とされる物理化学的、薬物動態及び毒物学的因子を満たすこれらの化合物について実施されるリードの最適化は、改善された薬物候補を提供できる。本発明は、これらの改善された薬物候補及び血糖及びインスリン応答を調節するための治療剤としてのそれらの使用も 50

包含する。

【0376】

VIII. キット/群(panel)

本発明は、疾患若しくは障害、障害の再発又は障害(例えば異常な血糖及び/若しくは糖尿病)について処置されている対象の生存を診断する、予測する又はモニタリングするための組成物及びキットも提供する。これらのキットは、Eno1に特異的に結合する検出可能な抗体、Eno1に特異的に結合する検出可能な抗体、染色のための対象組織試料を得る及び/又は調製するための試薬及びその使用のための説明書の1つ以上を含む。

【0377】

本発明は、生物学的試料中のEno1タンパク質又は核酸の存在を検出するためのキットも包含する。そのようなキットは、対象が異常な血糖及び/又は糖尿病を罹患している又は発症するリスクが増加しているかどうかを決定するために使用され得る。例えばキットは、生物学的試料中のEno1タンパク質又は核酸の存在を検出できる標識化合物又は薬剤並びに試料中のタンパク質又はmRNAの量を決定するための手段(例えばタンパク質若しくはその断片に結合する抗体、又はタンパク質をコードしているDNA又はmRNAに結合するオリゴヌクレオチドプローブ)を含み得る。キットは、本明細書で提供する任意の方法を実行する又は本明細書で提供する教示に基づいてキットを使用して得られる結果を解釈するためのキットの使用のための説明書も含み得る。キットは、試料中に存在するEno1の量の標準化のために、異常な血糖に関連しない試料中の対照タンパク質、例えば組織試料についてのアクチン、血液又は血液由来試料中のアルブミンの検出のための試薬も含み得る。キットは、キットで実施されるアッセイの対照としての使用又は定量のための検出用の精製されたマーカーも含み得る。

【0378】

キットは、対象における異常な血糖を診断するため(又は異常な血糖及び/若しくは糖尿病を発症する素因を持っている対照を同定するため)の方法における使用のための試薬群を含み、群はEno1レベルの検出のための試薬及び血糖の別の指標の検出のための試薬、例えばHbA1cを含む少なくとも2つの検出試薬を含む。

【0379】

抗体に基づくキットについてキットは、例えば:(1)Eno1に結合する一次抗体(例えば固体支持体に付着している)、及び、任意選択で(2)Eno1又は一次抗体のいずれかに結合し、検出可能な標識にコンジュゲートされている第2の、異なる抗体を含み得る。特定の実施形態ではキットは(1)第2のマーカータンパク質に結合する二次抗体(例えば固体支持体に付着している)、及び、任意選択で(2)HbA1c又はヘモグロビン(全又は未修飾ヘモグロビンのいずれか)又は二次抗体のいずれかに結合し、検出可能な標識にコンジュゲートされている第2の異なる抗体を含む。第1の及び第2のマーカータンパク質は異なっている。

【0380】

オリゴヌクレオチドに基づくキットについてキットは、例えば:(1)Eno1をコードしている核酸配列にハイブリダイズする、オリゴヌクレオチド、例えば検出可能に標識化されたオリゴヌクレオチド、又は(2)Eno1核酸分子を増幅するために有用なプライマーの対を含み得る。特定の実施形態ではキットは、定量的PCR法を使用する検出を可能にする各核酸マーカーに特異的な第3のプライマーを含む。特定の実施形態ではキットは、直接又は間接的に(例えばHbA1cレベルを使用して)対象における血糖を測定するための説明書をさらに含む。

【0381】

クロマトグラフィー法のためにキットは、クロマトグラフィーによる血糖の1つ以上の指標、例えばEno1及びHbA1cの検出及び同定を可能にする標識化マーカーを含むマーカーを含み得る。特定の実施形態ではクロマトグラフィー法のためのキットは、1つ以上の血糖指標の誘導体化のための化合物を含む。特定の実施形態ではクロマトグラフィー法のためのキットは、方法の指標を分離するためのカラムを含む。

【0382】

10

20

30

40

50

Eno1の検出に特異的な試薬は、複合体混合物、例えば血清、血液中のマーカーの検出及び定量を可能にする。特定の実施形態では試薬は種特異的である。特定の実施形態ではEno1試薬は種特異的ではない。特定の実施形態ではEno1試薬はアイソフォーム特異的である。特定の実施形態ではEno1試薬はアイソフォーム特異的ではない。特定の実施形態では試薬は全Eno1を検出する。

【0383】

特定の実施形態では血糖の上昇及び/又は糖尿病の診断、モニタリング又は特徴付けのためのキットは、Eno1の発現のレベルの検出に特異的な少なくとも1つの試薬を含む。特定の実施形態ではキットは、試料中の血糖のレベルを、直接若しくは間接的に又は両方で検出するための説明書をさらに含む。特定の実施形態ではキットは、HbA1cのレベルの検出のための少なくとも1つの試薬を含む。

10

【0384】

特定の実施形態ではキットは、例えば緩衝液剤、保存剤、タンパク質安定化剤、反応緩衝液も含み得る。キットは、検出可能な標識(例えば酵素又は基質)を検出するために必要な構成成分をさらに含む。キットは、アッセイされ、検査試料と比較され得る対照試料又は一連の対照試料も含有する場合がある。対照は、必要に応じて公知のレベルの指標を含む、対照血清試料又は精製されたタンパク質又は核酸の対照試料であってよい。キットの各構成成分は、個々の容器に入れられていてよく、すべての種々の容器はキットを使用して実施されたアッセイの結果を解釈するための説明書と共に単一のパッケージ内にあってよい。

20

【0385】

本発明のキットは、本発明の方法を実施するために有用な追加的構成成分を任意選択で含む。

【0386】

例えばいくつかの態様では本発明は、生物学的試料中のEno1のレベルを測定するための少なくとも1つの試薬、及びEno1のレベルを測定するための説明書を含む生物学的試料中のEno1を検出するためのキットに関する。いくつかの実施形態では試薬は抗Eno1抗体である。いくつかの実施形態ではキットは、抗Eno1抗体を検出するための手段をさらに含む。いくつかの実施形態では抗Eno1抗体を検出するための手段は検出可能な二次抗体である。いくつかの実施形態ではEno1のレベルを測定するための試薬は、Eno1 mRNAに相補的であるオリゴヌクレオチドである。

30

【0387】

前述のキットのいくつかの実施形態では説明書は、生物学的試料におけるEno1レベルを検出するためのイムノアッセイ又はELISAを記載している。いくつかの実施形態では説明書は、生物学的試料におけるEno1 mRNAのレベルをアッセイするための増幅反応を記載している。いくつかの実施形態では増幅反応は、生物学的試料中のEno1 mRNAの量を検出するために使用される。いくつかの実施形態では増幅反応は(a)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、(b)核酸配列ベース増幅アッセイ(NASBA)、(c)転写媒介増幅(TMA)、(d)リガーゼ連鎖反応(LCR)、又は(e)鎖置換増幅(SDA)である。

【0388】

前述のキットのいくつかの実施形態では説明書は、生物学的試料中のEno1 mRNAの量を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイを記載している。いくつかの実施形態ではキットは、Eno1 mRNAの部分に相補的である少なくとも1つのオリゴヌクレオチドをさらに含む。

40

【0389】

本発明は、対象試料における1つ以上の血糖指標及び少なくとも1つの対照試薬を検出するための試薬群をさらに提供する。特定の実施形態では対照試薬は、生物学的試料中の指標を検出するためであり、ここでその群は、陽性対照としての使用のため及び任意選択で生物学的試料中に存在する指標の量を定量するために、指標を含有する対照試料と共に提供される。特定の実施形態ではその群は、陽性又は陰性対照をそれぞれ提供するために、

50

生物学的試料中に存在又は非存在であることが公知である、異常な血糖に関連しないタンパク質又は核酸に対する検出試薬を含む。その群は、異常な血糖に関連しない試料中の対照タンパク質、例えば試料中に存在する指標の量の標準化のための血液又は血液由来試料中のアルブミンの検出のための試薬と共に提供されてよい。その群は、対照としての使用のため又は群で実施されるアッセイの定量のための精製された指標、例えばEno1と共に提供され得る。

【0390】

好ましい実施形態では群は、Eno1の検出のための試薬を、好ましくは対照試薬と併せて含む。その群ではEno1はEno1に特異的な試薬によって検出される。特定の実施形態では群は、HbA1cの検出のための試薬をさらに含む。特定の実施形態では群は、生物学的試料及び対照試料の種々の希釈物(例えば系列希釈物)の分析を可能にする反復ウエル、スポット又はポーションを含む。好ましい実施形態では群は、血糖の1つ以上の指標の定量的検出を可能にする。

10

【0391】

特定の実施形態ではその群は、1つ以上のマーカーの検出のためのタンパク質チップである。特定の実施形態では群は、1つ以上のマーカーの検出のためのELISAプレートである。特定の実施形態では群は、1つ以上のマーカーの検出のための定量的PCRのためのプレートである。

【0392】

特定の実施形態では検出試薬の群は、本発明の1つ以上のマーカーのための検出試薬及び少なくとも1つの対照試料を含む単一のデバイスで提供される。特定の実施形態では検出試薬の群は、本発明の2つ以上のマーカーのための検出試薬及び少なくとも1つの対照試料を含む単一のデバイスで提供される。特定の実施形態では本発明のさまざまなマーカーの検出のための複数の群は、群間の結果の比較を促進するために少なくとも1つの均一の対照試料と共に提供される。

20

【0393】

特定の実施形態では群及びキットは、対象において血糖を測定するための説明書又は助言をさらに含む。特定の実施形態ではキット又は群は、血糖の測定のための1つ以上の試薬又はデバイスと共に提供される。

【0394】

本発明は、糖尿病、例えば1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病、前糖尿病、インスリン抵抗性、耐糖能障害、異常な血糖及び血糖コントロールの喪失の少なくとも1つの処置のためのキットも提供する。キットは必要に応じてEno1及び使用のための1つ以上の説明書及び、投与用のデバイスを含む。

30

【0395】

本発明は、限定として解釈されるべきではない次の実施例によりさらに例示される。本出願全体を通じて引用されたすべての参考文献並びに公開された特許及び特許出願の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0396】

[実施例1]

糖尿病の病因における活性の重要なノードとしてのエノラーゼ1(Eno1)を同定するためのプラットフォーム技術の使用

この実施例では、国際特許出願第PCT/US2012/027615号に詳細に記載されているプラットフォーム技術を特注の糖尿病モデルから得られたデータを統合するため、及び糖尿病、特に2型糖尿病の発症に至らせる新規タンパク質/経路を同定するために用いた。この分析からもたらされる関係マップは、Eno1を糖尿病の病因における活性の重要なノードとして同定している。したがって、Eno1は重要な糖尿病処置標的、及び糖尿病に関連する診断/予後的マーカーである。

40

【0397】

50

[実施例2]

筋管でのグルコース取り込みのEno1制御

Eno1を商業的に入手できる発現ベクターを使用して大腸菌(*E. coli*)において6X HISタンパク質タグとして組換え的に発現した。タグ化Eno1を当技術分野において公知の親和性クロマトグラフィー法を使用して精製した。好ましくは6X HISタグを本明細書で提供する方法における使用のためのタンパク質を産生するために切断した。

【0398】

ヒト骨格筋筋芽細胞(HSMM)をPromoCellから調達し、供給業者によって推奨された増殖培地で培養した。HSMM筋芽細胞(細胞20,000個/ウェル)を実験前の7日間にわたり96ウェルプレート中、2%ウマ血清を用いて分化させた。細胞をヒトEno1(500ug/ml)で処置した。細胞を0.1% BSAを含有する200 μ l MBSS改変平衡塩溶液(MBSS)緩衝液で2回洗浄し、次いでMBSS 0.1%BSA 100ulで4時間血清飢餓とさせた。インスリン刺激の開始時に、MBSS 0.1% BSA緩衝液中の2x試薬100ulを飢餓培地100ulに加え、実験用の1x濃度にした。2x試薬は:インスリン(0、20nM及び200nM)、蛍光グルコース類似物2-NBDG(500uM)である。細胞をインスリン及び蛍光デオキシグルコース類似物2-NBDGで30分間処置し、次いでMBSS緩衝液で2回洗浄し、次に50ul MBSS緩衝液をウェルに加えた。細胞を含まないウェルでのバックグラウンド検出と共にグルコース取り込みを蛍光光度計で検出した。蛍光光度計読み取り後に、固定液(ホルマリン、50ul)をウェル中のMBSS 50ulに加え、次いで1uM DAPI 100ulをホルマリンとMBSSとの混合物100ulに加えた。

【0399】

図1A及び1Bに示すとおり筋管のEno1での処置は、インスリンの非存在及び存在の両方でグルコース取り込みを顕著に増加させた($p=0.025$ 、未処置対Eno1処置のインスリン非依存性グルコース取り込み)。これらの結果は、インスリン依存性及びインスリン非依存性グルコース取り込みの両方におけるEno1に関する役割を実証している。Eno1によって誘発されるインスリン依存性グルコース取り込みは、Eno1がインスリンに感受性の対象において少なくとも骨格筋でインスリンシグナル伝達経路と複雑に関連することを実証する。結果は、インスリン依存性グルコース取り込みにおけるEno1に関する役割も実証している。この観察は、インスリン抵抗性を罹患しており、高インスリン血症も有する可能性があり、それによりインスリン作用が損なわれていて、それによりインスリン非依存性である1型及び2型糖尿病の両方の対象の処置のために重要である。これらの結果は、もはや正常なインスリンシグナル伝達を有さない個体においてでさえ、グルコース取り込みを刺激することにEno1が有用であることを実証している。

【0400】

ヒト骨格筋筋管の細胞培養物を、Eno1取り込みを測定するために上に記載の精製Eno1タンパク質で48時間処置した。次いで細胞中のEno1レベルをウエスタンブロットによって決定した。図2A及び2Bに示すとおり、500 μ g/ml Eno1又は1000 μ g/ml Eno1で処置した細胞中のEno1レベルは、未処置細胞と比較してEno1の顕著に高いレベルを有した。1000 μ g/ml Eno1で処置した細胞中のEno1レベルはまた500 μ g/ml Eno1で処置した細胞におけるよりも高かった。これらの結果は、Eno1がヒト骨格筋筋管に用量依存的様式で送達されることを示している。

【0401】

グルコース取り込みにおけるEno1酵素活性の役割を決定するために、精製Eno1を88℃、90秒間での処置によって熱不活性化し、未変性(native)及び熱不活性化Eno1の活性レベルを比較した。Eno1活性をAbcam (Cambridge, MA; Cat. No. ab117994)からのEno1人活性アッセイキット(human activity assay kit)を使用して比色分析アッセイによって決定した。図3Aに示すとおり、熱不活性化はEno1酵素活性を大きく低減させたが、いくらかの残存活性が残った。

【0402】

未変性及び熱不活性化Eno1のグルコース取り込みへの効果を上に記載の方法に従ってヒト骨格筋筋管において比較した。図3Bに示すとおり、未変性(活性)Eno1で処置した筋管は

、Eno1で処置していない筋管と比較して顕著に高いグルコース取り込みを示した。熱不活性化Eno1で処置した筋管は活性Eno1で処置した筋管と比較して顕著に低いグルコース取り込みを示した。これらの結果は、グルコース取り込みへのEno1の効果がEno1酵素活性に依存していることを示している。Eno1を含まない対照と比較して熱不活性化Eno1において観察されたグルコース取り込みにおける増加は熱不活性化酵素の残存Eno1活性によると考えられた。

【0403】

[実施例3]

食餌性肥満(DIO)マウスのマウスモデル

食餌性肥満の2つの基本的に等価なモデルを本明細書で提供する方法において使用した

10

。

【0404】

第1の方法では、オスC57BL/6JマウスをJackson Laboratories(Bar Harbor、ME)から得て、最初にケージあたり4~5匹を22℃、12:12時間日夜周期で飼育した。6週齢の始めにマウスに高脂肪食(Research Dietsカタログ番号:D12492、60kcal%脂肪、20kcal%タンパク質及び20kcal%炭水化物)を与えた。痩身対照マウスも得て、標準的食餌を与えた。実験前のDIOマウスの体重は、痩身対照マウスのものより有意に重かった。一研究ではDIOマウスは体重 38.4 ± 0.6 gであった一方で痩身マウスは体重 29.9 ± 0.5 g($p < 0.05$)であった。

【0405】

第2の方法では、食餌誘発肥満オスC57BL/6Jマウス(12週齢)及び痩身対照マウス(12週齢)をJackson Laboratories(Bar Harbor、ME)から得て、最初にケージあたり4~5匹を22℃、12:12時間日夜周期で飼育した。マウスを処置前の1週間にわたり動物施設に順応させ、DIO群については高脂肪食(Research Dietsカタログ番号:D12492、60kcal%脂肪、20kcal%タンパク質及び20kcal%炭水化物)又は痩身群については低脂肪食(10kcal%脂肪)で維持した。

20

【0406】

[実施例4]

食餌性肥満(DIO)マウスにおけるEno1での耐糖能障害の処置

実験プロトコルは、マウス(n =群あたり10匹)が高脂肪食餌で7週間維持された後に肥満であった時に開始した。浸透圧ミニポンプ(Model 1004、Alzet、Cupertino、CA)を製造者の指針に従ってEno1ペプチド又はビヒクル(リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、pH7.0)の0.1mlで満たした。ポンプを滅菌生理食塩水、4℃で一晩準備した。マウスをイソフルラン(100%酸素中1~3%)で麻酔し、手術前に70%イソプロパノール及びベタジン溶液で洗った。肩甲骨中央領域に小さな皮下切開を作り、ポンプを挿入し、創傷を縫合した。動物は、自身のケージに戻す前に回復させた。移植した皮下浸透圧ミニポンプは、持続的にペプチドを0.11 μ l/時間の一定速度で4週間注入した。ポンプ交換手術を4週間ごとに実施した。ポンプ注入速度から算出された精製Eno1処置用量は10 μ g/kg体重であった。

30

【0407】

耐糖能検査(GTT)を6時間の絶食後に日常的方法を使用して実施した。簡潔には、最初に空腹時血糖レベルを決定し、1.5g/kg体重の用量での腹腔内(ip)20%ブドウ糖液注射が続いた。血糖レベルを尾静脈からグルコース注射後15、30、60、90及び120分に、ACCU-CHEK(登録商標)Advantage検糖計(ROCHE(登録商標)Diagnostics、Indianapolis、IN)を使用して測定した。GTTの際の曲線下面積(AUC)をGraphpad Prism(登録商標)ソフトウェアで算出し、スチューデントのt検定をさまざまな処置群間の有意性について実施した。結果を図4A及び4Bに示す。

40

【0408】

容易に観察され得るとおりEno1で処置されたマウスは、未処置マウスと比較して血糖曲線下面積における有意な減少を有した($p=0.017$)。耐糖能検査によって実証されたとおり、これらのデータはEno1タンパク質での肥満マウスの処置が耐糖能を増加させることを実証しており、Eno1がインスリン抵抗性、耐糖能障害及び2型糖尿病の処置において有効で

50

あることを示している。

【0409】

[実施例5]

PAMAMデンドリマー、筋肉標的化Eno1の生成

筋管でのグルコース取り込みの増加及び全身性投与での耐糖能の増加におけるEno1の有効性を実証し、筋肉標的化Eno1を耐糖能増加におけるその有効性を分析するために生成した。筋肉標的化ペプチド(MTP)ASSLNIA及び/又はEno1を含有する検出可能に標識化されたG5-PAMAMデンドリマーを下に記載の方法を使用して生成した。MTP対デンドリマーのさまざまな範囲の比をデンドリマーあたり約10MTPペプチド、デンドリマーあたり約3MTPペプチド、又はデンドリマーあたり約1MTPペプチドを含有するMTP含有デンドリマーを含んで評価した。 10

【0410】

Eno1デンドリマー複合体を調製する工程は、試薬の最適比及び濃度の同定を含む。Eno1の保存溶液を緩衝液中に調製し、タンパク質溶液をG5デンドリマー筋肉標的化ペプチド(MTP)コンジュゲートとさまざまな比で混合した。デンドリマー対Eno1のさまざまな比の範囲もEno1タンパク質1分子あたり約1つのデンドリマー又はEno1タンパク質1分子あたり約5個のデンドリマーを含有するEno1含有デンドリマーを含んで評価した。

【0411】

Eno1-デンドリマー-SMTP複合体の安定性をさまざまな温度で評価し、安定性を商業的に入手できるEno1アッセイを使用してEno1活性を測定することによって、3~4ヵ月の期間にわたって決定した。選択したコンジュゲートもデンドリマーペプチドコンジュゲートとEno1との間の複合体化を確認するDynamic Light Scattering (DLS)及びUV-Vis分光測定を含む生物物理学的技術を使用して評価した。 20

【0412】

Eno1の純度の決定:Eno1タンパク質の5.32mg/mL溶液の純度をクーマシー及び銀染色及びウエスタンブロットによって調べた。10 µg/ ウエルから100ng/ ウエルの範囲のEno1タンパク質のいくつかの希釈物を調製し、12ウエル、4~12% mini-PROTEAN(登録商標)TGXゲル[BIO-RADカタログ番号456-1095ロット番号4000 79200]に投入した。レーン指定は次のとおりであった、レーン1: Ladder (Precision Plus Protein Standard Dual Color [BIO-RADカタログ番号161-0374]、レーン2:Eno1(10.0 µg)、レーン3:Eno1(1.0 µg)、レーン4:Eno1(0.1 µg)、レーン5: Ladder (Precision Plus Protein Standard Dual Color [BIO-RADカタログ番号161-0374]、レーン6:Eno1(10.0 µg)、レーン7:Eno1(1.0 µg)、レーン8:Eno1(0.1 µg)、レーン9: Ladder (Precision Plus Protein Standard Dual Color [BIO-RADカタログ番号161-0374]、レーン10:Eno1(10.0 µg)、レーン11:Eno1(1.0 µg)、レーン12:Eno1(0.1 µg)。SDS-PAGEを200V、20~25分間で実行した。 30

【0413】

クーマシー染色:ゲルを実行後、ゲルを3つの等しい部分に分けた。部分の1つをクーマシー染色で染色した。簡潔にはゲルをクーマシー染色溶液(40%メタノール及び7%酢酸中0.025%クーマシー染色)100mLに浸漬し、マイクロ波中で1分間加熱した。次いでゲルを穏やかに攪拌して45分間染色させた。染色完了後、ゲルを、脱色溶液(40%メタノール及び7%酢酸)を使用して、バックグラウンド染色が許容可能になるまで脱色した。 40

【0414】

図5に示すとおりタンパク質は、Eno1のサイズと一致する約47KDaの単一バンドとして泳動された。

【0415】

銀染色:クーマシー染色がタンパク質バンドの可視化のための高感度法ではないことから、別の部分のゲルをBIO-RADのSilver Staining Kit [BIO-RADカタログ番号161-0443]を使用して銀染色で染色した。修正(Modified)銀染色プロトコールに従った。

【0416】

図6に示すとおり、ラダーのバンドに対応する余分なバンドが各レーンに見られる場合 50

がある。これは、隣のレーンへのラダーの漏出のためである。矢印を付けた3つのバンドはラダーからではない。最も顕著なバンドは、約47kDaであり、Eno1のサイズに一致する。精製タンパク質には2つの余分なバンドがあるが。これらのバンドはかすかであり、Eno1の全純度が比較的高かったことを示している。

【0417】

ウエスタンブロット分析:Eno1の同一性はウエスタンブロットによってさらに確認された。この目的のためにゲルの最後の部分をTris-グリシン緩衝液100mLに移し、トランスブロットSDセミドライ転写装置(BIO-RAD)を20V、2.0時間で使用して0.2 μ m PVDF膜(BIO-RAD)に転写した。転写の効率は膜上の染色前ラダーバンドの存在を確認することによって調べた。膜を1.0時間乾燥させた。次いで膜をメタノールで1.0分間湿らせ、ODYSSEY(登録商標)ブロッキング緩衝液(LICOR)15.0mLで室温、2.0時間ブロックした。

【0418】

ブロッキング完了後、膜を抗ENO1-1 m-Ab(マウス)(ABNOVAから購入)30 μ Lを含有するODYSSEY(登録商標)ブロッキング緩衝液15.0mLで、一晚4°Cでインキュベートした。次いで膜を1XPBS-Tの3x30mLで各5分間振とうして洗浄した。膜をIRDye(登録商標)800CW(LICORから購入)で標識化したヤギ抗マウス二次抗体5 μ Lを含有するODYSSEY(登録商標)ブロッキング緩衝液15.0mLで2.0時間、室温でインキュベートした。インキュベーション後、膜を1XPBS-Tの3x30mLに続いて1XPBSの2x30mLで各5分間振とうしながら洗浄した。最後に、膜をLICOR ODYSSEY Infrared Imagerを使用して画像化した。図7に示すとおり、ウエスタンブロット分析は47kDaの主要なバンドがEno1であることを確認した。

【0419】

エノラーゼ-I/G5-PAMAM-SMTPのゼータ(ζ)電位特徴付け:Eno1及び2-3骨格筋標的化ペプチド(SMTP)で装飾された第5世代PAMAMデンドリマーをEno1/G5-SMTPタンパク質/デンドリマー複合体を形成するように比を変動させて複合体化した。デンドリマーの濃度は1.0 μ Mで一定に維持し、Eno1濃度は0.1 μ M~10.0 μ Mの間で変動させた。下の表2は、エノラーゼ-I/G5-デンドリマー/SMTP混合物を調製する方法を記載している。

【0420】

【表2】

表2.デンドリマー複合体の形成のためのEno1及びG5-デンドリマー/SMTPの種々の組合せ

Eno1/デンドリマー モル比	Eno1 (5.32 mg/mL)	G5-デンドリマー SMTP (30.0mg/mL)	PBS 緩衝液 pH=7.40
10:1	88.3 μ L	1.03 μ L	910.67 μ L
5:1	44.15 μ L	1.03 μ L	954.82 μ L
2:1	17.66 μ L	1.03 μ L	981.31 μ L
1:1	8.83 μ L	1.03 μ L	990.14 μ L
1:2	4.42 μ L	1.03 μ L	994.55 μ L
1:5	1.77 μ L	1.03 μ L	997.2 μ L
1:10	0.88 μ L	1.03 μ L	998.09 μ L

【0421】

各試料を、G5-デンドリマー/SMTPをそれぞれの量のPBSに加えることによって調製した。次いでエノラーゼをG5-デンドリマー/SMTP溶液に低速でボルテックスしながら滴下様式で加えた。次いで試料を分析前に室温で、20分間インキュベートした。

【0422】

サイズ測定をMalvern InstrumentsからのZetasizer Nano Z90s装置を使用して行った。

初期設定パラメーターを測定のために使用し、各試料について3回の別々の測定値を取得した。図8は、Eno1対デンドリマー/SMTPの2:1モル比を有するEno1/G5-デンドリマー/SMTP複合体の3つの試料についての代表的ゼータ(ζ)-電位データを示す。ゼータ(ζ)電位をDynamic Light Scatteringを使用して測定した。図8に示すとおり、3つの試料のピークは、合致し、エノラーゼ-SMTPデンドリマー複合体の均一の電荷分布を示している。

【0423】

エノラーゼ-I/G5-SMTP複合体の安定性:エノラーゼ-I/G5-デンドリマー/SMTPコンジュゲートの安定性をEno1ヒトActivity Assay Kit(ABCam、Cambridge、MA;カタログ番号ab117994)を使用して測定した。簡潔には試料をEno1に対して特異的なマウスモノクローナル抗体を含有するマイクロプレートに加えた。マイクロプレートを室温、2時間インキュベートし、Eno1をマイクロプレートのウェル内に免疫捕捉させた。マイクロプレートのウェルを他のすべての酵素を除去するために洗浄した。Eno1活性を、ピルベートキナーゼ(PK)、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)並びに必要とされる基質2-ホスホ-D-グリセレート(2PG)及びNADHを含むアッセイ緩衝液中のNADHの消費を追跡することによって決定した。Eno1は2PGをホスホエノールピルベートに変換し、それはPKによってピルベートに変換される。ピルベートはLDHによって乳酸に変換され、この反応はNADHを必要とする。NADHの消費を340nmでの吸光度の減少としてモニターした。

【0424】

異なる温度、異なる時点で保存したエノラーゼ-I/G5-デンドリマー/SMTPコンジュゲートの活性を上に記載のアッセイを使用して測定した。Eno1の500ngの濃度を、この濃度がアッセイキットのダイナミックレンジの中央にあることから検査のために選択した。2つの異なるセットの溶液を調製した。1つのセット(対照)はEno1だけを含有し(すなわち非コンジュゲートEno1)、他のセットはEno1/G5-デンドリマー/SMTP混合物を含有した。これらの混合物を次いで-80℃、-20℃、4℃、22℃及び37℃で保存した。結果は、第1週ではすべての試料が活性であり、Eno1/G5-デンドリマー/SMTPコンジュゲートはEno1単独よりもわずかに高い活性を有すると考えられたことを示した。しかし溶液の活性は、それらがデンドリマーを含有するかどうかに関わらず、次の2週間着実に減少した。3週目までに4℃、22℃及び37℃で保存した溶液は活性を示さず、-80℃及び20℃で保存した溶液は顕著な安定性を示した。研究終了時(10週)に-80℃で保存したEno1/G5-デンドリマー/SMTP溶液は、その活性の約90%を保持していた一方でEno1単独では35%活性だけであった。一方-20℃で保存したEno1/G5-デンドリマー/SMTP溶液は約24%活性であったが、-20℃で保存したEno1単独では活性ではなかった(図9)。

【0425】

[実施例6]

G5 PAMAMデンドリマーでのin Vivo Eno1標的化研究

Eno1を含有する検出可能に標識化されたPAMAMデンドリマー複合体を先の実施例において提供された方法を使用して調製し、皮下注射後のマウスにおける組織分布について分析した。具体的には注射前の72時間、バックグラウンド蛍光を制限するためにマウスにアルファルファ不含有飼料を与えた。マウスに3μg Eno1/マウスを皮下で合計150μl(75μl左側方、75μl右側方)注射した。複合体中のデンドリマー対Eno1のモル比は5:1であった。注射1、4及び24時間後に動物を屠殺し、皮をはがし、LI-COR画像化の準備のために臓器を取り出した。結果を図10Aに示す。

【0426】

示すとおり1時間でEno1-PAMAMデンドリマーの全身性分布が観察された。4時間後、Eno1-PAMAMデンドリマーの顕著な蓄積が肝臓、腎臓及び皮下脂肪並びに上部胴体において観察された。24時間後Eno1-デンドリマー複合体は実質的に排除され、実質的に肝臓及び腎臓において観察された。

【0427】

追跡研究をSMTP「ASSLNIA」を含有する骨格筋標的化Eno1-PAMAMデンドリマー複合体を使用して実施した。Eno1及びSMTP((エノラーゼ-Vivoタグ680x1)-(G5-SMTP))を含有する

検出可能に標識化されたPAMAMデンドリマー複合体を先の実施例において提供する方法を使用して調製した。複合体中のデンドリマー対SMTPのモル比は1:1であった。実験を基本的に上に記載のとおり実施した。骨格筋標的化Eno1-PAMAMデンドリマー複合体を50 µg/kg体重の用量で投与した。図10B中のこれらの画像は注射の1時間後に取られた。心臓以外の臓器は、身体内に保持された。容易に観察できるとおり、筋肉標的化Eno1デンドリマー複合体は骨格筋に標的化されたが心臓にはされなかった。これらの結果は、骨格筋標的化Eno1-PAMAMデンドリマー複合体がEno1の骨格筋細胞への送達のために使用できることを実証している。

【0428】

[実施例7]

食餌性肥満(DIO)マウスにおける筋肉標的化Eno1での耐糖能障害の処置

食餌誘発肥満オスC57BL/6Jマウス(12週齢)及び痩身対照マウス(12週齢)をJackson Laboratories (Bar Harbor, ME)から得て、最初にケージあたり4~5匹を22℃、12:12時間日夜周期で飼った。マウスを処置前の1週間にわたり動物施設に順応させ、DIO群については高脂肪食(Research Dietsカタログ番号:D12492;60kcal%脂肪、20kcal%タンパク質及び20kcal%炭水化物)又は痩身群については低脂肪食(10kcal%脂肪)で維持した。

【0429】

13週齢の最初にすべてのマウスは、生理食塩水又は、G5デンドリマー、骨格筋標的化ペプチド(SMTP)及び精製Eno1(50mg/kg体重)のさまざまな複合体の組み合わせのいずれかを皮下注射で4週間毎日受けた。実験の4週間の処置期間の際に腹腔内耐糖能検査(IPGTT)を毎週実施した。体重、食後グルコース及び空腹時グルコースを処置期間の際に毎週測定した。処置群を次に示す:

1. LFD-痩身対照-注射無し
2. HFD-生理食塩水対照(G5+SMTP+Eno1と等体積)
3. HFD-G5単独(G5+SMTP+Eno1 50 µg/kgと等量)
4. HFD-G5+SMTP(G5+SMTP+Eno1 50 µg/kgと等量)
5. HFD-G5+Eno1(50 µg/kg体重)
6. HFD-G5+SMTP+Eno1(50 µg/kg体重)

【0430】

複合体中のデンドリマー対Eno1のモル比は5:1であり、複合体中のデンドリマー対SMTPのモル比は1:1であり、デンドリマーをアセチル化した。研究からの結果を図11、12、13、14及び15に示す。

【0431】

この小さなコホートでは、研究期間のいずれの時点でもDIOマウスにおいて体重に顕著な効果を有した治療レジメンは見出されなかった(図11を参照されたい)。

【0432】

デンドリマー結合筋肉標的化Eno1の単一用量でのマウスの処置は、検査した最も初期の時点で血糖レベルに効果を有したことが実証された。図12に示すとおり、G5+SMTP+Eno1 50 µg/kgの投与の1時間後に、生理食塩水対照と比較して血糖の低減が、4時間で最大の低減が観察された。効果は、単回注射後24時間ではもはや観察されなかった。

【0433】

デンドリマー結合筋肉標的化Eno1の投与開始の1週間後、Eno1デンドリマーSMTP複合体(DIOエノラーゼ-1+NP+SMTP)で処置したDIOマウスでの耐糖能は、デンドリマーSMTP複合体単独(DIO NP+SMTP)で処置したDIOマウスにおける耐糖能よりも顕著に低かった(図13A及び13Bを参照されたい)。

【0434】

デンドリマー結合筋肉標的化Eno1の投与の開始2週間後に、DIOマウスでの耐糖能はまだ顕著に改善されていた(図6C及び6Dを参照されたい)。耐糖能の改善は、デンドリマー複合体中のEno1の存在に依存した(DIO G5+SMTP 対 DIO Eno1 G5+SMTP、 $p=5.7 \times 10^{-5}$ 、 $p=0.002$)。効果は、単回注射後23時間ではもはや観察されなかった(データ未記載)。

10

20

30

40

50

【0435】

1及び2週目に観察されたG5+SMTP+Eno1処置の有益な効果は、4週目まで維持された(図14A及び14Bを参照されたい)。具体的にDIO Eno1 G5+SMTP処置マウスでの耐糖能は、痩身マウスにおけるものと同様であった。耐糖能の改善は顕著であり、デンドリマー複合体中のEno1の存在に依存していた(DIO G5+SMTP 対 DIO Eno1 G5+SMTP、 $p=0.0017$)。効果は、単回注射後23時間ではもはや観察されなかった(データ未記載)

【0436】

これらの結果は、デンドリマー結合した筋肉標的化Eno1が食餌性肥満のモデルにおいて耐糖能を増加させることに有効であること及びG5+SMTP+Eno1が食餌性肥満のマウスモデルにおいて血糖を正常化することに有効であることを示している。これらの結果はEno1が血

10

【0437】

マウスを上に記載のとおり追加的に4週間(合計8週間処置)処置し、血清乳酸レベルを痩身マウス、食餌性肥満(DIO)マウス、G5-デンドリマーで処置したDIOマウス及びEno1/G5-デンドリマー/SMTP複合体で処置したDIOマウスにおいて8週間の処置後に決定した。血清中の乳酸レベルをBiovision (Milpitas, CA)からの乳酸比色分析アッセイキットを使用して測定した。図15に示すとおり、Eno1/G5-デンドリマー/SMTP複合体は、乳酸血清レベルを有意に低減させた。この結果は、Eno1/G5-デンドリマー/SMTP複合体で処置したDIOマウスにおいて観察されたグルコースレベルの低減が乳酸への解糖の短絡よりむしろグルコース酸化の増加によることを示唆している。これは、乳酸アシドーシスの望ましくない効果を最小化する。

20

【0438】

[実施例8]

肥満の遺伝モデルである、db/dbマウスにおける筋肉標的化Eno1での耐糖能障害の処置オス肥満及び糖尿病db/dbマウス(オスBKS.Cg-m+/+Lepr^{db}/J)マウスは、商業的供給者から得た。すべてのマウスを最初にケージあたり2~3匹、22℃、12:12時間日夜周期で飼育、標準的固形飼料で3週間動物施設に順応させる。8週齢で、次の生理食塩水又は、G5デンドリマー、骨格筋標的化ペプチド(SMTP)及び精製Eno1のさまざまな複合体の組み合わせのいずれかの皮下注射を皮下投与によって1日1回投与した($n=1$ 群あたり6匹)。処置群は次の

30

1. 生理食塩水注射でのdb/db
2. G5+SMTP(25ug/kg用量でのEno1+G5+SMTPと等体積)でのdb/db
3. Eno1(25ug/kg体重)+G5+SMTPでのdb/db
4. Eno1(50ug/kg体重)+G5+SMTPでのdb/db

【0439】

複合体中のデンドリマー対Eno1のモル比は5:1であり、複合体中のデンドリマー対SMTPのモル比は1:1であり、デンドリマーをアセチル化した。

【0440】

7日目に上の実施例に記載のとおり、マウスに適切な薬剤を投与し、IPGTTの投与の前に食餌を与えずに6時間ケージに戻した。結果を図16A及び16Bに示す。容易に観察され得るとおり、Eno1+G5+SMTPでのマウスの処置は、G5+SMTPで処置したマウスと比較して、Eno1(50ug/kg体重)+G5+SMTPで処置したマウスにおいて観察されるグルコースクリアランスにおける有意な増加($p=0.015$)を示し、グルコースチャレンジ後に耐糖能における増加を生じた。

40

【0441】

上に列挙した処置群それぞれにおいて6匹のマウスのうち3匹で研究を継続した。マウスに、示した薬剤を追加的に1週間(合計2週間)投与した。食後血糖を低下させることへのEno1の効果を試験した。具体的には食餌の摂取を管理することなく、マウスでの血糖レベルを活性剤の投与直後から2時間評価した。結果を図17A及び17Bに示す。示されるとおり、E

50

no1(50ug/kg体重)+G5+SMTPの投与が食後血糖を減少させることが実証され、G5+SMTPの投与と比較して血糖における統計的に有意な低減を投与30分後に生じた。しかしEno1+G5+SMTP処置の30分後に観察された血糖の低減は、Eno1注射の24時間後には維持されていなかった(図18)。

【0442】

したがってEno1+G5+SMTPの1日2回投与の血糖レベルへの効果をdb/dbマウスにおいて評価した。処置は、皮下注射によって1日2回、1度は朝に及び1度は夜に4週間投与した。処置群は次のとおりであった：

1. PBS
2. Eno1+G5+SMTP 100 μ g/kg体重
3. Eno1+G5+SMTP 200 μ g/kg体重

10

【0443】

Eno1+G5+SMTP複合体中のデンドリマー対Eno1のモル比は5:1であり、Eno1+G5+SMTP複合体中のデンドリマー対SMTPのモル比は1:1であり、デンドリマーをアセチル化した。

【0444】

処置群2のための合計一日用量は200 μ g/kg体重のEno1+G5+SMTPであり、処置群3のための合計一日用量は400 μ g/kg体重のEno1+G5+SMTPであった。食餌摂取を管理せずに、食後血糖レベルをマウスで夜の注射の16時間後(すなわち朝注射前)に評価した。図19に示すとおり、200 μ g/kg体重のEno1+G5+SMTPの1日2回注射は対照PBS処置と比較して食後血糖レベルを減少させた。

20

【0445】

したがってEno1 G5+SMTPでのマウスの処置は、db/dbマウスにおいてグルコース応答を正常化することが示された。実施例7及び8に記載のデータは一緒になって、Eno1が2型糖尿病の誘発及び遺伝的モデルの両方において耐糖能を増加させるのに有効であることを実証している。

【0446】

[実施例9]

アシル化 対 非アシル化SMTP含有デンドリマーの比較毒性

アシル化及び非アシル化デンドリマー含有SMTPの毒性をクレアチンキナーゼ及びカスパーゼ3アッセイを使用して比較した。マウスにスタウロスポリン(陽性対照)、スタウロスポリン+阻害物質(陰性対照)、G5 PAMAMデンドリマー、SMTP-G5 PAMAMデンドリマー及びアシル化SMTP-G5 PAMAMデンドリマーのうちの1つを注射した。複合体中のデンドリマー対Eno1のモル比は5:1であり、複合体中のデンドリマー対SMTPのモル比は1:1であった。注射後、試料を回収し商業的に入手できるキットを使用して、総細胞溶解物に対するパーセントとしてのクレアチンキナーゼレベル及びカスパーゼ3活性についてアッセイした。結果を図20に示す。図20に示すとおり、濃度1uM及び3uMの両方でのG5 PAMAMデンドリマーの投与並びに濃度3uMでのSMTP-G5 PAMAMデンドリマーの投与は、クレアチンキナーゼ活性における顕著な増加を生じた。そのような効果はアシル化SMTP-G5 PAMAMデンドリマーでは観察されなかった。同様にカスパーゼ3活性における顕著な増加が3uM G5 PAMAMデンドリマー及びSMTP-G5 PAMAMデンドリマーの投与後に観察された。しかし、カスパーゼ3活性における増加は、アシル化SMTP-G5 PAMAMデンドリマーの投与では観察されなかった。これらの結果は、SMTP-G5 PAMAMデンドリマーのアシル化が毒性を低減することを実証している。

30

40

【0447】

[実施例10]

2型及び1型糖尿病の遺伝的及び誘発モデルにおける筋肉標的化Eno1での耐糖能障害の処置

オス肥満マウス、糖尿病db/dbマウス(オスBKS.Cg-m/+Lepr^{db}/J)、NOD1マウス又はストレプトゾシン処置マウスを得た又は生成した。すべてのマウスをケージあたり2~3匹、22℃、12:12時間日夜周期で飼育、適切な固形飼料(すなわち肥満マウスには高脂肪食餌、他

50

のマウスには通常固形飼料)で少なくとも1週間動物施設に順応させる。適切な齢数、典型的には約8週齢で、生理食塩水又は、G5デンドリマー、骨格筋標的化ペプチド(SMTP)及び精製Eno1(25又は50mg/kg体重)のさまざまな複合体の組み合わせのいずれかの皮下注射を1~2週間の間毎日投与する。上に記載のとおり埋め込み式ポンプ(例えばALZETポンプ)は毎日又は継続的な投与に使用できる。代替的に薬剤は、種々の製剤で筋肉内に投与できる。筋肉内注射は、皮下注射よりも少ない頻度で典型的には実施される(例えば典型的には約1週間に1回)。

【0448】

2週間の経過の間、腹腔内耐糖能検査(IPGTT)を実施し、空腹時及び食後血糖を無作為に又は薬剤投与後に経時的にモニターする。体重を処置期間の間毎週測定する。処置群は、少なくとも1つの対照(例えば1つ又は2つ)及び下に示すリストから少なくとも1つのEno1処置を含む:

10

1. 生理食塩水注射
2. G5+SMTP(25ug/kg体重/日でのEno1+G5+SMTPと等体積)
3. Eno1(25ug/kg体重/日)+G5+SMTP
4. Eno1(50ug/kg体重/日)+G5+SMTP
5. Eno1(25ug/kg体重/日)
6. Eno1(50ug/kg体重/日)

【0449】

提供される投与量は、例示的であり、限定的なものとして解釈されない。

20

【0450】

Eno1 G5+SMTPでのマウスの処置が糖尿病マウスでのグルコース応答を正常化すると実証される。

【0451】

[実施例11]

マウスにおけるグルコースレベル及びグルコース応答の評価

腹腔内耐糖能検査(IPGTT)は上に記載され、耐糖能及びインスリン応答を評価するために日常的に使用される。血糖及びインスリン応答の正常化におけるEno1の有効性を確認するために使用できる他の例示的方法を下に記載する。身体構成及び代謝を評価するための方法も下で提供する。

30

【0452】

腹腔内インスリン耐性検査(IPITT)

インスリン耐性検査(ITT)を、ピルベート代謝を評価するために1時間の絶食後に実施する。初期血糖レベルを決定し、ヒトインスリン(1~2U/kg;Humulin R; Eli Lilly、Indianapolis、IN)の注射(ip)を続けて行う。血糖レベルを尾静脈から上に記載のとおりインスリン注射後15、30、60、90及び120分で測定する。インスリン注射量は、高脂肪食餌を供されているマウスでの肝臓インスリン抵抗性の発症によるインスリン応答によって経験的に決定する。

【0453】

腹腔内ピルベート耐性検査(IPPTT)

40

ピルベートチャレンジ検査を6時間の絶食後に投与する。初期血糖レベルを決定し、生理食塩水(2g/kg;Sigma、St. Louis、MO)に溶解したピルベートの注射(ip)を続けて行う。血糖レベルを尾静脈から上に記載のとおりピルベート注射後15、30、60、90及び120分で測定する。検査の間の曲線下面積(AUC)を算出する。

【0454】

食後血糖レベル

血液試料は、食餌を自由摂取させたマウスから無作為に、目的の薬剤の投与後に規定の時間又は時間間隔で得る。血糖レベルを測定する。

【0455】

空腹時血糖レベル

50

血液試料は、予め規定した時間の絶食(典型的には約6~8時間)後に目的の薬剤の投与後に規定の時間又は時間間隔でマウスから得る。血糖レベルを測定する。

【0456】

血糖レベルを評価するための指標レベルの評価

1型又は2型糖尿病のマウスモデルを本発明の1つ以上の薬剤及び適切な対照で処置する。HbA1c及び/又はEno1タンパク質及び/又はRNAのレベルを持続時間にわたる血糖レベルを決定するためにモニターする。

【0457】

二重エネルギーX線吸光度測定(DEXA)

さまざまな処置群の身体構成をLUNAR PIXImus(登録商標)マウスデンスitomーターを製造者によって推奨される説明書に従って使用して二重エネルギーX線吸光度測定(DEXA)走査によって決定する。除脂肪体重、脂肪体重、全身組織体重、骨密度及び骨ミネラル含有量を記録し、分析した。

【0458】

包括的実験動物モニタリング系(CLAMS)

CLAMS(Columbus Instruments, Columbus, OH, USA)代謝モニタリングケージを水平及び垂直活動、摂食及び飲水、酸素消費並びにCO₂産生を同時にモニターするために使用する。ASO注射及び対照マウスをCLAMSケージに個々に入れ、1~2日間のケージへの順化後に4日間にわたってモニターする。空腹及び食後状態の両方で種々のパラメーターを記録する。食餌及び水消費を累積データとして直接測定する。1時間ごとのファイルは、以下の各パラメーターについてのすべての測定値を示す:消費された酸素容積、1時間あたりのml/kg(VO₂)、産生された二酸化炭素の容積、1時間あたりのml/kg(VCO₂)、呼吸交換率、熱(kcal/h)、累積食餌(g)、累積飲水(g)、XY総活動(すべての水平ビーム切断カウント)、XY移動活動(最小の3つの異なる連続的水平ビーム切断カウント)及びZ活動(すべての垂直ビーム切断カウント)。データを30秒サンプリング期間記録する。CLAMSデータを除脂肪体重で標準化することによって分析する。

【0459】

[実施例12]

ヒト骨格筋筋管でのインスリン刺激p-AktへのEno1の効果

精製Eno1のインスリン刺激p-Akt(S473)タンパク質レベルへの効果を、インスリン処置をした又はしていないヒト骨格筋筋管の細胞培養物において決定した。p-Aktタンパク質レベルをELISAによって測定した。図21に示すとおりインスリン処置はEno1処置の不在下でp-Aktタンパク質レベルを増加させ、p-Aktタンパク質レベルへのインスリンの効果はEno1処置をしてもしていなくても同様であった。これらの結果はEno1がp-Aktタンパク質レベルのインスリン刺激に影響を与えないことを示しており、筋細胞でのグルコース取り込みへのEno1の効果がインスリンとは独立しており、インスリン抵抗性を表す細胞において生じることを示唆している。

【0460】

[実施例13]

Eno1はヒト骨格筋筋管におけるグルコース流の増加に関連する

グルコーストランスポーター1(Glut1)及びグルコーストランスポーター4(Glut4)は細胞膜を横切ったグルコースの輸送に関与し、骨格筋内の優勢な促進性グルコーストランスポーターである(Jones et al., 1998, Journal of Applied Physiology, Vol. 84, pp. 1661~1666)。Glut4は細胞へのインスリン制御グルコース輸送を担っている。ミオゲニンはGlut1及びGlut4発現を制御することに関与する可能性がある筋肉特異的転写因子である(上のJones et al.を参照されたい)。ヘキソキナーゼ2(HK2)はグルコースをリン酸化しグルコース-6-リン酸(G6P)を形成する、骨格筋における主なヘキソキナーゼである。

【0461】

Eno1処置された又はされていないヒト骨格筋筋管の細胞培養物においてGlut1、Glut 4、HK2及びミオゲニンの発現を測定した。筋管を、実施例2に記載のとおり調製した精製En

olで処置した。Glut1、Glut4、HK2及びミオゲニンmRNAレベルを定量的PCRによって決定した。Glut1タンパク質レベルをMSプロテオミクス分析によって決定した。図22A及び22Bに示すとおりEno1処置は、Glut1、Glut4及びHK2 mRNAレベル並びにGlut1タンパク質レベルを増加させた。これらのタンパク質がグルコース輸送及び代謝に関与することから、これらの結果は、Eno1処置が骨格筋でのグルコース流の増加と関連していることを示唆している。

【0462】

グルコース流におけるEno1の役割をさらに調査するために、G6P及びホスホエノールピルベート(PEP)レベルを精製Eno1で処置された又はされていないグルコース欠乏及びグルコース刺激ヒト骨格筋筋管で測定した。グルコース欠乏を、筋管をグルコース不含有DMEMで15分間インキュベートすることによって実施した。グルコース刺激を、筋管を5mMグルコースで15分間処置することによって実施した。G6P及びPEPレベルをBiovision(Milpitas、CA;カタログ番号K657-100及びK365-100)からのアッセイキットを使用して測定した。図23及び24に示すとおりEno1処置は、グルコース欠乏及びグルコース刺激ヒト骨格筋筋管の両方においてG6P及びPEPレベルを増加させ、さらにEno1処置が骨格筋におけるグルコース流の増加と関連していることを示唆している。

【0463】

[実施例14]

Eno1の作用様式

グルコース取り込みにおけるEno1の作用様式をさらに調査するために、酸素消費速度(OCR)及び細胞外酸性化速度(ECAR)をヒト骨格筋筋管細胞において測定した。OCRはミトコンドリア呼吸の指標であり、ECARは解糖の指標である。

【0464】

OCR実験について種々の化合物をOCRにおける変化を誘発するために細胞に連続的に加えた。例えばパルミチン酸及びカルボニルシアニドm-クロロフェニルヒドラゾン(CCCP、酸化的リン酸化の脱共役剤)を、OCRを増加させるために加え、エトモキシル(脂肪酸酸化阻害物質)を、OCRを減少させるために加えた。KHB緩衝液(pH7.4)を各ウェルに加え、測定を2分間の測定間混合を行いながら3分ごとに実施した。BSAコンジュゲートパルミチン酸(最終濃度200mmol/L)、CCC(最終濃度2 μ M)及びエトモキシル(最終濃度50mmol/L)を連続的に注射した。図25に示すとおりEno1処置はOCRを増加させた。これらの結果は、Eno1処置がヒト骨格筋筋管においてミトコンドリアの遊離脂肪酸酸化の増加と関連していることを示している。

【0465】

基質としてグルコースを用いるECAR実験のために、炭酸ナトリウム及びグルコース/ピルベート不含有DMEMを使用した。グルコース、オリゴマイシン及び2-DGを25mmol/Lの最終濃度を与えるように連続的に注入した。図26に示すとおりEno1処置はECARを増加させ、このことはEno1処置が解糖活性及び解糖能力の増大に関連していることを示している。

【0466】

Eno1で処置したヒト骨格筋筋管のミトコンドリア含有量を決定するために、筋管を500 μ g/ml又は1000 μ g/ml Eno1で48時間処置し、次いでMitotracker green(Invitrogen)(緑色蛍光ミトコンドリア染料)を加えた。15分間の染色後、筋管をトリプシン処理し、洗浄し、ミトコンドリア含有量を決定するためにフローサイトメトリーに供した。図27Aに示すとおり、Eno1処置はミトコンドリア含有量に影響を与えない。

【0467】

ミトコンドリアのROSも上に記載のEno1処置ヒト骨格筋筋管において検出した。ミトコンドリアのROSを、ジヒドロローダミン123(Life Technologies)で細胞を処置することによって決定した。ジヒドロローダミン123(Life Technologies)は、膜を通して受動的に拡散でき、そこで、ミトコンドリアに局在し緑色蛍光を示すカチオン性ローダミン123に酸化される、無電荷及び無蛍光反応性酸素種(ROS)指標である。次いで筋管をトリプシン処理し、洗浄し、フローサイトメトリーに供した。ヒト骨格筋筋管のEno1での処置はミトコ

ンドリアの反応性酸素種産生に影響を与えなかった(図27B)。

【0468】

これらの結果は、Eno1の作用様式がミトコンドリア含有量又はROS産生における変化によらないことを示している。

【0469】

Eno1について作用様式をさらに調査するために、非リン酸化5'AMP活性化タンパク質キナーゼ(AMPK)及びリン酸化AMPK(pAMPK)レベルを0、500又は1000 $\mu\text{g/ml}$ Eno1で処置した基礎(basal)及び血清飢餓ヒト骨格筋筋管において測定した。基礎ヒト骨格筋筋管を、2%ウマ血清を含有する通常分化培地で処置したが、一方で血清飢餓筋管を、0.5%BSAを含む血清不含有DMEMで、筋管の溶解の前に3時間飢餓状態にさせた。AMPK及びpAMPKレベルをキナーゼのリン酸化又は非リン酸化形態に特異的な抗体を使用してウエスタンブロットによって決定した。ラミンA/Cに特異的な抗体を試料間で均一に投入されていることを確認するために使用した。図28A及び28Bに示すとおり、Eno1処置は基礎又は血清飢餓筋管におけるpAMPKレベルに影響を与えなかった。AMPK活性化又はリン酸化は、例えば筋肉収縮の際に、骨格筋においてグルコース取り込みを制御する主なインスリン非依存経路の1つである。したがってpAMPKレベルへのEno1の影響の欠如は、従来のシグナル伝達を超えるEno1についての新規の作用様式を示唆している。

【0470】

[実施例15]

ヒト骨格筋筋管中のEno1結合パートナー

Eno1に対する作用様式をさらに調査するために、Eno1の結合パートナーを未処置ヒト骨格筋筋管(内在性Eno1を含有している)及び50 $\mu\text{g/ml}$ 又は100 $\mu\text{g/ml}$ の6Xヒスチジンタグ化外来性Eno1で処置したヒト骨格筋筋管において比較した。内在性Eno1をEno1に特異的な抗体を使用して未処置筋管中で免疫沈降させた。外来性Eno1を、6Xヒスチジンタグ抗体を使用して免疫沈降させた。内在性Eno1及び外来性Eno1の結合パートナーを定量的プロテオミクスによって同定し、結合パートナーの正体をウエスタンブロット及び/又は逆免疫沈降によって確認した。

【0471】

ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ(Nampt)が内在性及び外来性Eno1の両方の結合パートナーとして同定された。Namptは、ニコチンアミドからのニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)の合成を触媒し、筋肉収縮及び分泌に関与する。Eno1は図29に示すとおり解糖複合体の一部としてのNamptと相互作用しうる。

【0472】

[実施例16]

Eno1とNamptとの相互作用

Nampt活性を、分化培地中500 $\mu\text{g/ml}$ 又は1000 $\mu\text{g/ml}$ Eno1で48時間処置されたヒト骨格筋筋管において4日間の分化後に決定した。筋管溶解物をCyclex(Nagano、Japan)からのIgG又は抗Nampt抗体(Clone AF-1E12)のいずれかを使用する免疫沈降に供した。免疫沈降した筋管溶解物をCyclex Nampt活性アッセイキット(#CY-1251)を使用するNampt活性アッセイに供した。図30に示すとおりEno1処置はNampt活性を増加させた。Eno1処置はヒト骨格筋筋管においてNampt(eNampt)の分泌も増加させた(データ示さず)。

【0473】

2-DG取り込みを、3時間血清飢餓とし、次いでAbcam (Cambridge、MA)からの組換え細胞外Nampt(eNampt)で処置したヒト骨格筋筋管において測定した。2-DG取り込みをAbcam(カタログ番号ab136956)からの蛍光分析グルコース取り込みアッセイキットを使用して測定した。図31に示すとおり、eNamptの添加は2-DG取り込みを増加させた。

【0474】

Eno1誘発グルコース取り込みにおけるNamptの役割を決定するために、ヒト骨格筋筋管をEno1で48時間、上に記載のとおり処置し、Nampt阻害物質FK866をEno1処置の開始24時間後に加え、合計FK866処置時間は24時間とした。2-DG取り込みを上に記載のAbcamグルコー

ス取り込みアッセイキットを使用して血清飢餓3時間後に測定した。図32に示すとおり、FK866によるNampt阻害はEno1誘発グルコース取り込みを消失させた。この結果はNamptがEno1誘発グルコース取り込みにおいて役割を果たしていることを示している。

【0475】

等価物

当業者は、本明細書に記載の具体的な実施形態及び方法についての多数の等価物を認識する又は日常を超える実験を使用することなく確認できる。そのような等価物は次の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

【0476】

参照による組み込み

本出願において参照される各参考文献、特許、特許出願及びGenBank番号は、各参考文献が個々に組み込まれるのと同様に参照により本明細書に組み込まれる。

【0477】

配列の説明

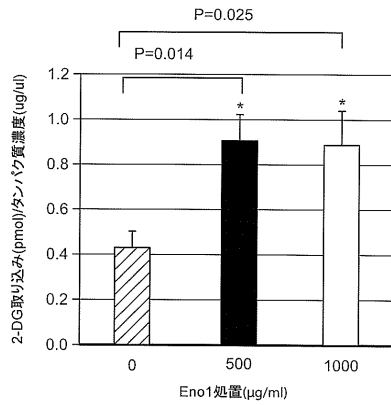
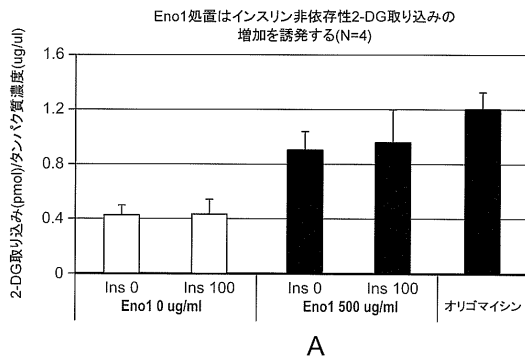
配列番号	配列	説明
1	DNA	ヒト Eno1、転写物変種 1
2	AA	ヒト Eno1、転写物変種 1
3	DNA	ヒト Eno1、転写物変種 2
4	AA	ヒト Eno1、転写物変種 2、c-myc プロモーター結合タンパク質-1(MBP-1)とも称される
5	DNA	ヒト Eno2
6	AA	ヒト Eno2
7	DNA	ヒト Eno3、転写物変種 1。Eno3 のアイソフォーム 1 をコードする
8	DNA	ヒト Eno3、転写物変種 2。Eno3 のアイソフォーム 1 をコードする
9	AA	ヒト Eno3、アイソフォーム 1
10	DNA	ヒト Eno3、転写物変種 3。Eno3 のアイソフォーム 2 をコードする
11	AA	ヒト Eno3、アイソフォーム 2

10

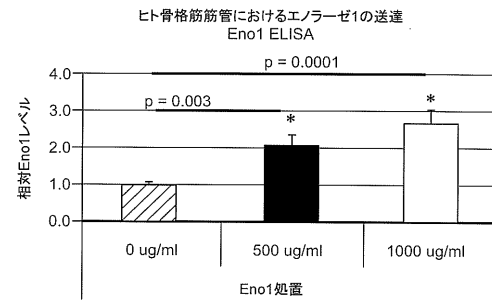
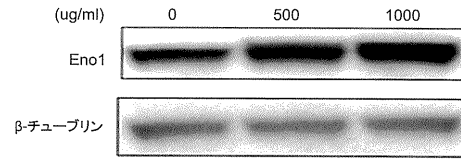
20

30

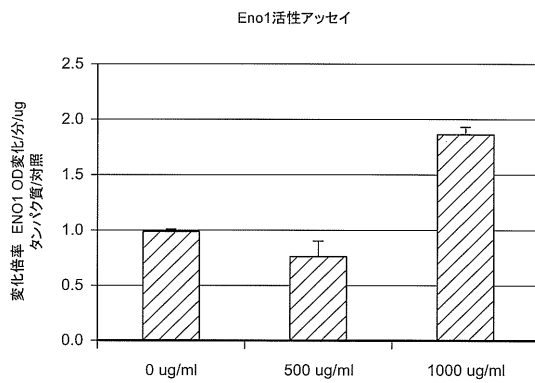
【図 1】



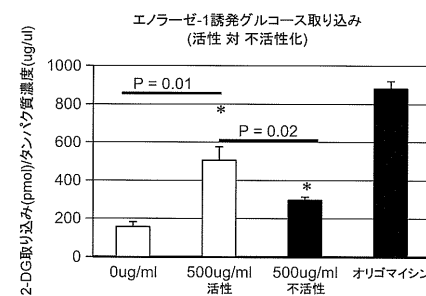
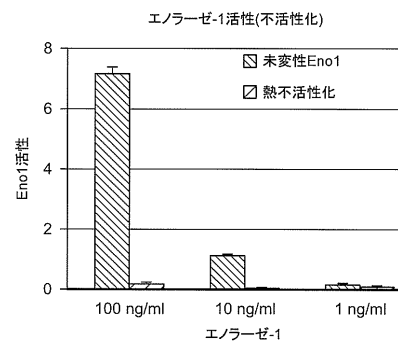
【図 2 - 1】



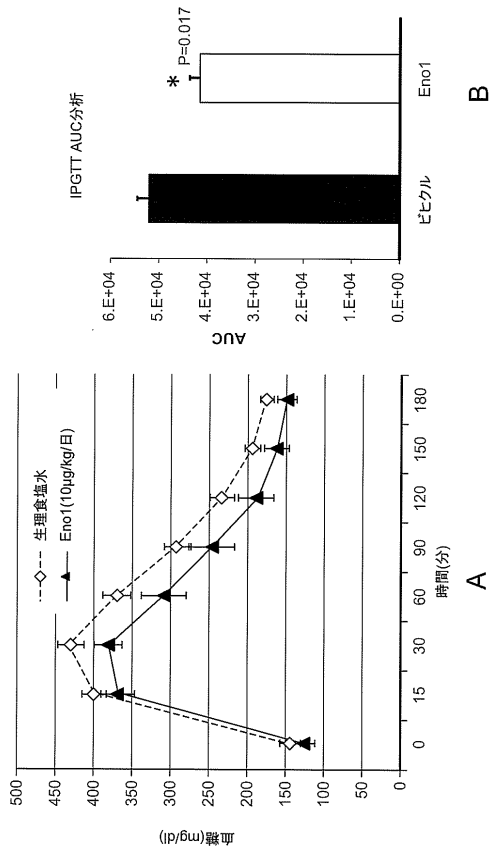
【図 2 - 2】



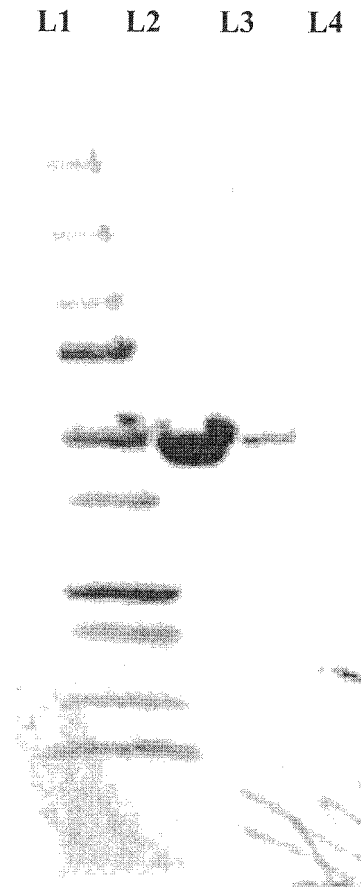
【図 3】



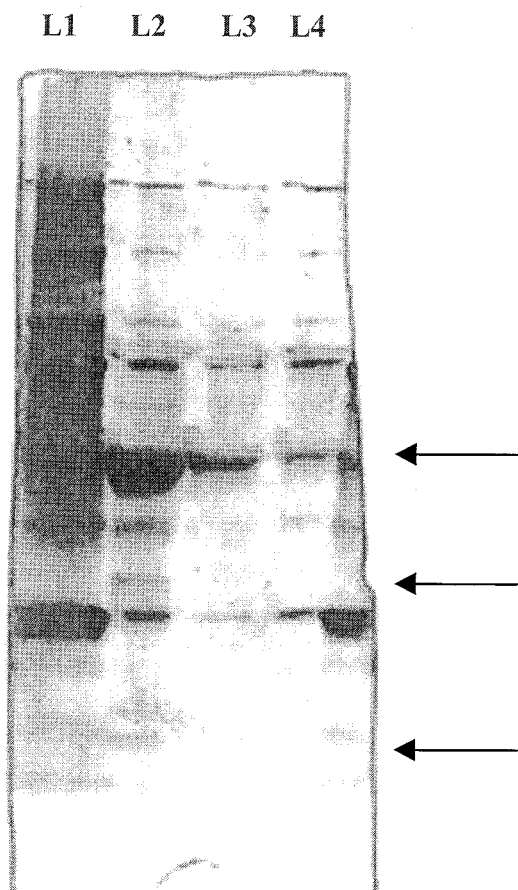
【図 4】



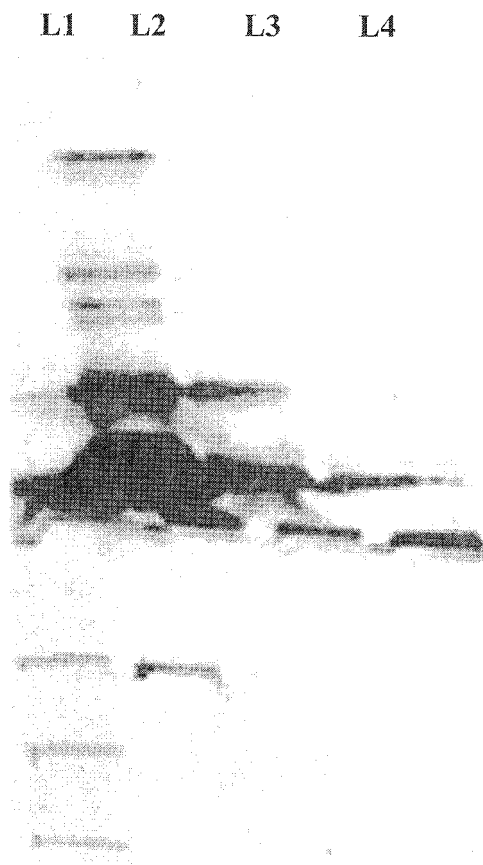
【図 5】



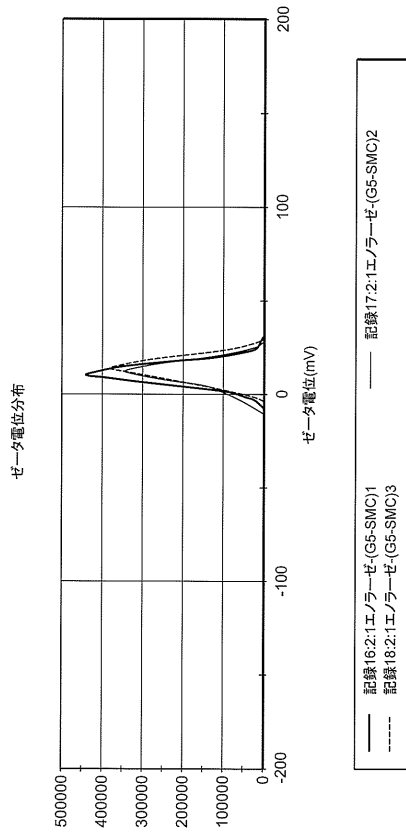
【図 6】



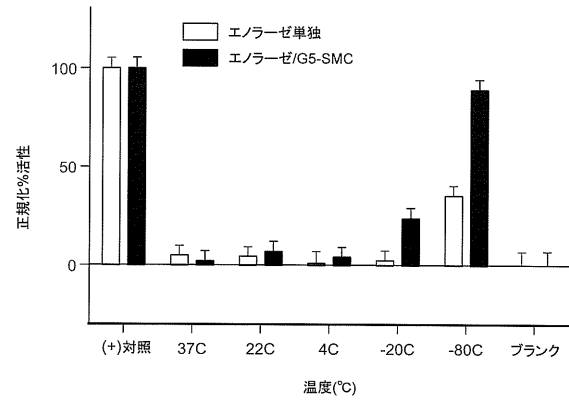
【図 7】



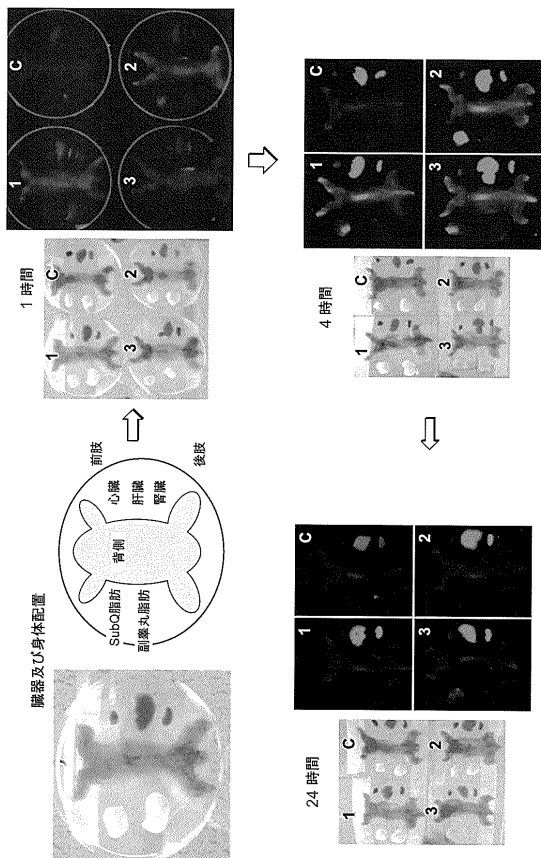
【図 8】



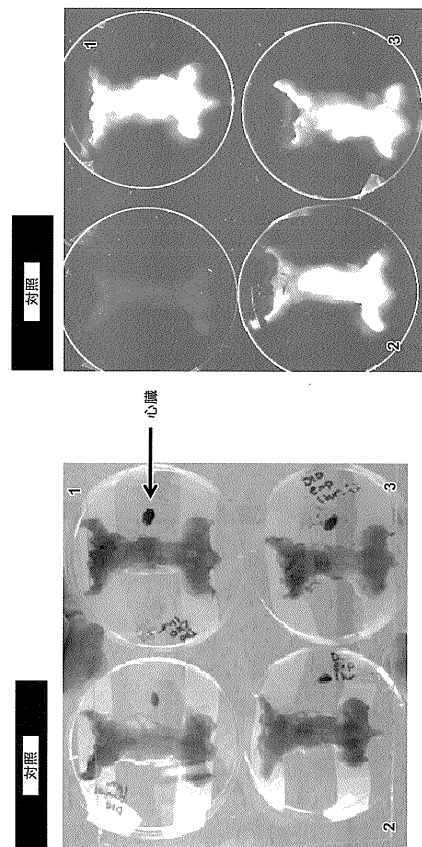
【図 9】



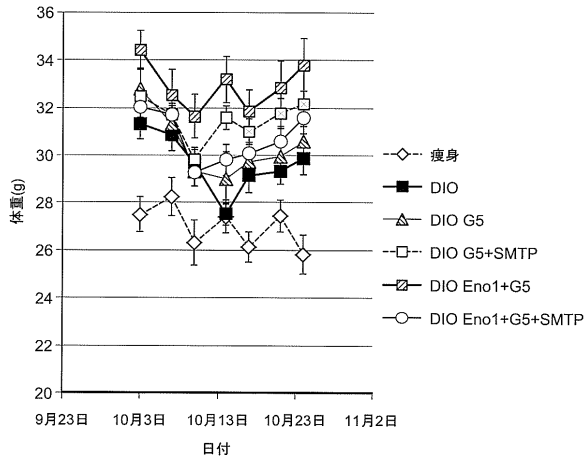
【図 10 A】



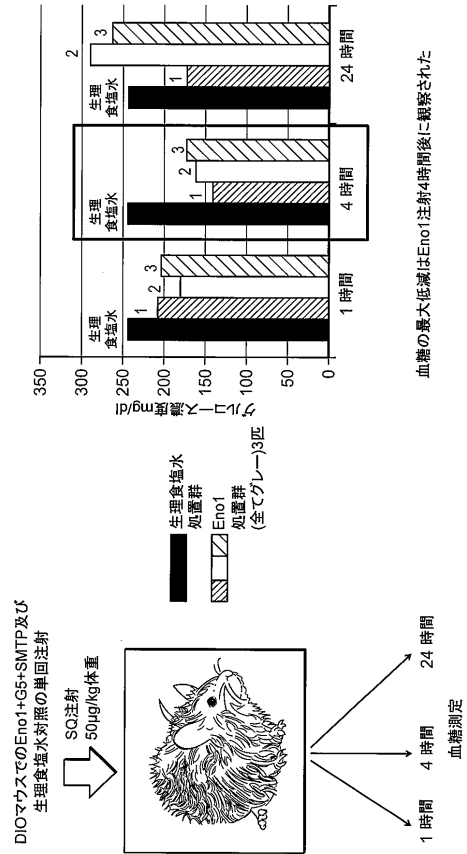
【図 10 B】



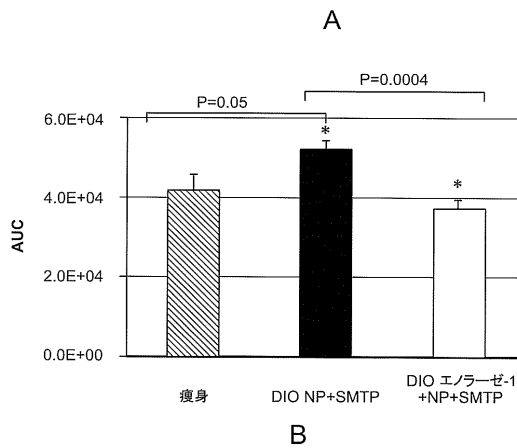
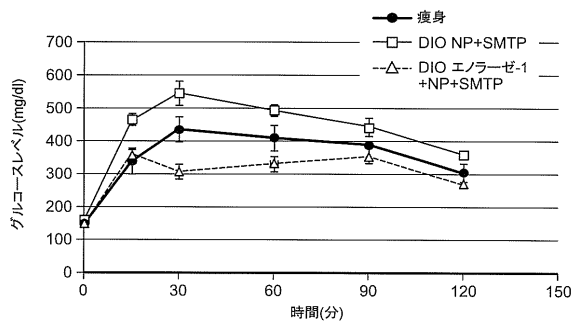
【図 1 1】



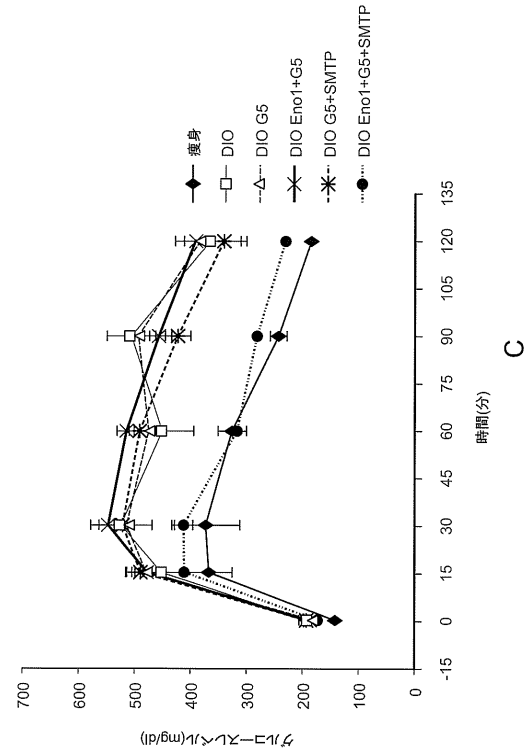
【図 1 2】



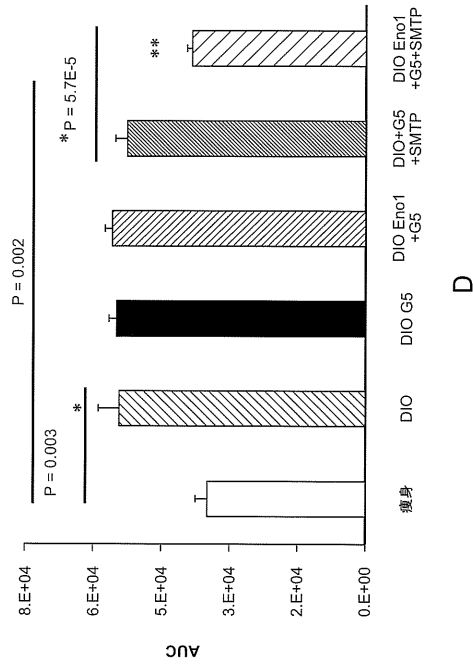
【図 1 3 - 1】



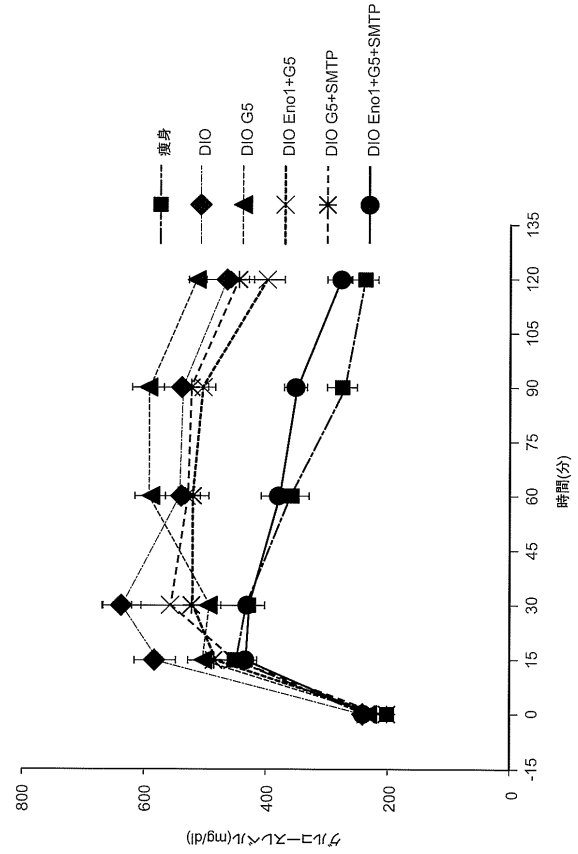
【図 1 3 - 2】



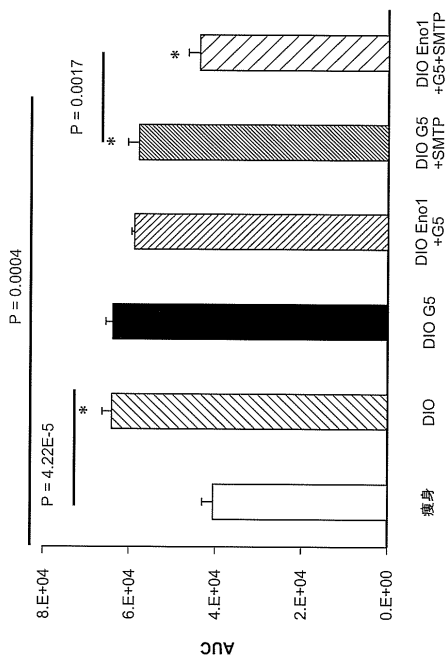
【図 1 3 - 3】



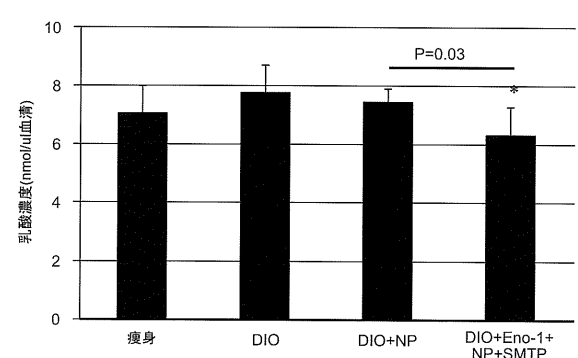
【図 1 4 A】



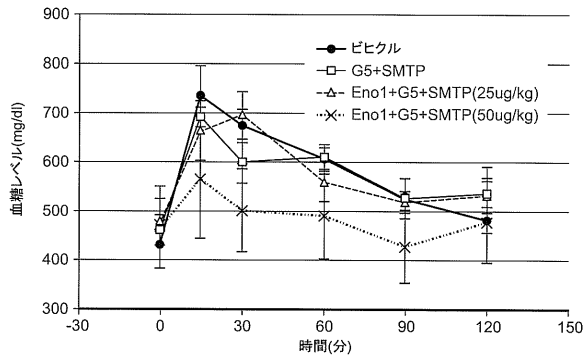
【図 1 4 B】



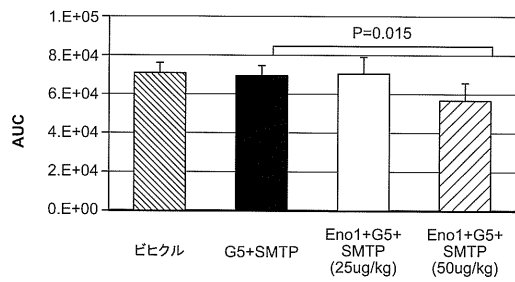
【図 1 5】



【図 16】

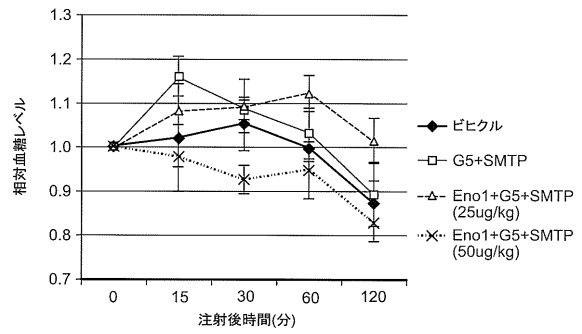


A

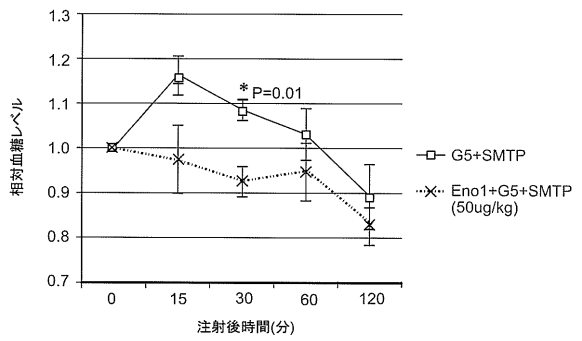


B

【図 17】

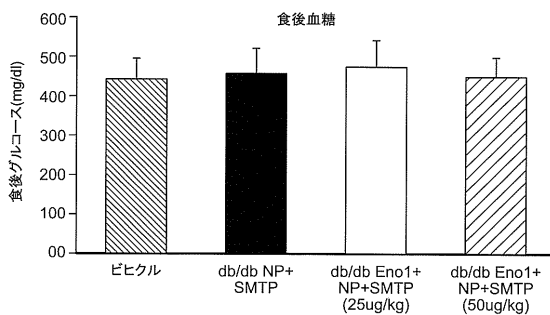


A

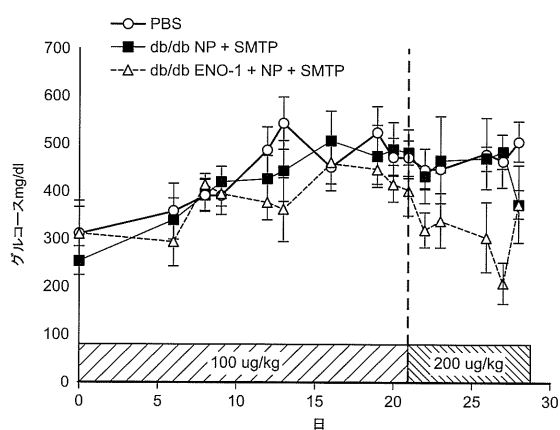


B

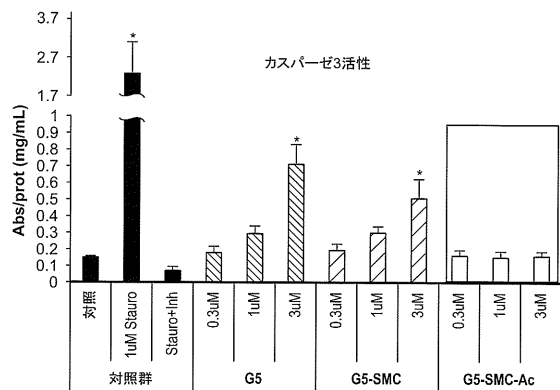
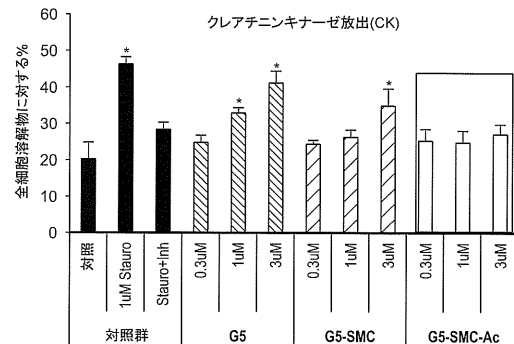
【図 18】



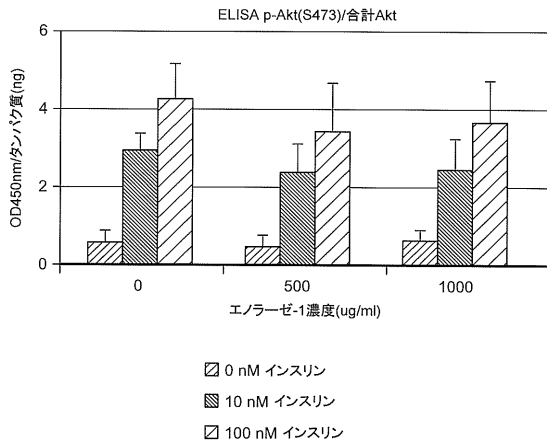
【図 19】



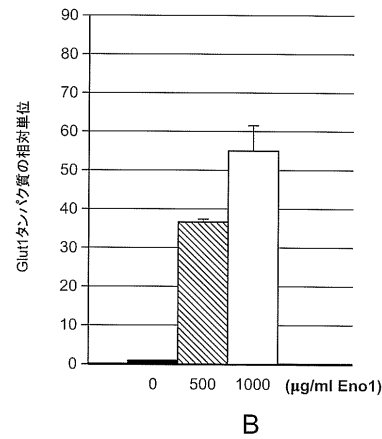
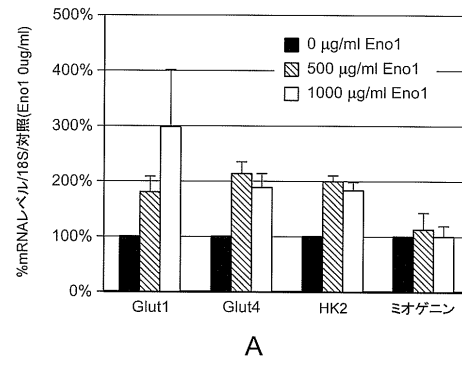
【図 20】



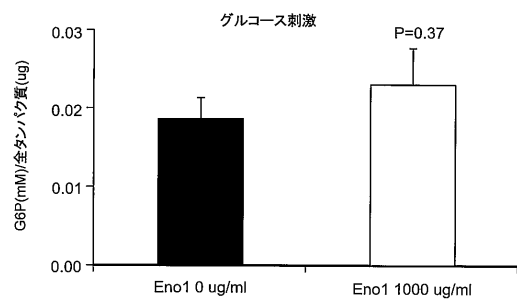
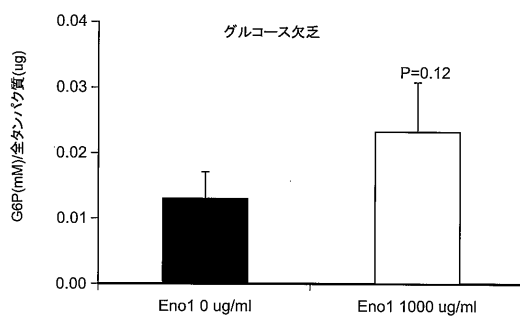
【図 2 1】



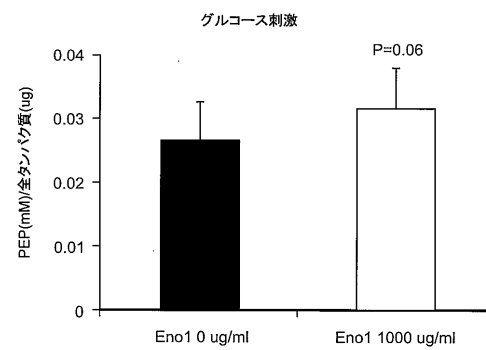
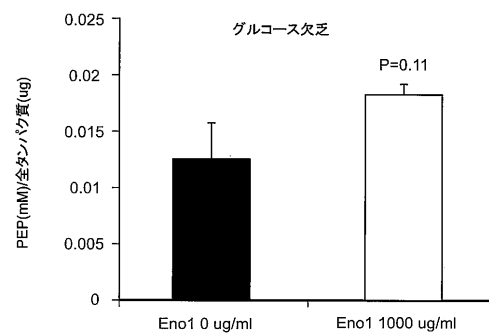
【図 2 2】



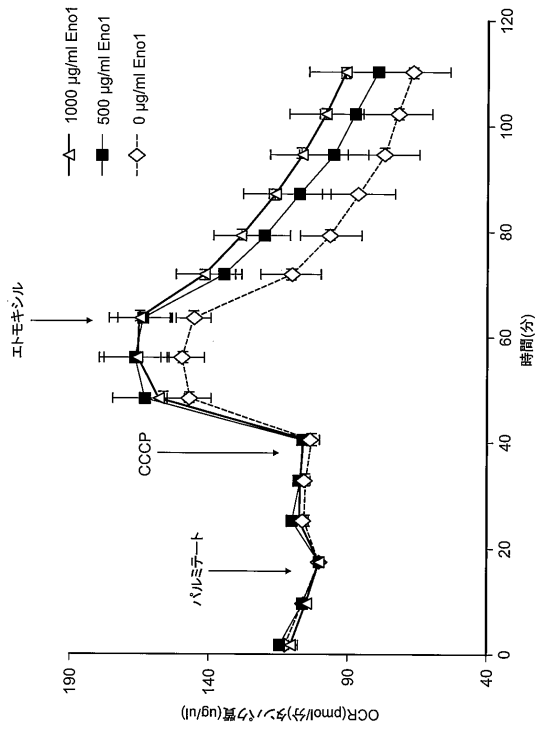
【図 2 3】



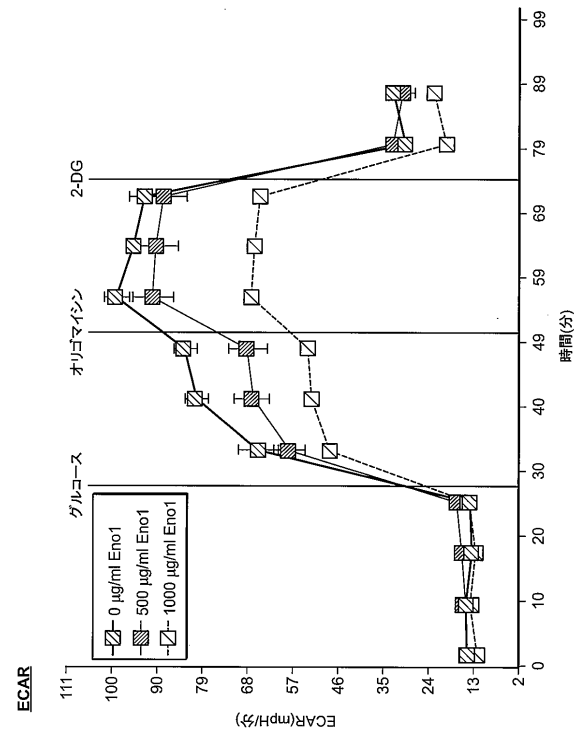
【図 2 4】



【図 25】

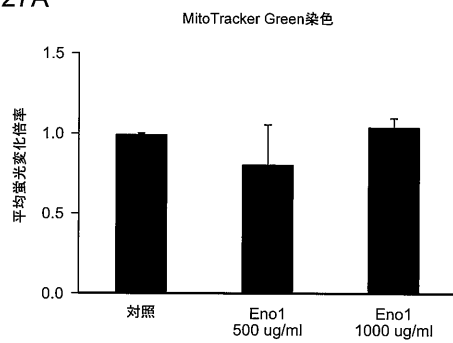


【図 26】

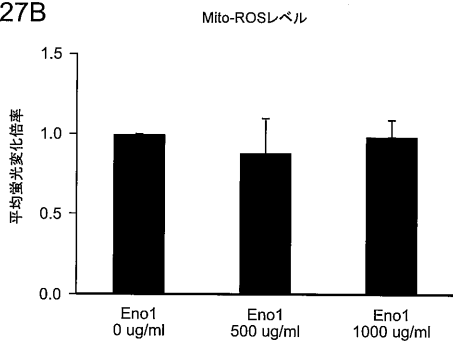


【図 27】

27A

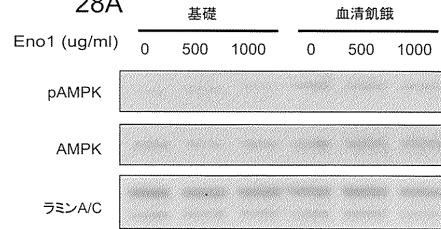


27B

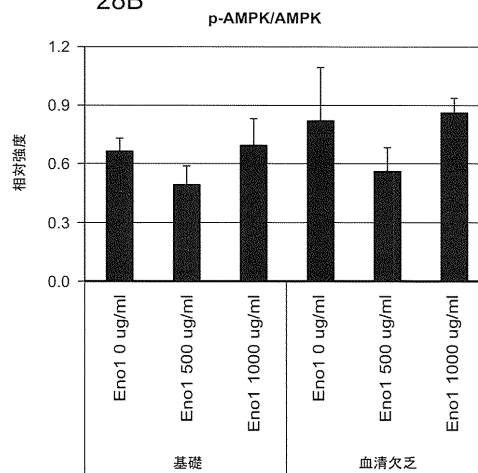


【図 28】

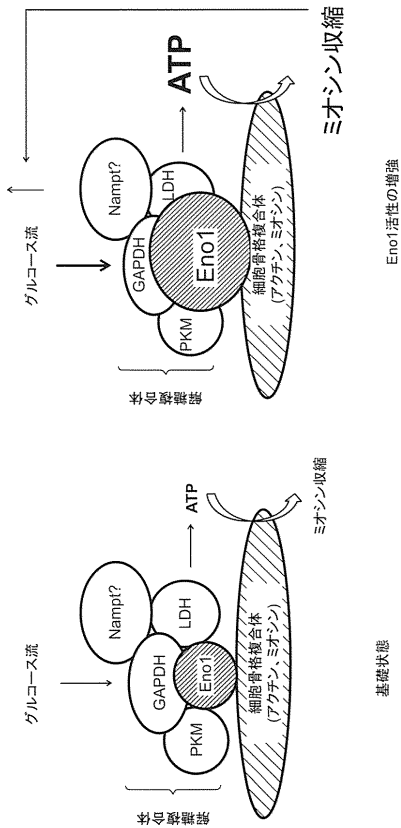
28A



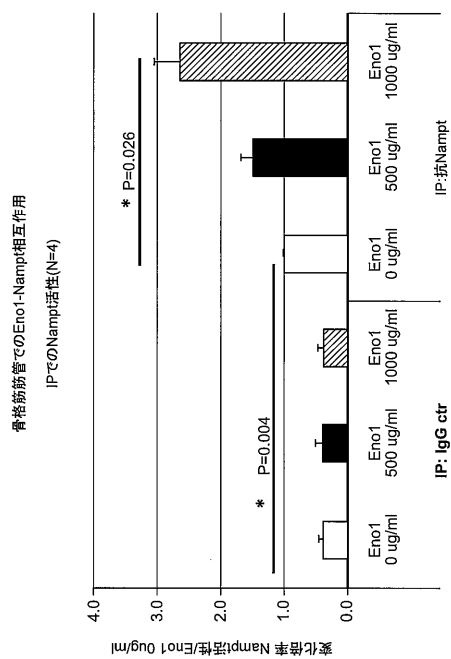
28B



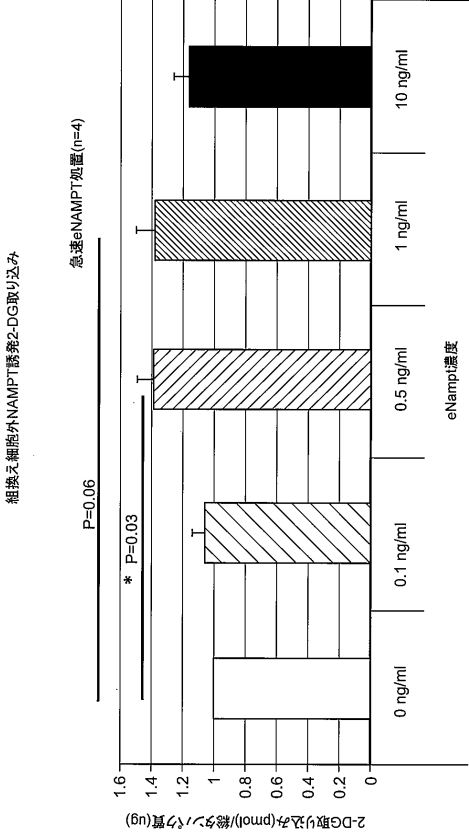
【図 29】



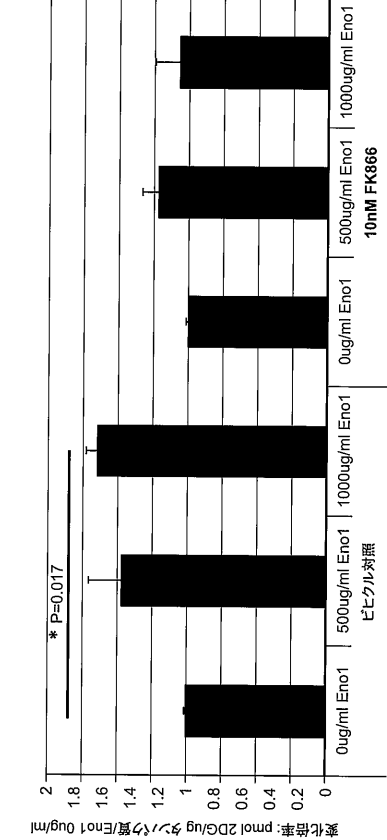
【図 30】



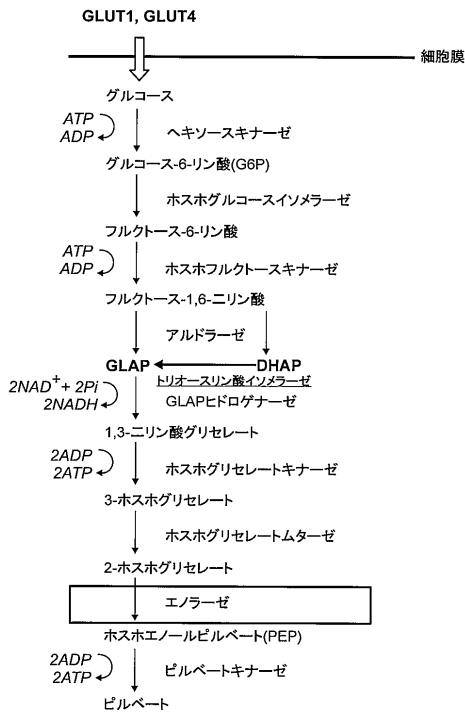
【図 31】



【図 32】



【図 3 3】



【図 3 4 - 1】

34A

LOCUS NM_001428 2204 bp mRNA 直鎖 PRI 10-JAN-2014

DEFINITION ホモサピエンス(Homo sapiens)エノラーゼ1、(アルファ)(ENO1)、転写物変種1、mRNA

ACCESSION NM_001428 NM_005945

VERSION NM_001428.3 GI:319996653

```
1 msilkihaze ifdsergnptv evdlftskgl fraavpegas tgiyealelr dndktrymgk
61 gvskavehin ktiapalvsk klnvtegeki dklmiemdtg enkskfana ilgvsalvck
121 agavekgvpl yrhiadlagn sevillpvapf nvinggshag nklamgefmi lrvgaanfre
181 amrigaevyhn nlknvikeky gkdatnvqde ggfapnilen kegllellkta igkagytdkv
241 vigmdvaase ffragkydld fksppddpery ispdqladly ksfxikdyppv siedpfdqdd
301 wgawgkftas agiqvvvddl tvtnpkriak avnekscncl llkvnigisv teslqackla
361 gangwgvnmvs hrsgetedtf iadlvvgict gqiktgapcr serlakynql lrieeelgsk
421 akfagrnfmr plak
```

【図 3 4 - 2】

34B

LOCUS NM_001428 2204 bp mRNA 直鎖 PRI 10-JAN-2014

DEFINITION ホモサピエンス(Homo sapiens)エノラーゼ1、(アルファ)(ENO1)、転写物変種1、mRNA

ACCESSION NM_001428 NM_005945

VERSION NM_001428.3 GI:319996653

```
1 gtggggccccc agagcgaagc tgagtgogtg cgggactcgg agtaagtga ggaagcccgga
61 gctctcatgc cggcccaagc gccccgggccc atcccccgga gccccggctc cgcacacccc
121 agttcggctc accggctccta tctggggccca gagttctggc cgcaccaacta caggggcgcct
181 ggggagtcgg ggccccccag atctgcggcg ctcaagtccg cgggagtgca ccccccttte
241 cagcgtactg cagcgcctgc agtccacccc ctttcggga ggtgagggaa tgagtgacgg
301 ctctcccgac gaatggcgag gcggagctga gggggcgctg cccggaggcg ggaagtgggt
361 ggggctcgcc ttagctaggc aggaagtccg cgcgggcggc gcggacahta tctgtgggta
421 cccggagcac ggaagatctg ccggctttac gtccacctcg gtgtctgac caccctccgc
481 ttctctctct aggcgacgag acccagtggc tagaagttca ccatgtctat tctcaagatc
541 catgccaggg agatctttga ctctcgggg aatcccaactg ttgaggttga tctcttcacc
601 tcaaaaggct tcttcagagc tgcgtgtccc agtgggtgct caactgggat ctatgaggcc
661 cttagagctcc gggacaatga taagactcgc tatatgggga aggggtgtct aaaggctgtt
721 gagcacatca ataaaactat tgcgcctgcc ctgggttagca agaaactgaa cgtcacagaa
781 caagagaaga ttgacaaact gatgatcgag atggatggaa cagaaaataa atctaaagttt
841 ggtgcgaagc ccattctcgg ggtgtccctt gcgctctgca aagotgggtg cgttgagaag
901 ggggtccccc tgtaacggca catcgctgac ttggctggca actctgaagt catootgcca
961 gtccccggct tcaatgtcat caatggcggt tctcatgctg gcaacaagct gggccatgcag
1021 gagttcatga tctccaccgt cggtgacgca aacttcaggg aagccatgag cattggagca
1081 gaggtttacc acaacttgaa gaatgtcatc aaggagaagt atgggaaaga tgccaccaat
1141 gtgggggatg aaggcgggtt tgctcccaac atcctggaga ataaagaagg cctggagctg
1201 ctgaagactg ctattgggaa agctggctac actgataagg tggctatcgg catggacgta
1261 gcggcctccg agttcttcag gtctggggaag tatgacctgg acttcaagtc tcccgatgac
```

【図 3 4 - 3】

34B (続き)

```
1321 cccagcaggt acatctcgcc tgaccagctg gctgacctgt acaagtcctt catcaaggac
1381 taccacagtg tgctatcga agatcccttt gaccaggatg actggggagc ttggcagaag
1441 ttcacagcca gtgcaggaat ccaggtagtg ggggatgac tcacagtgac caaccacaag
1501 aggatcgcca aggcctgtaa cgagaagtcc tgcaactgcc tctcgtcaa agtcaaccag
1561 attggctcgg tgaccagtc tcttcaggcg tgcaagctgg cccaggccaa tggttggggc
1621 gtcctgggtg ctcatogtgc gggggagact gaagatacct tcatcgctga cctggttgtg
1681 gggctgtgca ctgggcagat caagactggt gcccttgcc gatctgagcg cttggccaag
1741 tacaaccagc tctcagaat tgaaggagag ctgggcagca aggctaagtt tgccggcagg
1801 aacttcagaa accccttggc caagtaagct gtgggcagga aagcccttcg gtcacctgtt
1861 ggotacacag acccctcccc tcgtgtcagc tcaggcaagt cgaggccccc gaccacaact
1921 tgcagggggt cctgctagtt agcgcocccac cgcctggag ttctgacgc ttccttagaa
1981 ctctacaga agccaagctc cctggagccc tgttggcagc tctagctttg cagctcgtga
2041 attggcccaa gtcattgttt ttctgcctc accttcaccc aagtgcttag agtcatgtga
2101 gcctcgtgct atctcggggg tgccacacagg cttagatcccc ggtggttttg tgcataaaat
2161 aaaaagcctc agtgaccatc gagaataaaa aaaaaaaaaa aaaa
```

【図 3 5 - 1】

35A

LOCUS NP_001188412 341 aa 直鎖 PRI 10-JAN-2014

DEFINITION c-mycプロモーター結合タンパク質-1アイソフォームMBP-1[ホモサピエンス(Homo sapiens)]

ACCESSION NP_001188412

VERSION NP_001188412.1 GI:319996655

```
1 niemdgtcnk skfganailg vslavckaga vekgvplyrh iadlagmnev ilvpafnvi
61 nggshagnkl amgefmlpv gaanfreamr igaevyhnk nvikekygkd atnvdegdggf
121 apnlenkeg lellktaigk agytdkvvrg mdvaaseffr sgkydlldfks pddperyisp
181 dqladlyksf ikdypvvsie dpfdqddwga wqkftasagi qrvvgdltvt npkriakavn
241 ekscnclllk vnqigsytes lqacklaqan gwgvmvshs getedtfiad lvvgltcgql
301 ktgaprcrser lakynqliri eeelgskakf agrnfrnpla k
```

【図 3 5 - 2】

35B

LOCUS NM_001201483 2567 bp mRNA 直鎖 PRI 10-JAN-2014

DEFINITION ホモサピエンス(Homo sapiens)エノラーゼ1、(アルファ)(ENO1)、転写物変種2、mRNA

ACCESSION NM_001201483

VERSION NM_001201483.1 GI:319996654

```
1 aactaaagaa aagtttcccc atctcccagg agggttctgt gggccctcca gagatcatca
61 gcctcttcaac gggctagaaa ggcattccagg aaggtctaac caatgacctg ccoctgaatgg
121 tgagctgcag gtgtgtcatt tagtgtgatt ttectgttga ctgactcata ggaagccctgc
181 tctgtggcag agctagcctc tggctgtatt caaattgact tagtgtgtgt gcaacattga
241 cctttctaga gatagaaact gtggcgaact tacagaaaag caoatagggc tagatcaagc
301 attctcagtg gggcaccggg aaaaactcaa aaaggctgca gggagggggac aatgatgaaa
361 tcaggttgtg aaacactggg ctgggtctgc agtgggtggt ctgggtgttc agtcccgttt
421 taatgtctga agaagcactc tacacacacg aacatgttac catttgacgg ttgtttaatg
481 gcgtacgtgg ggaactagcc ggagcaggat gatgtctgtc cttgatggta atgatgtgtc
541 agtaagtaag catttgtgga agattgaaag catggccctc gaatgtctct cctctgcttt
601 cctgcccctc cactgtctct caactcgagt ccttaaatca cggttctctt ctgagttctt
661 ctcatitttc cttctttcac ctctgtctgg cagggtctct cagaccattt aagtatatta
721 atgagttcct ggcaccacgc ctgtgctact aggttaactg ttgaacagcc tttagtctgc
781 agttggcgtt tccagtgcat ggttctgcaa actaaacctc agtcagatcg ttctgagcca
841 gctgctgttt tgtgtgcttc taacctcttg gggctcctag taggagcact cagactgggc
901 cggaaaagtc tccagttctg gggggaaaag ggagaggggg aagaggtccc acagaaggtc
961 ccttggtggg cttccgcgtc ggcctcaaca gtggttctct ctaacaatgc tgetcaagcc
1021 tgttttaaag ttaatgtcag taatttgatt tgattgttcc ttccaggtgt ctcaaaaggct
1081 gttgagcaca tcaataaaaac tattgcgcct gccctggtta gcaagaaact gaacgtcaca
1141 gaacaagaga agattgacaa actgatgatc gsgatgggat gaacagaaaa taaatctaag
1201 ttgggtgoga acgcctattc ggggggtgct cttgcctctc gcaaagctgg tgccgttgag
1261 aaggggggtc cccgtgacgc ccacatogct gacttgcgtc gcaactctga agtcaatcctg
```

【図 3 6 A】

LOCUS NM_001975

2423 bp mRNA 直鎖 PRI 18-MAY-2014

DEFINITION ホモサピエンス(Homo sapiens)エノラーゼ2[ガンマ、神経細胞](ENO2)、mRNA

ACCESSION NM_001975

VERSION NM_001975.2 GI:16507966

```
1 acccgcgctc gtacgtggcg ctccggcggc agctctcgac tcatcggggg ctccgggtca
61 catgcgcccg cggcgcccta tagggcgctc ctcccggcgc cgccggggag ccgcagccgc
121 cgccgccact gccactcccg ctctctcagc gcgcgcgtcg ccacgcgcac cgccacgcgc
181 actaccacgc tctgagttct cagtcgccag atccccagca tcatgtccat agagaagatc
241 tgggcccggg agatctggga ctcccggggg aaccccacag tggaggtgga tctctatact
301 gccaaaggtc ttttccgggc tgcagtgcgc agtggagcct ctacgggcat ctatgaggcc
361 ctggagctga gggatggaga caaacagcgt taactaggca aaggtgtcct gaaggcagtg
421 gaccacatca actccacact cgggcgcagc ctctctcagc caggtctctc tctgttgagg
481 caagaagaac tggacaacct tgcagctggg ttgatgggga ctgagacaaa attccaaagtt
541 gggggcaaat ccatctcggg tctgtctctg ccctgtgtga aggcaggggc agctgagcgg
601 gaactgcccc tgatatgccca caatgtccag ctggccggga actcagacct catcctgcct
661 gtgcgcggct tcaacgtgat caatgtgggc tctcatgtcg gcaacaagct ggccatgcag
721 gagttcatga tctctccagt gggagctgag agctttccgg atgcocatgc actaggtgca
781 gaggtctaac atacactcaa gggagctcac aaggacaaat acggcaagga tggccaaact
841 gtgggggaat aagtggtgtt tggccccaat atcctggaga acagtgaagc cttggagctg
901 gtgaagggaag ccatcgacaa ggcgtgcata acggaaaaga tctgtatttg catggatgtt
961 gctgcctcag agttttatcg tgatggcaaa tatgactgtg acttcaagtc tcccaactgat
1021 ccttcccgat acatcaactg ggaccagctg ggggcactct accaggactt tgcacaggac
1081 tatectgtgg tctcaattga ggaacctatt gacacagatg attggctgcg cctgctcaag
1141 ttcacagcca atgtagggt caagattgtg ggtgatgacc tgcaagtga ccacccacaa
1201 cgtattgagc gggcagtgga agaaaaggcc tgcaactgtc tgcgtctcaa ggtcaaccag
1261 atcggtctcg tcaactgaagc catccaagcg tgcaagctgg cccaaggaaa tggctggggg
1321 gtcatgggca gtcatcgctc agggagagac gaggagacat tcaattgcta cctggttggtg
1381 gggctgtgca cagcgcagat caagactggt gccccgtgcc gtcttgaaag cctggctaaa
1441 tacaacacag tcatgagaat taggagaag ctggggatgt aagctgctt tgcgcagact
1501 aacttcogta atccagctg tctgtgattc ctctgtctgc ctggagacgt ggaactctga
1561 tctcatctcc ctggaacctt gctgtcctga tctgtgatag ttoacccctc gagatccctc
1621 gagcccccag gtcgccagaa cttccctgat tgacctgtct cgctgtccct tggcttaact
1681 gacctcttgc tgtctctgct cgccctactt tctgtgcctc actcaattgg gtctccgaact
1741 tteccacttc tctcttctct ttctctcttc ctcagaaaac tagaaattgt aatgagattt
1801 attataaaag ggggtccgtg gaagaatgat cagcatctgt gatggggagc tcagggttgg
1861 tgtgtcggg tgtgtagag ggaacatgtg tcaactgttc tctgtcttgc tcccacgttg
1921 cttccacttt gcatatggc cgtgaaactg gcaatagcgt ggaatggagg ggaatttatg
1981 gcatgtgcat agccttgctc aataaggctt tagtgtattt atttatttat ttattttatt
2041 tgtttttcat tcatccactt caatacttcc ccaataactca atggcctaaa actgcctga
2101 cttgggggaa cgtatgtctc gtatttcatg ttgctgtaga tcccaagatg actggggtgg
2161 gaggtcttgc tagaatggga aggtctaatg aaaggccctc gacatcagtt ctttgtgtg
2221 tactcaacta agctcgtgct ggtccaagag ggaagctgtg tgcctggggg agttttcctc
2281 tatcatcttc tcccacacct taggttccct ttcttctctc cagctgcacc agagaaacct
2341 cttcaactcc atgcacagtc ccaactgtgc caccacacct gtggcatgta aatgagcaac
2401 tccattaaag tctgatcag tgc
```

【図 3 5 - 3】

35B (続き)

```
1321 ccagtcccgg cgttcaatgt catcaatggc ggttctcatg ctggcaacaa gctggccatg
1381 caggagttca tgatctccc agtcggtgca gcaaaactca ggaagcccat gcgcattgga
1441 gcagagggttt accacaacct gaagaatgtc atcaaggaga aatatgggaa agatgcaccc
1501 aatgtggggg atgaaggcgg gtttgcctcc aacatcctcg agaataaaga aggcctggag
1561 ctgtgaaga ctgctattgg gaaagctgga tacactgata agtgggtcat cggcatggac
1621 gtacggcct ccgagttctt caggtctggg aagtatgacc tggactcaa gtctcccgat
1681 gaccccaaga ggtacatctc gcctgaccag ctggctgacc tgtacaagtc cttcatcaag
1741 gactaccag tgggtctcat cgaagatccc tttgaccagg atgactgggg agctttggcag
1801 aagttcaca ccagtgccagg aatccaggta gtggggggat atctcacagt gaccaccca
1861 aagaggatcg ccaaggccgt gaacgagaag tcttgcaact gcctctgctc caaagtcaac
1921 cagattggct ccgtgaccga gtctcttcag gctgcaagc tggcccaggc caatgggttg
1981 ggcgtcatgg tgtctcatcg ttccgggggag actgaagata ccttctatgc tgacctgggt
2041 gtgggggtgt gcaactgggca gatcaagact ggtgcacctt gccgatctga gcgcttgccc
2101 aagtacaacc agctcctcag aattgaagag gagctggggc gcaaggctaa gtttgccggc
2161 aggaacttca gaaaacccct ggccaagtaa gctgtgggca ggcaagccct tcggtcaact
2221 gttggctaca cagacccttc cctcgtgtc agctcaggca gctcgaggcc cccgaccaac
2281 acttgcaagg gtccctgcta gttagcgccc caccgcctg gagtttgtac cgcttctta
2341 gaactctac agaagccaag ctccctggag cctcgttggc agctctagct ttgaagctg
2401 gtaattggcc caagtcaatt tttttctgc ctcaacttcc accaagtgct tagagtcagt
2461 tgagcctcgt gtcactccg gggtgggcac aggctagatc cccggtggtt ttgtctcaa
2521 aataaaaagc ctcaagtacc catgagaata aaaaaaaa aaaaaaa
```

【図 3 6 B】

LOCUS NP_001966

434 aa

直鎖 PRI 18-MAY-2014

DEFINITION ガンマエノラーゼ(Eno2)[ホモサピエンス(Homo sapiens)]

ACCESSION NP_001966

VERSION NP_001966.1 GI:5803011

```
1 msiekware ildsernptv evdlytakgl fraavpssas tgiyealelr dgdkgrylgk
61 gvlkavdhin etiapaless glsvveqekl dnlmleldgt enkskfgena ilgvelavck
121 agaaerelp1 yrhiaglagl sdlilpvpaf nvingshag nklamgefmi lprgaesfrd
181 amrlgaevyh tlkqvikky gkdatnvde gggfnilen sealelvkea idkagytcki
241 vigmdivaee fyrdgkyld fksptdary itgdqisaly qdvrvdyvv sldspfdqdd
301 aaawskftan vgiqlvgdli tvtnpkrier aveekacmcl llkvnglgev tsaiqackla
361 gengwgmwms hregetedtf iadlvrglct gqiktgapcr serlakynql mrlseelgde
421 arfaghnfrzn psvl
```

【図 3 7 A】

LOCUS NM_001976

1536 bp mRNA 直鎖

PRI 04-MAY-2014

DEFINITION ホモサピエンス(Homo sapiens)エノラーゼ3(ベータ、筋肉)(ENO3)、

転写物変種1、mRNA

ACCESSION NM_001976

VERSION NM_001976.4 GI:301897468

```
1 ataaatgcgc agcctgagag ggggtgaagct gacactgtcc cagotgccac ctgactcgg
61 agctccatcc aaacctccag cgaagacatc caaggttcgg tgactctccc agccctgggg
121 gtgggggtag taaaggccat ggccatgcag aaatctttg cccgggaaat cttgactccc
181 aggggcaacc ccacgttgga ggtggaactc cacacggcca agggccgatt ccgagcactc
241 gtgcccaagt gggcttccac gggatctcat gaggtctcgg aactaagaga cggagacaaa
301 ggccgttacc tggggaagg agtccctga gctgtggaga acatcaacaa tactctgggc
361 cctgctctgc tgcaaaagaa actaagcgtt gtggatcaag aaaaagtga caaatttatg
421 attgagctag atggagcga gaataagccc asgtttgggg caactgcact cctgggggtg
481 ccttggccc tggttaagc ggggcagcgt gagaagggg tccccctga ccgcacatc
541 cgaactctcg ctgggaaccc tgacctcata ctcccagtc cagctctcaa tegtataaac
601 gggggctccc atgctggaaa caagctggcc atgcaaggat tcatgattct gctgtggga
661 gccagctcct tcaagggaag catcgcaatt ggcgcagag tctaccaaca cctcaagggg
721 gtcatcaagg ccaagtatgg gaaggatgac accaatgtcg gtgatgaagg ttgcttcga
781 cccaacatcc tggagaacaa tgaggccctg gtggtgctga agacggccat ccaggcggct
841 ggttaccacg acaaggtggt gatcggcatg gatgtggcag catctagatt ctatcgcaat
901 gggagctcag atcttgact caagtcgctc gatgatccc cagggcactc cactggggag
961 agctcggag agctgtataa gagcttataa agaactata ctgtgtctc catcgaaagc
1021 ccttttgacc aggatgactg ggccaacttg acctcttctc tctcgggggt gaacatccag
1081 attgtggggg atgacttgac agtcaccaac cccaagga cgttgagaag
1141 aaggcctgca actgtctgtc gctgaagtc aaccagatcg gctcgtgac cgaatcgatc
1201 caggcgtgca aactggctca gctcaatgc tgggggggtga tggtagacca ccgctctggg
1261 gagactgag acacattcat tgcagacctt tgggtggggc tctgcaagcg acagatccag
1321 actggcgccc cctgcgctgc ggaagctgtg gccaaataca accaaactca gaggatcgag
1381 gaagctcttg actctttgtc gaagctttgt gcaagcaagt tccgtaacct gaaggccaac
1441 tgagagctg gaggctccag gactccactg gacagacca ggtctccag acctgcttc
1501 tgaataaac actggtgcca accagaaaa aaaaaaa
```

【図 3 7 B】

LOCUS NM_053013
1494 bp mRNA 直鎖
PRI 03-FEB-2014
DEFINITION ホモサピエンス(Homo sapiens)エノラーゼ3(ベータ、筋肉)(ENO3)、
転写物変種2、mRNA
ACCESSION NM_053013
VERSION NM_053013.3 GI:301897476

```
1 ataaatgcgc agcctgagag ggggtgagct gacactgtcc cagctgccac ctgactcggc
61 agctccatcc aaacctccag cgaagacatc ccagccatgg ccatgcagaa aatctttgcc
121 cgggaaatct tggactccag gggcaacccc acggtggagg tggacctgca cacggccaag
181 ggcctgattcc gagcagctgt gcccagtggg gcttccacgg gtatctatga ggccttggaa
241 ctaagagacg gagacaaaag ccgctaactg gggaaaaggag tcttgaaggc tctggagaac
301 atcaacaata ctctgggccc tgcctctgct caaaagaaac taagcgttgt ggcataagaa
361 aaagttgaca aatttatgat tgagctagat gggaccogaga ataagtcocaa gtttggggcc
421 aatgccatcc tgggcgtgtc cttggccgtg tctaaggcgg gagcagctga gaaaggggtc
481 cccctgtacc gccacatcgc agatctcgtc gggaaccctg acctcatact cccagtgcca
541 gccttcaatg tgatcaacgg gggctcccat gctggaaaca agctggccat gcaggagttc
601 atgattctgc ctgtgggagc cagctccctc aaggaaagcca tgcgcattgg cgccgaggtc
661 taccaccacc tcaagggggt catcaaggcc aagtatggga aggtatccac caatgtgggt
721 gatgaaggtg gcttcgcacc caacatctcg gagaacaatg agggccctgga gctgctgaag
781 acggccatcc agggcggtcg ttaccacagc aaggttggtg tcggcatgga tgtggcagca
841 tctgagttct atcgcaatgg gaagtacgat cttgacttca agtcgcctga tgatcccgca
901 cggcacatca ctggggagaa gctcggagag ctgtataaga gctttatcaa gaactatcct
961 gtggtctcca tcgaagaccc ctttgaccag gatgactggg ccacttggac ctcttctctc
1021 tcgggggtga acatccagat tgtgggggat gacttgacag taccacaacc caagaggatt
1081 gccacggccg ttgagaagaa ggcttgcacc tgtctcgtgc tgaaggtcaa ccagatcggc
1141 tcggtgacgg aatogactcca ggcgtgcaaa ctggctcagt ctaatggctg gggggtgatg
1201 gtgagccacc gctctgggga gactgaggac acattcattg ctgaccttgt ggtggggctc
1261 tgcacaggac agatcaagac tggcgcctcc tgcgctcgg agcgtctggc caatacaaac
1321 caactcatga gsatcgagga ggcctctggg gacaagtcga tctttgtgg acgcaaggctc
1381 cgtaaccocg agggccaagt agaagctgga ggctccagga ctccactgga cagaccagg
1441 tottccagac ctgcttctcg aaataaacac tggtgccaac caagaaaaaa aaaa
```

【図 3 7 E】

LOCUS NP_001180432
391 aa 直鎖
PRI 26-FEB-2014
DEFINITION Eno3のベータエノラーゼアイソフォーム2[ホモサピエンス(Homo sapiens)]
ACCESSION NP_001180432
VERSION NP_001180432.1 GI:301897479

```
1 mamgkifare ildsergnptv evdlhtakgr fraavpsagas tgiyealelr dgdkgrylgk
61 akfgemallg vslavokaga aekgvplyrh iadlagmpcl ilvpafnvl nggshagmkl
121 amgefmlpw gaasfkeamr igaevrynhk gvikaqykd atnvgdeggf apnilemnea
181 lellktaiga epydkvvig mdvaasefyr nkydlöfks pddparhitg eklgelyksf
241 iknypvvsie dpfddgdwat wtfefsgvni qivgddltvt npkriagave kkaacnlllk
301 vnqigevtes iqacklaqsn gwgvmvshrs gevtedtfiad lvvgltctgi ktgapcrsrx
361 lakynqlmri eeaigdkaif agrkfrnpka k
```

【図 3 7 C】

LOCUS NP_001967
434 aa 直鎖
PRI 04-MAY-2014
DEFINITION ベータエノラーゼ(Eno3)アイソフォーム1[ホモサピエンス(Homo sapiens)]
ACCESSION NP_001967
VERSION NP_001967.3 GI:301897469

```
1 mamgkifare ildsergnptv evdlhtakgr fraavpsagas tgiyealelr dgdkgrylgk
61 gvlkavenin ntlgpallgk klsvvdgkv dkfmieidgt enkskfana ilgvalavck
121 agaasekvpl yrhiadlagm pdlllpvpa f nvinggsbag nklamgefmi lpygassfke
181 amrigaevyh hlkgvikaky gkdatnvgde ggyfnlien nealellkta iqaeypdkv
241 vigmdvaase fyrrngkydlid fksppddparh itgcklgely ksifknypvv siedpfddgd
301 watwtsflsg vniqivgddl tvtnpkriag avekkacnci llkvnqigsv tesiqacklia
361 csngwgvmsv hrsgetedtf iadlvvgltc gqiktgapcr serlakynql mrisealgdk
421 aifagrkrfrn pkak
```

【図 3 7 D】

LOCUS NM_001193503
1365 bp mRNA 直鎖
PRI 26-FEB-2014
DEFINITION ホモサピエンス(Homo sapiens)エノラーゼ3(ベータ、筋肉)(Eno3)、
転写物変種3、mRNA
ACCESSION NM_001193503
VERSION NM_001193503.1 GI:301897478

```
1 ataaatgcgc agcctgagag ggggtgagct gacactgtcc cagctgccac ctgactcggc
61 agctccatcc aaacctccag cgaagacatc ccagccatgg ccatgcagaa aatctttgcc
121 cgggaaatct tggactccag gggcaacccc acggtggagg tggacctgca cacggccaag
181 ggcctgattcc gagcagctgt gcccagtggg gcttccacgg gtatctatga ggccttggaa
241 ctaagagacg gagacaaaag ccgctaactg gggaaaaggag tcttgaaggc tctggagaac
301 ctgggctgtc ccttggcgtg gtgtaaggcg ggaagcagctg agaaggggtc cccctctaac
361 cgccacatcg cagatctcgc tgggaacccct gacctatac tccagtgcc agccttcaat
421 gtgatcaacg ggggtccoca tgctggaaac aagctggcca tgccaggagt catgattctg
481 cctgtgggag ccagctcctt caaggaagcc atgcgcattg ggcgcagggt ctacaccacc
541 ctcaaggggg tcatcaaggc caagtatggg aaggatgcca ccaatgtggg tgatgaaggt
601 ggccttcgac ccaacatctt ggagaacaat gaggccctgg agctgctgaa gacggccatc
661 cagcggtctg gttacocaga caaggtggtg atcggcatgg atgaggcagc atctgagttc
721 tatcgcaatg ggaagtaoga tcttgacttc asgtcgtctg atgatccgc acgcacatc
781 actggggaga agctcggaga gctgtataag agctttatca agaactatcc tgtggtctcc
841 atcgaaagac cctttgacca ggaatgactgg gccacttga cctccttctc ctgggggtg
901 aacatccaga ttgtggggga tgacttgaca gtccaccaac ccaagaggat tgcccgagcc
961 gttgaagaaga aggcctgcac ctgtctgctg ctgaaggtca accagatcgg ctcggtgacc
1021 gaatogatcc aggcctgcac actggctcag tctaaggctc ggggggtgat ggtgagccac
1081 cgcctcgggg agactgagga cacattcatt gctgaccttg tgggtggggct ctgacacgga
1141 cagatcaaga ctgggcctcc ctgcgctcgg gaggctctgg ccaataacaa ccaactcatg
1201 aggatcgagg aggcctcttg ggacaaggga atctttctg ctgacgaagt ccgttaacgg
1261 aaggcccaagt gagaagctgg aggcctcagg actccactgg acagaccagg gtcttccaga
1321 cctgcttctt gaataaaca ctggtgccaa ccaagaaaaa aaaaa
```

【配列表】

20175096900000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/11276

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/17, A61K 38/46, A61P 3/10 (2015.01) CPC - A61K 38/17, A61K 38/46 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 38/17, A61K 38/46, A61P 3/10 (2015.01) CPC - A61K 38/17, A61K 38/46 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 38/43 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) ProQuest; Google Scholar; Google Patents; PatBase; Search terms - (Eno1 or enolase or 'eno 1' or ENO1L1 or MBPB1 or MPB1 or 'eno 1' or alpha-enolase or 'Non-neural enolase' or nne or pph or eno-1); (gene therapy or vector); (linker or dendrimer); (gene therapy or vector or complex or pharmaceutical); (human or polypeptide or fragment or active		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/152882 A1 (VITTECOQ) 15 November 2012 (15.11.2012); p 6, para 2-6, p 7, para 1-2; p 4, para 5; p 4, para 3-5; p 5, para 2; p 6, para 4; p 7, para 2; p 8, para 1; p 8, para 2; p 4, para 5; p 5, para 1; p 4, para 4 and para 5; p 11, para 1; p 13, para 3; p 15, para 6; p 7, para 2; p 13, para 3	1-7, 14-27
Y	US 2009/0227655 (KAHN) 10 September 2009 (10.09.2009); [0113]; [0063], [0098], [0072], [0118]; [0103]; [0025]; [0038]; [0118]; [0113]; [0066]; [0097]; [0125]	1-7, 14-27
Y	US 2011/0269665 A1 (KOLE) 3 November 2011 (03.11.2011); abstract; para [0038]	16, (19-27)/16
Y	US 2013/0004427 A1 (EL-SAYED ET AL) 3 January 2013 (03.01.2013); para [0154], [0009], [0158], [0206], [0028], [0191], [0158], [0161], [0028]; Fig 14	20-22, 24
Y	WO 2003/064501 A1 (MACEL ET AL) 7 August 2003 (07.08.2003); abstract; para [0011]	23
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 March 2013 (09.03.2015)		Date of mailing of the international search report 01 APR 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/11276

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 8-13, 28-54
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/50 (2017.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 5/50 (2006.01)	A 6 1 P 5/50	
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/077	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74)代理人 100122389

弁理士 新井 栄一

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100170221

弁理士 小瀬村 暁子

(72)発明者 ナレイン, ニーブン, ラジン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, フレッシュ ポンド パーク
ウェイ 7 3

(72)発明者 サランガラヤン, ランガブラサド

アメリカ合衆国 0 1 5 0 5 マサチューセッツ州, ボイルストン, セントラル ストリート 4
5 4

(72)発明者 ビシュヌダス, ヴィヴェック, ケー.

アメリカ合衆国 0 1 7 3 0 マサチューセッツ州, ベドフォード, ケンドール コート 4 2

(72)発明者 ゲスタ, ステファヌ

アメリカ合衆国 0 2 4 7 4 マサチューセッツ州, アーリントン, プレスコット ストリート
2 7

(72)発明者 ジン, エンシュアン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 2 マサチューセッツ州, ウェスト ロックスベリー, メープル スト
リート 2 0 0

(72)発明者 ダウナート, シルヴィア

アメリカ合衆国 3 3 1 4 3 フロリダ州, コーラル ゲーブルズ, アイラ ドラダ ブールバー
ド 1 4 8

(72)発明者 デオ, サプナ, ケー.

アメリカ合衆国 3 3 1 5 8 フロリダ州, パルメット ベイ, エスダブリュ 1 4 0 テラス
7 4 4 5

(72)発明者 ヒメネス, ホアキン, フアン
アメリカ合衆国 3 3 1 4 4 フロリダ州, マイアミ, エスダブリュ 7 8 ティーエイチ コート
6 2 1

(72)発明者 ディキシ, エムレ
アメリカ合衆国 3 3 1 3 2 フロリダ州, マイアミ, アpartment 2 2 エフ, ノース ベイ
ショア ドライブ 1 7 5 6

(72)発明者 ダフタリアン, ピロウズ, モハンマド
アメリカ合衆国 3 3 1 5 7 フロリダ州, マイアミ, エスダブリュ 1 7 2 エヌディー テラス
8 2 0 8

F ターム(参考) 4B050 CC03 CC07 DD11 LL01
4B065 AA90X AB01 BA02 CA27 CA44
4C076 AA19 AA29 AA30 AA95 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 CC21
CC30 EE41 EE59 FF67 FF68
4C084 AA02 BA01 BA08 BA22 CA18 CA53 DC26 MA24 MA43 MA52
MA66 NA05 NA06 NA14 ZC03 ZC33 ZC35
4H045 BA14