

(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2004-521952
(P2004-521952A)

(43) 公表日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int.Cl.⁷

A61K 38/22
A61P 3/04
A61P 3/06
A61P 3/08
A61P 3/10

F 1

A 61 K 37/24
A 61 P 3/04
A 61 P 3/06
A 61 P 3/08
A 61 P 3/10

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 C 08 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-511857(P2003-511857)	(71) 出願人	500049831 ザイモジエネティクス、インコーポレイテ ィド アメリカ合衆国、ワシントン 98102 , シアトル, イーストレイク アベニュー イースト 1201
(86) (22) 出願日	平成14年7月15日(2002.7.15)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月9日(2004.1.9)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/022747	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 國際公開番号	WO2003/006051	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 國際公開日	平成15年1月23日(2003.1.23)		
(31) 優先権主張番号	60/305,284		
(32) 優先日	平成13年7月13日(2001.7.13)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】脂肪分解を誘発するためのコルチコトロホー誘導の糖タンパク質ホルモンの使用

(57) 【要約】

脂肪分解を誘発し、肥満、インスリン耐性及びII型糖尿病を処理するためへのコルチコトロホー - 誘導の糖タンパク質ホルモン(CGH)の使用が記載される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 3 及び 6 のポリペプチドから構成されるヘテロダイマータンパク質である、医薬的有効量のコルチコトロフ - 誘導の糖タンパク質ホルモン (CGH) を個体に投与することを含んで成る、前記個体における脂肪分解の誘発方法。

【請求項 2】

医薬的有効量の CGH を個体に投与することを含んで成る、前記個体における減量誘発方法。

【請求項 3】

医薬的有効量の CGH を個体に投与することを含んで成る、前記個体における II 型糖尿病の処理方法。

10

【請求項 4】

医薬的有効量の CGH を個体に投与することを含んで成る、前記個体におけるインスリン感受性の改良方法。

【請求項 5】

前記個体が肥満である請求項 4 記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

発明の分野：

20

本発明は、肥満症の処理に関する。より特定には、本発明は、肥満症及び糖尿病の処理のための、脂肪分解の刺激へのコルチコトロフ - 誘導の糖タンパク質ホルモン (CGH) の使用に関する。

【背景技術】**【0002】**

本発明に引用されるすべての引例の教示は、それらの全体を引用により本発明に組込まれる。

肥満症は、重症で且つ広範囲に広まっている公衆の健康問題である。産業国の人口の 1/3 が、少なくとも 20% の理想体重の超過を有する。この現象は、発展途上国、特に経済が近代化している地球の地域に広がっている。2000 年現在、世界に推定される 3 億の肥満の人工が存在した。

30

【0003】

肥満症は、進行性心血管又は代謝疾患の危険性を相当に高める。30% 以上の超過体重に関しては、冠状動脈疾患の発生率が年齢 50 歳下で 2 倍になる。他の疾患に関して行なわれた研究は、同様のことを表す。20% の超過体重に関しては、高血圧の危険性が 2 倍になる。30% の超過体重に関しては、進行性非インスリン依存性糖尿病の危険性が 3 倍になり、そして異常な脂肪血症の発生率が 6 倍に上昇した。肥満により促進される追加の疾病は多く；肝機能の異常、消化病理学、多くの癌及び生理学的疾病がそれらの中で顕著である。

【0004】

肥満症についての処理は、カロリー摂取の制限、及び物理的運動を通しての高められたカロリー消費を包含する。しかしながら、節食による肥満症の処理は、短期間では効果的であるが、非常に高い割合の常習性を有する。運動による処理は、節食の不在下で適用される場合、比較的無効果であることが示されている。他の処理は、胃腸の手術、又は食事の脂質の吸収を制限する剤を包含する。それらの方策は、それらの使用の副作用のために、ほとんど不成功であった。

40

明かに、ヒトにおける体重の減量のために有用である新規処理の必要性が存在する。脂肪分解及び減量を促進するために投与され得る治療剤は、肥満の制御を助け、そしてそれにより、この状態に関連する多くの負の結果を軽減する。

【発明の開示】**【0005】**

50

序説：

本発明は、減量を促進するための新規治療の必要性を満たす。本発明は、減量を促進し、そして特に、脂肪分解を促進するために、コルチコトロフ - 誘導の糖タンパク質ホルモン (CGH) を、個体に投与することから成る。本発明はさらに、医薬的有効量のCGHを個体に投与することを含んで成る、前記個体におけるII型糖尿病の処理方法から成る。もう1つの態様においては、本発明は、医薬的有効量のCGHを個体に投与することを含んで成る、前記個体におけるインスリン感受性の改良方法から成る。

【0006】

ここで、本発明者は、肥満症の処理のために有効である方法を開示する。下記のように、脂肪組織における脂肪分解を刺激する能力は、肥満症に関連する多くの病理学に介在する手段を提供する。特に、本発明者は、CGHが、インビトロ又はインビボで投与される場合、脂肪分解を刺激することを発見した。結果として、代謝速度が高められ、減量及び高められたインスリン感受性が導かれる。10

脂肪分解を促進するために使用される場合、CGHは減量を促進することができる。本発明の組成物及び方法は、肥満、肥満に関連するアテローム硬化症、糖尿病、肥満又は糖尿病に関連する高血圧、又はより一般的には、肥満に関連する種々の病理学を包含する病状を処理するために有用である。

【0007】

本発明のもう1つの観点においては、この剤は、減量を誘発する他の薬剤により処理された個体における減量の維持のために使用され得る。20

本発明の好ましい態様は、特に肥満に関連する非インスリン依存性糖尿病の処理である。1つの態様においては、非インスリン依存性糖尿病を処理するためへのCGHの使用は、非肥満個体においても構想される。

本発明のさらにもう1つの観点は、個体における休止代謝速度を早めるためへのCGHの使用に関する。この観点の1つの態様においては、遅い休止代謝速度を有する個体は、脂肪分解を促進し、そしてエネルギー使用を高めるためにCGHを投与される。

【発明を実施するための最良の形態】**【0008】**定義及び用語：

本発明の1つの観点は、脂肪分解を刺激するためへの新規糖タンパク質ホルモンCGHの使用である。CGHは、国際特許出願番号PCT/US01/09999号、公開番号W001/73034号に開示される。それは、サブユニット、すなわち糖タンパク質ホルモン 2 (GPHA2)、及びサブユニット、すなわち糖タンパク質ホルモン 5 (GPHB5) から構成される。30

【0009】

GPHA2は、これまでZsig51 (国際特許出願番号PCT/US99/03104号、1999年8月19日に公開される公開番号W099/41377号)と呼ばれた。配列番号1は、十分な長さのポリペプチドGPHA2をコードするヒトcDNA配列であり、そして配列番号2は、ヒトGPHA2の十分な長さのポリペプチド配列である。配列番号3は、シグナル配列を有さない成熟のGPHA2ポリペプチド配列である。配列番号4は、十分な長さのGPHB5ポリペプチドをコードするヒトcDNA配列である。配列番号5は、十分な長さのGPHB5ポリペプチドである。配列番号6は、シグナル配列を有さない成熟GPHB5ポリペプチドである。配列番号7は、十分な長さのGPHB5ポリペプチドをコードするヒトゲノムDNA配列である。40

【0010】

本発明は一般的に、脂肪組織における脂肪分解を刺激するために有用である方法に関する。当業者は、脂肪分解が、トリグリセリドの形で貯蔵される脂肪が脂肪細胞から、個々の遊離脂肪酸として循環中に開放される生化学工程であることを理解するであろう。脂肪分解の刺激は、ヒトにおける高められたエネルギー消費に明かに連結されており、そして脂肪分解を促進し、そして脂肪酸化を高めるためにいくつかの方策が、減量を促進し、そして肥満に関連する糖尿病状態を処理するために研究されて来た。それらの治療努力は、その末梢 - アドレナリン作用性受容体を通して交感神経系 (SNS) を刺激する化合物の創50

造に主に集中する。脂肪組織におけるCGH-促進された脂肪分解の発見は、脂肪、及び肥満に関するインスリン-耐性糖尿病状態の新規且つ特定の方法を提供する。

【0011】

本明細書において使用される場合、用語“肥満症”及び“肥満-関連の”とは、個体の身長及び骨格に関する理想よりもある程度、大きい身体質量を有する個体を言及する。好ましくは、それらの用語は、20以上の身体質量指數値、より好ましくは30以上、及び最も好ましくは40以上の身体質量指數値を有する個体を言及する。

【0012】

概観：

エネルギー消費は、エネルギー平衡等式の1つの観点を提供する。安定した体重を維持するためには、エネルギー消費は、エネルギー摂取と平衡して存在すべきである。相当の努力が、減量し、又は体重を維持する手段としてエネルギー摂取（すなわち、節食及び食欲）を操作することに払われて来たが、しかしながら、それらのアプローチに向けられた莫大な合計全額にもかかわらず、それらはほとんど未成功である。体重調節を管理し、そして肥満を処理する手段としてエネルギー消費を薬理学的に高める努力がまた存在した。

【0013】

上昇するエネルギー代謝は、それが正常レベルでの食物摂取の影響される個体による維持を可能にする可能性を有するので、魅力的な治療アプローチである。さらに、薬理学的手段によるエネルギー消費の上昇はエネルギー摂取及び食欲における対応する上昇により十分には中和されない観点を支持する証拠が存在する。Bray, G.A. (1991) Annu. Rev. Med. 20 . 42, 205-216を参照のこと。

【0014】

エネルギー消費は、中枢神経系の操作により、SNSの末梢遠心性神経の活性化により、又は甲状腺ホルモンレベルの上昇により薬理学的に刺激され得る。毎日、消費されるエネルギーの多くは、休止代謝速度（RMR）に由来し、それは、毎日の合計エネルギー消費の50 - 80%を占める。再考に関しては、Astrup, A. (2000) Endocrine 13, 207-212を参照のこと。ノルアドレナリンターンオーバー研究は、身体サイズ及び組成により説明されないRMRにおける変動性のほとんどがSNS活性の差異に関連していること示し、このことは、SNS活性がRMRを調節することを示唆する。Snitker, S., など. (2001) Obes. Rev. 1, 5-15を参照のこと。食物摂取は、高められたSNS活性を付随し、そして研究は、食物に応答しての高められたSNS活性が食物誘発された熱発性の少なくとも一部を説明することを示した。

【0015】

エネルギー使用の調節に関するSNSの末梢標的物は、 α -アドレナリン性受容体（ α -AR）である。それらの受容体は、第二メッセンジャーcyclik AMP（cAMP）に結合される。cAMPレベルの上昇は、タンパク質キナーゼA（PKA）、多能タンパク質キナーゼ及び種々の細胞効果を誘発する転写因子の活性化を導く。Bourne, H.R., など. (1991) Nature 349, 117-127を参照のこと。脂肪組織は、SNSにより非常に弱められ、そして α -アドレナリン性受容体の3種の既知サブタイプ、すなわち α_1 、 α_2 及び α_3 -ARを有する。

【0016】

SNSの活性化は、それらの受容体の脂肪分解及び脂肪酸化へのカップリングを通してエネルギー消費を刺激する。脂肪組織により生成され、そして血流中に開放された血清フリーの脂肪酸（FFA）が、エネルギー消費を刺激し、そして熱発生を高める。再考のためには、Astrup, A. (2000) Endocrine B, 207-212を参照のこと。さらに、高められたPKAレベルは、不用熱を生成する、ミトコンドリアにおける無益回路を創造するカップリングしていないタンパク質-1（UCP-1）をアップレギュレートすることにより、脂肪におけるエネルギー利用を高める。

【0017】

過去20年間にわたって、肥満及び肥満に関する糖尿病の処理のためのSNS活性化の生理学

10

20

30

40

50

的有益性の研究が、 β_3 -ARの薬理学的活性化に集中されて来た。 β_3 -ARの発現は、 α_1 又は α_2 イソフォームよりも狭い組織範囲に制限され、そして他のイソフォームに比較して、嚙齒動物組織において高く発現される。 β_3 -ARアゴニストにより処理された嚙齒動物における実験研究は、脂肪分解及び脂肪酸化の刺激が高められたエネルギー消費、減量及び高められたインスリン感受性を生成することを示した。De souza, C.J. and Burkey, B.F. (2001) *Curr. Pharm. Des.* 7, 1433-1449を参照のこと。

【0018】

それらの化合物の可能性ある有益性は、ヒト β_3 -ARでの効能のそれらの欠失のために実験されていない。さらに、従って、嚙齒動物脂肪組織における β_3 -ARのレベルがヒト脂肪組織においてよりも高いことが現実化された。ヒト脂肪組織においては、 α_1 及び α_2 イソフォームが、優性アドレナリン性受容体イソフォームを表す。Arch, J.R. (2000) *Eur. J. Pharmacol.* 440, 99-104を参照のこと。従って、肥満の処理のための脂肪分解の刺激の生化学的前提条件は明らかに示されているが、ヒトにおいてその対応する効果を治療的に生成するための機構は実現されていない。

【0019】

脂肪分解を通して脂肪酸化を促進するための方策は、減量を促進しない用量で、及び体中に影響を及ぼさない時間にわたって、改良されたインスリン感受性を示した。インスリン感受性効果が抗-肥満効果よりも容易に検出できることは驚くべきことではない。脂肪酸化の刺激は、インスリンシグナル化を調節する代謝物の細胞内濃度を急速に低めることができる。対照的に、抗-肥満効果は、脂肪の大きな貯蔵物が酸化されるにつれて、徐々に進行すべきである。

【0020】

CGHは脂肪組織におけるcAMPの上昇を促進する：

CGHは、チロトロピン-刺激ホルモン(TSH)受容体との相互作用を通してその効果を発揮する。Nakabayashi, K., など. (2002) *J. Clin. Invest.* 109, 1445-1452を参照のこと。TSH受容体(TSHR)は、G-タンパク質結合された、7種のトランスメンブラン受容体スーパーファミリーのメンバーである。TSH受容体の活性化は、下流の細胞効果を引き起こす、ヘテロトリマーGタンパク質とのカップリングを導く。TSH受容体は、サブタイプG_s, G_q, G₁₂及びG_iのGタンパク質と相互作用することが示されている。特に、G_sとの相互作用は、アデニルシクラーゼの活性化及び高められたcAMPレベルを導く。Laugwitz, K.L., など. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 116-120を参照のこと。

【0021】

脂肪組織におけるTSH受容体の存在は時々、議論の対照であったが、最近の報告は、ヒト及び嚙齒動物の組織細胞におけるTSHRの存在を示している。Bell, A., など. (1999) *Am. J. Rhysiol. Cell. Physiol.* 279, (335-340, 及びEndo, T., など. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 10833-10837を参照のこと。

【0022】

例1は、培養されたネズミ3T3-L1脂肪細胞及び一次ヒト脂肪細胞におけるCGHによる高められたcAMPの生成を示す。本発明者は、CGHがcAMP応答要素(CRE)エンハンサー配列の制御下でのルシフェラーゼレポーター遺伝子構造体の活性化を生成することを発見した。典型的には、本発明者は、CGH処理に応答してのルシフェラーゼレポーター遺伝子の15-40倍の誘発を観察し、このことは、TSHRの活性化に続いて、脂肪細胞におけるcAMPの有意な生成を示す。それらのデータは、CGHが、細胞内cAMPレベルにより主に制御される、脂肪組織脂肪分解の重要な生理学的調節体であることを示す。再考に関しては、Astrup, A. (2000) *Endocrine* 13, 207-212を参照のこと。

【0023】

CGHは脂肪細胞及び完全な動物における脂肪分解を促進する：

CGHを、培養された3T3-L1ネズミ脂肪細胞における脂肪分解を活性化するその能力について試験した。4時間の脂肪細胞の処理に続いて、脂肪分解を、脂肪細胞培養培地におけるグリセロール及びFFAの蓄積により評価した。10nMのヒト組換えCGHによる脂肪細胞の処理

10

20

30

40

50

は、有意に高められたレベルの細胞外グリセロール及びFFAを生成した。例2は、イソプロテレノール、すなわち非特異的₁-アドレナリン性アゴニストに対するCGHの脂肪分解活性を比較する。CGHにより達成される最大の脂肪分解は、イソプロテレノールにより生成されるその脂肪分解の少なくとも50%である。脂肪分解は、0.1nMの濃度でCGHにより有意に刺激され、このことは、CGHが脂肪細胞における脂肪分解の有能な調節体であることを示す。

【0024】

CGHはまた、マウスへのIP注射に続いて、血清グリセロール及びFFAの上昇を誘発した。例3に記載されるように、マウスは、CGH(300μg/kg)、₃-ARアゴニストCL316,243(1mg/kg)又はビーケル塩溶液のIP注射の前、一晩、絶食された。ビーケル対照は血清グリセロール及びFFAレベルの低下を示したが、CGHにより処理された動物は、両者において有意な上昇性を示し、このことは、CGHがインビボでの脂肪分解の有能な刺激体であることを示す。10

【0025】

脂肪分解刺激剤としてのCGHの利点：

CGHは、脂肪分解を生成し、そして代謝速度を早める新規方法を提供する。これまで使用されて来た他の方策は、特異性、例えば一般的に₁-ARアゴニストに欠失、又はそれまで開発されて来た₃-ARアゴニストの特異性に関する効力の欠失を有する。ヒト使用のために研究された剤のほとんどは、満足のゆく選択性を示さず、そして結果として、脂肪細胞以外の組織における交感神経路の活性化のために、高められた血圧及び心拍をもたらした。20Arch, J.R. (2002) Eur. J. Pharmacol. 440, 99-107を参照のこと。

【0026】

₃-AR特異的アゴニストの開発の強調にもかかわらず、最近のヒト研究は、交感神経的に誘発された熱発生及びエネルギー消費の主要メディエーターとして₁-及び₂-アドレナリン性受容体を包含して来た。さらに、ヒト肥満集団における研究は、それらの個体に観察される休止代謝速度の低下が脂肪組織における₂-アドレナリン性受容体の損なわれた機能の結果であることを示す。Schiffelers, S.L., など. (2001) J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 2191-2199及びBloak, E. E., など. (1993) Am. J. Physiol. 264, E11-17を参照のこと。従って、交感神経性神経衰弱を伴なわないでの脂肪分解を高める新規機構は、肥満症の処理のためのユニーク機会を提供する。30

【0027】

ヒト細身及び肥満対象における他の研究は、血漿FFAレベルの上昇が脂質酸化及びエネルギー消費において類似する上昇を誘導することを見出した。それらの研究は、肥満対象における脂肪の蓄積が脂質利用の欠陥のためであるよりもむしろ脂肪組織細胞分解の欠陥のためであり得ることを結論づける。Schiffelers, S. L., など. (2001) Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 25, 33-38を参照のこと。

【0028】

高められた脂肪分解及び得られる脂肪細胞サイズの低下は、ヒト横断面研究において、インスリン耐性と相互関係しない。Weyer, C., など. (2000) Diabetologia 43, 1498-1506を参照のこと。従って、脂肪分解を刺激し、そして脂肪細胞サイズを低めるための方法は、肥満症に関連するインスリン-耐性糖尿病を低めることが予測される。脂肪組織における有意な数のCGH受容体の存在は、ヒト肥満集団における脂肪分解及びRMRを調節する新規方法を提供する。40

【0029】

II型糖尿病を処理するためへのCGHの使用：

CGHはまた、II型糖尿病(II型DM)を処理するために投与され得る。II型DMは通常、30歳以上の患者において診断される型の糖尿病であるが、しかしそれはまた、子供及び青年においても発生する。それは、高血糖及びインスリン耐性によって臨床学的に特徴づけられる。II型DMは通常、肥満症、特に身体の上部(内臓/腹部)の肥満に関連し、そしてしばしば、体重の増加の後に発生する。50

【 0 0 3 0 】

II型DMは、高血糖が、グルコースに対する損なわれたインスリン分泌応答、及び骨格筋によるグルコース摂取の刺激及び肝グルコース生成（インスリン耐性）の抑制における低められたインスリン有効性の両者に起因する異種グループの障害である。その得られる高血糖症は、他の通常の状態、例えば肥満、高血圧、高脂血症及び冠状動脈疾患を導くことができる。

【 0 0 3 1 】

CGHは下記用量で個体に投与され得る。CGHはまた、インスリン及び他の糖尿病用薬剤、例えばトルブタミド、クロルプロパミド、アセトヘキサミド、トラザミド、グルブリド、グリピジド、グリメピリド、メタホルミン、トログリタゾン及びレパグリニドと共に投与され得る。10

【 0 0 3 2 】**CGHの配合及び投与：**

CGHは、肥満症及び糖尿病に関する疾病を処理するか又は改善するための治療的有効用量で、単独で、又はそれが適切なキャリヤー又は賦形剤と共に混合されている組成物により投与され得る。CGHの処理用量は、安全性及び効力を最適化するよう滴定されるべきである。投与方法は、静脈内、腹腔内、直腸、鼻腔内、皮下及び筋肉内投与を包含する。医薬滴に許容できるキャリヤーは、水、塩溶液及び緩衝液を包含するであろう。投与量範囲は通常、 $0.1\text{ }\mu\text{g} \sim 0.1\text{ mg/kg}$ 体重/日であることが予測される。初期において試みる有用な用量は $25\text{ }\mu\text{g/kg}$ /日である。20

【 0 0 3 3 】

しかしながら、その用量は、当業者により決定される場合、高くても又は低くても良い。薬剤配合及び投与量範囲の完全な議論については、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Ed., (Mack Publishing Co., Easton, Penn., 1990) 及びGoodman and Gilman's: The Pharmaceutical Basis of therapeutics, 9th Ed. (Pergamon Press, 1996) を参照のこと。20

【 実施例 】**【 0 0 3 4 】****例 1 . 3T3 L1脂肪細胞及びヒト脂肪細胞のCGH活性化がcAMP生成をもたらす：****要約：**

分化されたネズミ3T3 L1脂肪細胞及び一次ヒト脂肪細胞を用いて、CGHのシグナルranslationについて研究した。3T3 L1線維芽細胞を脂肪細胞に分化し、そして細胞を、レポーター構造体、すなわちcAMP応答要素（CRE）エンハンサー配列の制御下でのホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む組換えアデノウィルスによりトランスダクションした。このアッセイシステムは、G_s-カップリングされたG-タンパク質カップリングされた受容体（GPCR）の活性化の下流にcAMP-介在の遺伝子誘発を検出する。30

【 0 0 3 5 】

イソプロテレノール、すなわち - アドレナリン性受容体アゴニストによる分化された3T3 L1細胞の処理は、cAMPレベルの上昇及びルシフェラーゼ発現の80倍の誘発をもたらした。CGHによる分化された3T3 T1細胞の処理はまた、高められたcAMPレベル及びルシフェラーゼ発現の27倍の誘発をもたらした。別の実験においては、未分化の3T3 L1線維芽細胞を、組換えアデノウィルスによりトランスダクションした。CGHによる線維芽細胞の処理は、レポーター遺伝子誘発の上昇をもたらさなかった。40

【 0 0 3 6 】

もう1つの実験においては、ヒト一次脂肪細胞をまた、レポーター構造体を含む組換えアデノウィルスによりトランスダクションした。イソプロテレノールによるヒト脂肪細胞の処理は、ルシフェラーゼ発現の17倍の誘発を生成した。CGHによるヒト脂肪細胞の処理は、レポーター遺伝子の14倍の誘発をもたらした。それらの結果は、ネズミ脂肪細胞及びヒト脂肪細胞を通してのCGHシグナル化、及び - アドレナリン性受容体刺激を通して達成されるcAMPレベルに類似するcAMPレベルの生成を示す。50

【 0 0 3 7 】

実験方法：

3T3 L1細胞を、ATCC (CL - 173) から得、そして次の通りにして増殖培地において培養した：細胞を、10% ウシ胎児血清 (JRH Biosciences, カタログ番号12133 - 73P) を含むDME M高グルコース (Life Technologies, カタログ番号11965 - 092) において増殖した。細胞を、8% CO₂の湿潤されたインキュベーターにおいて37°で培養した。細胞を、コラーゲン被覆された96 - ウェルプレート (Becton Dickinson, カタログ番号356407) に、ウェル当たり5,000の細胞の密度で接種した。

【 0 0 3 8 】

2日後、分化用培地を次の通りに添加した：10% ウシ胎児血清 (Hyclone, カタログ番号S H30071) 、1 μg/mlのインスリン、1 μMのデオキサメタゾン及び0.5mMの3 - イソブチル - メチルキサンチン (ICN、カタログ番号195262) を含むDMEM高グルコース。細胞を、8% CO₂において37°で4日間インキュベートし、そして培地を、10% ウシ胎児血清及び1 μg /mlのインスリンを含むDMEM高グルコースにより置換した。細胞を、8% CO₂において、37°で3日間インキュベートし、次に、培地を、10% ウシ胎児血清を含むDMEM高グルコースにより置換した。細胞を、8% CO₂において37°で3日間インキュベートし、そして培地を、10% ウシ胎児血清を含むDMEM低グルコース (Life Technologies, カタログ番号12387 - 015) により置換した。

【 0 0 3 9 】

アッセイの前日、細胞を、2mMのL - グルタミン (Life Technologies, カタログ番号25030 - 149) 、0.5% ウシアルブミン画分V (Life Technologies, カタログ番号15260 - 037) 、1mMのMEMピルビン酸ナトリウム (Life Technologies, カタログ番号11360 - 070) 及び20mMのHEPESを含むF12 Ham (Life Technologies, カタログ番号12396 - 016) によりすすいだ。細胞をAV KZ55, すなわちKZ55、すなわちCRE - 由来のルシフェラーゼレポーターカセットを含むアデノウィルスベクターにより、細胞当たり5,000の粒子でトランスタクションした。

【 0 0 4 0 】

一晩のインキュベーションに続いて、細胞を、アッセイ培地 (0.5% ウシアルブミン画分V 、2mMのL - グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム及び20mMのHEPESを含むF12 HAM) により1度すすいだ。50 μlのアッセイ培地を、個々のウェルに添加し、続いて50 μlの2倍に濃縮された試験タンパク質を添加した。プレートを、5% CO₂下で37°で4時間インキュベートした。培地をプレートから除き、そして細胞を、ルシフェラーゼアッセイキット (Promega, カタログ番号E4530) において供給される1 × 細胞培養物溶解試薬25 μl (ウェル当たり) により溶解した。

【 0 0 4 1 】

細胞を、室温で15分間インキュベートした。ルシフェラーゼ活性を、個々のウェル中への40 μlのルシフェラーゼアッセイ基質の自動化された注入に従って、マイクロプレートトルシノーメーター (RerkinElmer Life Sciences, Inc., モデルIB96V2R) 上で測定した。変性を伴なっての上記の方法をまた使用し、96ウェルプレートに接種された、Stratageneから得られたヒト脂肪細胞 (カタログ番号937236) に対するCGH及びイソプロテレノールを試験した。ヒト脂肪細胞を、0.5% ウシアルブミン画分Vを含む基本培地 (Stratagene, カタログ番号220002) により1度すすぎ、次に、AV KZ22により5,000の粒子/細胞でトランスタクションした。一晩のインキュベーションに続いて、細胞を、0.5% ウシアルブミン画分Vを含む基本培地から成るアッセイ培地により1度すすぎ、そして上記のようにしてアッセイした。

【 0 0 4 2 】

例 2 . 3T3 L1脂肪細胞におけるCGH - 誘発された脂肪分解 :

要約：

3T3 L1脂肪細胞を、CGH及び非特異的 - アドレナリン性受容体アゴニストイソプロテレノールにより4時間、処理した。脂肪分解を、ならし培地におけるグリセロール及びFFA

10

20

30

40

50

の蓄積により評価した。図1は、グリセロール(パネルA)及びFFA(パネルB)についてのCGH及びイソプロテレノールの用量-応答曲線を示す。CGHは、図1に示されるように、たぶんネズミ脂肪細胞における脂肪分解を刺激した。

分化された3T3 L1細胞からのならし培地における遊離脂肪酸の測定：

【0043】

遊離脂肪酸を、改良されたプロトコールによるエステル化されていない(又は遊離)脂肪酸の定量決定のためにWako NEFA Cキットを用いて測定した。イソプロテレノール(ICN)、すなわち脂肪分解・誘発の正の対照を、アッセイ培地(Life Technologies 低グルコースDMEM, 1mMのピルビン酸ナトリウム、2mMのL-グルタミン、20mMのHEPES、及び0.5%BSA)において、2μMの出発濃度に希釈した。イソブレテレノールをさらに、半対数連続希釈度で希釈した。CGHを、0.06nMに連続的に希釈した。培地を、96ウェルプレートにおける3T3 L1脂肪細胞から除去した。50μlのアッセイ培地を個々のウェルに添加し、続いて、50μlのCGH又はイソプロテレノールを個々のウェルに添加した。

【0044】

プレートを、37℃で4時間インキュベートした。40μlのならし培地を、グリセロールアッセイ分析のために集め、そして40μlのならし培地を、遊離脂肪酸分析のために集めた。オレイン酸(Sigma)をメタノールに溶解し、ならし培地における遊離脂肪酸の量の決定のための対照として使用した。Wako試薬A及びBを、推薦される濃度の4倍に再構成した。ならし培地サンプルを、96ウェルプレートにおいてアッセイした。50μlのWako試薬Aを、50μlのオレイン酸標準+40μlのアッセイ培地に添加した。

【0045】

50μlのWako試薬Aを、分化された3T3 L1細胞からのならし培地40μl及びメタノール5μlに添加した。96ウェルプレートを37℃で10分間インキュベートした。100μlのWako試薬Bを個々のウェルに添加した。96ウェルプレートを、37℃で10分間インキュベートした。次に、96ウェルプレートを、室温で5分間、放置した。96ウェルプレートを、3250×gで5分間、Beckman Coulter Allegra 6R遠心分離機により遠心分離し、気泡を除去した。530nmでの吸光度を、Wallac Victor2 Multilabelカウンター上で測定した。

【0046】

分化された3T3 L1細胞からのならし培地におけるグリセロールの測定：

グリセロールを、改良されたプロトコールで、Sigma Triglyceride(GPO-Trinder)キットを用いて、ならし培地において測定した。イソプロテレノールを、2μMの出発濃度に希釈した。イソプロテレノールをさらに、半対数連続希釈で希釈した。CGHを、アッセイ培地において300nMの出発濃度に希釈した。次に、CGHを、0.06nMに連続して希釈した。培地を、96ウェルプレートにおける3T3 L1脂肪細胞から除去した。50μlのアッセイ培地を個々のウェルに添加し、続いて、50μlのCGH又はイソプロテレノールを個々のウェルに添加した。

【0047】

プレートを、37℃で4時間インキュベートした。40μlのならし培地を、グリセロールアッセイ分析のために集め、そして40μlのならし培地を、遊離脂肪酸分析のために集めた。グリセロール標準を、200nモル/10μl~0.25nモル/10μlの範囲に水により希釈した。グリセロールを、ならし培地におけるグリセロールの量を決定するための対象として使用した。Sigma試薬Aを、推薦される濃度に再構成した。ならし培地サンプルを、96ウェルプレートにおいてアッセイした。150μlのSigma試薬Aを、分化された3T3 L1細胞からのならし培地40μlの+水10μlの添加した。96ウェルプレートを、37℃で10分間インキュベートした。96ウェルプレートを、3250×gで5分間、Beckman Coulter Allegra 6R遠心分離機により遠心分離し、気泡を除去した。530nmでの吸光度を、Wallac Victor2 Multilabelカウンター上で測定した。

【0048】

例3. インビボでのCGHによる脂肪分解の刺激：

要約：

10

20

30

40

50

CGH、3-アドレナリン性受容体アゴニストCI316,243(CL)、及び塩溶液ピークルを、一晩の断食に続いて、マウスにおける脂肪分解の刺激について試験した。マウス(n=4)を、CGH(300μg/kg)、CL(1mg/kg)又はピークルのIP注射の直前に、放血し、そして次に、2時間後、殺害した。脂肪分解を、2時間にわたって、血清グリセロール又はFFAにおける%変化率として評価した。

【0049】

図2は、処理グループに関する血清グリセロール(上部パネル)及びFFA(下記パネル)における変化を示す。ピークルグループに関する血清グリセロール及びFFAは、それぞれ、7%±9%及び24%±15%低下した。CGHグループに関する血清グリセロールは、57%±20%上昇し(p=0.0254)；そしてFFAレベルは、25%±5%上昇した(p=0.0188)。
CLグループに関する血清グリセロールは、168%±23%上昇し(p=0.0004)；そしてFFAは82%±16%上昇した(p=0.0029)。

【0050】

処理プロトコール：

生後19週目のC57BL/6雄マウスを、体重を標準化するためにグループ分けした(個々の処理あたりn=4；平均グループ重量=37.9g±0.5g)。マウスを、処理の前、18時間それぞれ収容し、この時点で、食物は回収され、与えられる水へは自由に接近できた。およそ8a.m.で、対象は、ハロタンにより麻酔をかけられ、そして血液サンプルが眼窩後から採血された。血液を凝固せしめ、そして血清を、遠心分離により分離し、そして後での分析のために凍結した。試験物質を、0.1mlの体積でIP注射により投与し、そして動物を、水への自由な接近を伴なって、2時間、それらのかごにおいて置換した。2時間で、マウスを殺害し、そして血液を、心臓穿刺により放血した。

【0051】

ネズミ血清におけるグリセロール及びFFAの測定：

血清における遊離脂肪酸の測定に関しては、ならし培地における遊離脂肪酸を測定するための前記方法に、次の変法を伴なって従って。Wako試薬A及びBを、2倍の推薦される濃度に再構成した。75μlのWako試薬Aを、5μlのオレイン酸標準+5μlの水に添加した。75μlのWako試薬Aを、5μlの血清及び5μlのメタノールに添加した(オレイン酸標準条件を代表するために)。96ウェルプレートを、37で10分間インキュベートした。150μlのWako試薬Bを個々のウェルに添加した。96ウェルプレートを、37で10分間インキュベートした。96ウェルプレートを、室温で5分間、放置した。96ウェルプレートを、3250×gで5分間、Beckman Coulter Allegra 6R遠心分離機上で遠心分離し、気泡を除去した。

【0052】

530nmでの吸光度を、Wallac Victor2 Multilabelカウンター上で測定した。血清中のグリセロールの測定に関しては、ならし培地におけるグリセロールを測定するための前記方法に、下記変性を伴なって従った。Sigma試薬Aを、0.5倍の推薦される濃度に再構成した。200μlのSigma試薬Aを、10μlのグリセロール標準に添加した。200μlのSigma試薬Aを、5μlの血清+5マイクロの水に添加した。96ウェルプレートを室温で15分間インキュベートした。96ウェルプレートを、3250×gで5分間、Beckman Counter Allegra6R遠心分離機により遠心分離し、気泡を除去した。530nmでの吸光度を、Wallac Victor2 Multilabelカウンター上で測定した。

【0053】

例4. 組換えCGHの発現及び精製：

要約：

CGHのサブユニットであるGPHA2及びGPHB5の両者を過剰発現するチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞系を生成し、そしてCH0180と命名した。CH0180は、活性ヘテロダイマーCGHを分泌することが見出された。CGHを、標準の生化学技法を用いて、CH0180の上清液から精製した。

【0054】

CH0180の生成：

10

20

30

40

50

CGH生成細胞系CH0180を、2段階で生成した。GPHA2、GPHB5、及びCMVプロモーター下の薬物耐性（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）を発現する構造体を、エレクトロポレーションにより、タンパク質フリーのCHO DG44細胞（PF CHO）にトランスフェクトした。得られるプールを選択し、そしてメトトレキセートを用いて増幅した。初期分析は、高レベルのGPHA2発現及び低レベルのGPHB5発現を示した。従って、CMVプロモーターからのGPHB5及びSV-40プロモーターからのゼオシン耐性を発現する第2構造体を、選択され、増幅されたプール中にエレクトロポレーションによりトランスフェクトした。ゼオシン選択の後、最終プール（CH0180）は、有意なレベルのGPHA2及びGPHB5の両者を発現し；タンパク質は、非共有ヘテロダイマーCGHとして分泌された。

【0055】

10

CHO培養上清液からのCGHの精製：

CGHを、次の確立されたクロマトグラフィー方法によりCHO培養上清液から精製した：最初に、CGHを、強力チオノン交換体POROS HS50上で捕獲し：次にそれを、ConA Sepharoseを用いて親和性精製し；そして最終的に、磨き、そしてSuperdex75サイズ排除クロマトグラフィーによりPBS中に緩衝液 - 交換した。

【0056】

20

カチオン交換クロマトグラフィー：

CHO培養上清液を、 $0.2\mu\text{m}$ フィルターにより濾過し、そして20mMの2-モルホリノエタンスルホン酸（MES）によりpH6に調節した。前記調節された上清液におけるCGHを、20mMのMES（pH6）により前もって平衡化されたPOROS HS50カラム上に、20mMのMES（pH6）による1:2のオンライン希釈法を用いて、55cm/時で捕獲した。充填の完結の後、カラムを、20カラム体積（CV）の平衡化緩衝液により洗浄した。これに続いて、20mMのMES（pH6）中、3CVの250mMのNaClにより、90cm/時で洗浄した。次に、CGHを、20mMのMES（pH6）中、3CVの500mMのNaClによりカラムから同じ流速で溶出した。最終的に、カラムを、1M及び2MのNaClの段階により剥離し、そして20mMのMES（pH6）により再平衡化した。CGHを含む、500mMのNaCl - 溶出されたプールを、次の段階のために、NaOHによりpH7.4に調節した。

【0057】

20

ConA Sepharoseクロマトグラフィー：

ConA Sepharoseは、Sepharoseに結合されるConcanavalinAである。ConcanavalinAは、D-マンノピラノシル、D-グルコピラノシル及び関連する残基を含む分子に可逆に結合するレクチンである。カチオン交換クロマトグラフィーからのCGHの調節されたプールを、0.5MのNaClを含む、20mMのトリス（pH7.4）により平衡化されたConAカラムに、2cm/時で直接的に適用した。充填の後、カラムを、20CVの平衡化緩衝液により洗浄した。次に、CGHを20mMのトリス（pH7.4）中、3CVの0.5Mのメチル-D-マンノ-ピラノシドにより1~2cm/時でカラムから競争除去した。このプールを、5kDaのカットオフ膜を有するAmecon搅拌セルを用いて、限外濾過により濃縮した。

30

【0058】

30

サイズ排除クロマトグラフィー：

次に、濃縮されたCGH ConAプールを、残るHMW汚染物の除去のために及びPBSへの緩衝液交換のために、Superdex75樹脂の適切にサイズ分けされた層（すなわち、層体積の5%以下）に適用した。CGHを、Superdex75カラムから約0.65~0.7CVで溶出し、そして-80°での貯蔵のために、5kDaカットオフ限外濾過膜を有するAmecon搅拌セルを用いて濃縮した。クーマシー染色されたSDS PAGEにより純粋であることが分かっているヘテロダイマータンパク質は、SEC MALSによれば、正しいNH₂末端、正しいアミノ酸組成及び正しい質量を有した。RP HPLCアッセイにより評価された全体的な工程の回収率は50~60%であった。

40

【図面の簡単な説明】

【0059】

40

【図1】図1は、3T3 L1脂肪細胞におけるCGH及びイソプロテレノール - 誘発された脂肪分解の用量応答を示す。グリセロール（パネルA）及びFFA（パネルB）蓄積が、示される濃度でのCGH（実線の四角）又はイソプロテレノール（実線の三角）による4時間の処理

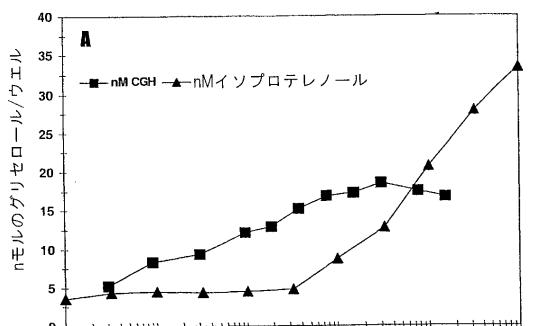
50

に続いて決定された。

【図2】図2はCGHによるインビボでの脂肪分解の刺激を示す。マウス（個々のグループ、 $n = 4$ ）は、ビーグル塩溶液、CGH（300 $\mu\text{g/kg}$ ）又はCL316,243（1mg/kg）によりIP注射された。例3に記載されるように、2時間にわたっての血清グリセロール（上部パネル、A）及びFFA（下記パネル、B）の変化が、個々のグループに関して示される。

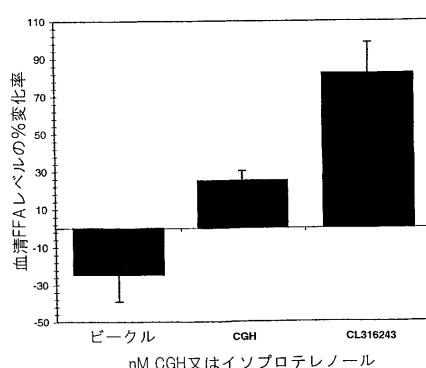
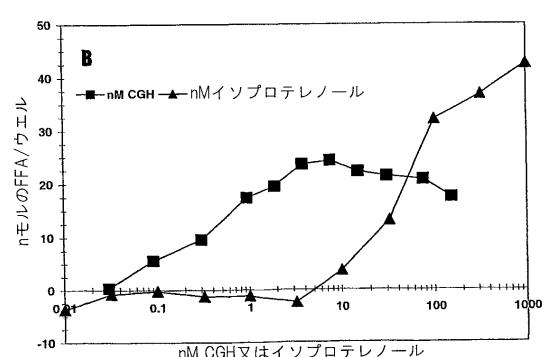
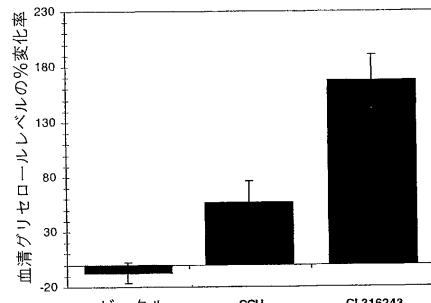
【図1】

Figure 1



【図2】

Figure 2



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/006051 A1(51) International Patent Classification⁵: **A61K 38/18**

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, HU, IS, IT, GB, GD, GE, GH,

(21) International Application Number: PCT/US02/22747

GM, IIR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

(22) International Filing Date: 15 July 2002 (15.07.2002)

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

(25) Filing Language: English

MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,

(26) Publication Language: English

SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TI, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,

(30) Priority Data: 60/305,284 13 July 2001 (13.07.2001) US

ZA, ZM, ZW.

(71) Applicant: ZYMOGENETICS, INC. [US/US]; 1201 Eastlake Avenue East, Seattle, Wa 98102 (US).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KU, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

(72) Inventors: KELLY, James, D.; 3330 West Mercer Way, Mercer Island, WA 98040 (US); WEBSTER, Phillipa, J.; 5823 17th Avenue NE, Seattle, WA 98105 (US).

Turkish patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CT, CY, CZ, DE, DK, EE,

(74) Agent: LUNN, Paul, G.; ZymoGenetics, Inc., 1201 Eastlake Avenue East, Seattle, WA 98102 (US).

ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BJ, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

GW, MI, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
*with international search report
 before the expiration of the time limit for amending the
 claims and to be republished in the event of receipt of
 amendments*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

**WO 03/006051 A1**

(54) Title: USE OF CORTICOTROPHIN-DERIVED GLYCOPROTEIN HORMONE TO INDUCE LIPOLYSIS

(57) Abstract: The use of corticotrophin-derived glycoprotein hormone (CGII) to induce lipolysis, treat obesity, insulin resistance, and type II diabetes is described.

**USE OF CORTICOTROPH-DERIVED GLYCOPROTEIN HORMONE
TO INDUCE LIPOLYSIS**

5

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the treatment of obesity. More particularly, the invention relates to the use of corticotroph-derived glycoprotein hormone (CGH) to stimulate lipolysis for the treatment of obesity and diabetes.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The teachings of all of the references cited herein are incorporated in their entirety herein by reference.

Obesity is a public health problem, which is both serious and widespread. One third of the population in industrialized countries has an excess weight of at least 20% relative to the ideal weight. This phenomenon has spread to the developing world, particularly to the regions of the globe where economies are modernizing. As of the year 2000, there were an estimated 300 million obese people worldwide.

Obesity considerably increases the risk of developing cardiovascular or metabolic diseases. For an excess weight greater than 30%, the incidence of coronary diseases is doubled in subjects under 50 years of age. Studies carried out for other diseases are equally revealing. For an excess weight of 20%, the risk of high blood pressure is doubled. For an excess weight of 30%, the risk of developing non-insulin dependent diabetes is tripled, and the incidence of dyslipidemia increased six fold. The list of additional diseases promoted by obesity is long; abnormalities in hepatic function, digestive pathologies, certain cancers, and psychological disorders are prominent among them.

Treatments for obesity include restriction of caloric intake, and increased caloric expenditure through physical exercise. However, the treatment of obesity by dieting, although effective in the short-term, suffers from an extremely high rate of recidivism. Treatment with exercise has been shown to be relatively ineffective when applied in the absence of dieting. Other treatments include gastrointestinal surgery or agents that limit the absorption of dietary lipids. These strategies have been largely unsuccessful due to side-effects of their use.

Clearly there remains a need for novel treatments that are useful for reducing body weight in humans. Therapies that can be administered to promote lipolysis and weight loss would help to control obesity and thereby alleviate many of the negative consequences associated with this condition.

5

DESCRIPTION OF THE INVENTION

Introduction

The present invention fills the need for a novel therapy to promote weight loss. 10 The present invention is comprised of administering corticotroph-derived glycoprotein hormone (CGH) to an individual to promote weight loss and in particular to promote lipolysis. The present invention is further comprised of a method for treating type-2 diabetes in an individual comprising administering a pharmaceutically effective amount of CGH to said individual. In another embodiment the present invention is 15 comprised of a method for improving insulin sensitivity in an individual comprising administering a pharmaceutically effective amount of CGH to said individual.

Herein we disclose methods that are useful for the treatment of obesity. As described below, the ability to stimulate lipolysis in adipose tissue provides a means of intervening in a wide number of pathologies associated with obesity. In particular, we 20 have discovered that CGH, when administered *in vitro* or *in vivo*, stimulates lipolysis. As a consequence, metabolic rate is increased, leading to decreased weight and increased insulin sensitivity.

When used to promote lipolysis, CGH can promote weight loss. The invented composition and methods are useful for treating conditions that include: obesity, 25 atherosclerosis associated with obesity, diabetes, hypertension associated with obesity or diabetes, or more generally the various pathologies associated with obesity.

In another aspect of the invention, this agent can be used for the maintenance of weight loss in individuals treated with other medicaments that induce weight loss.

A preferred embodiment of the invention is the treatment of non-insulin 30 dependent diabetes, especially that associated with obesity. In one embodiment, the use of CGH to treat non-insulin dependent diabetes is envisioned in non-obese individuals. Yet another aspect of the invention relates to the use of CGH to increase resting metabolic rate in individuals. In one embodiment of this aspect, individuals with low resting metabolic rate are administered CGH to promote lipolysis and increase energy 35 utilization.

Definitions and Terms

One aspect of the invention is the use of the novel glycoprotein hormone CGH to stimulate lipolysis. CGH is disclosed in International Patent Application No. PCT/US01/09999, publication no. WO 01/73034. It is comprised of an alpha subunit, glycoprotein hormone alpha2 (GPHA2), and a beta subunit, glycoprotein hormone beta 5 (GPHB5). GPHA2 was previously called Zsig51 (International Patent Application No. PCT/US99/03104, publication no. WO 99/41377 published August 19, 1999). SEQ ID NO: 1 is the human cDNA sequence that encodes the full-length polypeptide GPHA2, and SEQ ID NO:2 is the full-length polypeptide sequence of human GPHA2. SEQ ID NO:3 is the mature GPHA2 polypeptide sequence without the signal sequence. SEQ ID NO:4 is the human cDNA sequence that encodes the full-length GPHB5 polypeptide. SEQ ID NO: 5 is the full-length GPHB5 polypeptide. SEQ ID NO: 6 is the mature GPHB5 polypeptide without the signal sequence. SEQ ID NO: 7 is the human genomic DNA sequence that encodes the full-length GPHB5 polypeptide.

The present invention relates generally to methods that are useful for stimulating lipolysis in adipose tissue. Those having ordinary skill in the art will understand that lipolysis is the biochemical process by which stored fats in the form of triglycerides are released from fat cells as individual free fatty acids into the circulation. Stimulation of lipolysis has been clearly linked to increased energy expenditure in humans, and several strategies to promote lipolysis and increase oxidation of lipids have been investigated to promote weight loss and treat the diabetic state associated with obesity. These therapeutic efforts primarily focus on creating compounds that stimulate the sympathetic nervous system (SNS) through its peripheral β-adrenoreceptors. The discovery of CGH-promoted lipolysis in adipose tissue presents a novel and specific method of treating obesity, and the insulin-resistant diabetic state associated with obesity.

As used herein, the terms "obesity" and "obesity-related" are used to refer to individuals having a body mass which is measurably greater than ideal for their height and frame. Preferably these terms refer to individuals with body mass index values of greater than 20, more preferably with body mass index values of greater than 30, and most preferably with body mass index greater than 40.

Overview

Energy expenditure represents one side of the energy balance equation. In order to maintain stable weight, energy expenditure should be in equilibrium with energy intake. Considerable efforts have been made to manipulate energy intake (*i.e.*, diet and appetite) as a means of maintaining or losing weight; however, despite enormous sums of money devoted to these approaches, they have been largely unsuccessful. There have

also been efforts to increase energy expenditure pharmacologically as a means of managing weight control and treating obesity. Increasing energy metabolism is an attractive therapeutic approach because it has the potential of allowing affected individuals to maintain food intake at normal levels. Further, there is evidence to 5 support the view that increases in energy expenditure due to pharmacological means are not fully counteracted by corresponding increases in energy intake and appetite. See Bray, G. A. (1991) *Annu Rev Med* **42**, 205-216.

Energy expenditure can be stimulated pharmacologically by manipulation of the central nervous system, by activation of the peripheral efferents of the SNS, or by 10 increasing thyroid hormone levels. Much of the energy expended on a daily basis derives from resting metabolic rate (RMR), which comprises 50-80% of the total daily energy expenditure. For a review, see Astrup, A. (2000) *Endocrine* **13**, 207-212. Noradrenaline turnover studies have shown that most of the variability in RMR unexplained by body size and composition is related to differences in SNS activity, 15 suggesting that SNS activity does modulate RMR. See Snitker, S., et al. (2001) *Obes. Rev.* **1**, 5-15. Meal ingestion is accompanied by increased SNS activity, and studies have demonstrated that increased SNS activity in response to a meal accounts for at least part of meal-induced thermogenesis.

The peripheral targets of the SNS involved in the regulation of energy 20 utilization are the β -adrenoreceptors (β -AR's). These receptors are coupled to the second messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Elevation of cAMP levels leads to activation of protein kinase A (PKA), a multi-potent protein kinase and transcription factor eliciting diverse cellular effects. See Bourne, H. R., et al. (1991) *Nature* **349**, 117-127. Adipose tissue is highly innervated by the SNS, and possesses 25 three known subtypes of β -adrenoreceptors, β_1 , β_2 , and β_3 -AR. Activation of the SNS stimulates energy expenditure via coupling of these receptors to lipolysis and fat oxidation. Increased serum free fatty acids (FFAs) produced by adipose tissue and released into the bloodstream stimulate energy expenditure and increase thermogenesis. For a review, see Astrup, A. (2000) *Endocrine* **13**, 207-212. In addition, elevated PKA 30 levels increase energy utilization in fat by up-regulating uncoupling protein-1 (UCP-1), which creates a futile cycle in mitochondria, generating waste heat.

Over the past two decades, investigation of the physiological benefits of SNS activation for the treatment of obesity and diabetes related to obesity has centered on pharmacological activation of the β_3 -AR. Expression of the β_3 -AR is restricted to a 35 narrower range of tissues than the β_1 or β_2 isoforms, and is highly expressed in rodent adipose tissue compared to the other isoforms. Experimental work in rodents treated with β_3 -AR agonists has demonstrated that stimulation of lipolysis and fat oxidation

produces increased energy expenditure, weight loss, and increased insulin sensitivity. See de Souza, C. J. and Burkey, B. F. (2001) *Curr Pharm Des* **7**, 1433-1449. The potential benefits of these compounds have not been realized, however, due to their lack of efficacy at the human β_3 -AR. Further, it was only subsequently realized that the levels of β_3 -AR in rodent adipose tissue are much higher than in human adipose tissue. In human adipose tissue, the β_1 and β_2 isoforms represent the predominant adrenoreceptor isoforms. See Arch, J. R. (2002) *Eur J Pharmacol* **440**, 99-107. Thus, although the biochemical premise of stimulation of lipolysis for treatment of obesity has been clearly demonstrated, the mechanism for therapeutically producing the corresponding effects in humans is unrealized.

Strategies to promote lipid oxidation through lipolysis have demonstrated improved insulin sensitivity at doses that do not promote weight loss, and over time periods that do not affect body weight. It is not surprising that an insulin-sensitizing effect is more readily detectable than an anti-obesity effect. Stimulation of fat oxidation may rapidly lower the intracellular concentration of metabolites that modulate insulin signaling. The anti-obesity effect, by contrast, must develop gradually as large stores of fat are oxidized.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

20

Figure 1. Dose response of CGH and isoproterenol-induced lipolysis in 3T3 L1 adipocytes. Glycerol (panel A) and FFA (panel B) accumulations were determined following a 4-hour treatment with CGH (solid squares) or isoproterenol (solid triangles) at the indicated concentrations.

25

Figure 2. Stimulation of lipolysis *in vivo* by CGH. Mice (n=4, each group) were injected IP with vehicle saline, CGH (300 μ g/kg), or CL 316,243 (1mg/kg). Changes in serum glycerol (upper panel, A) and FFA (lower panel, B) over a 2-hour period as described in Example 3 are shown for each group.

30

CGH Promotes Elevation of cAMP in Adipose Tissue

CGH exerts its effects through interaction with the thyrotropin-stimulating hormone (TSH) receptor. See Nakabayashi, K., et al. (2002) *J Clin Invest* **109**, 1445-1452. The TSH receptor (TSHR) is a member of the G-protein coupled, seven transmembrane receptor superfamily. Activation of the TSH receptor leads to coupling

with heterotrimeric G proteins, which evoke downstream cellular effects. The TSH receptor has been shown to interact with G proteins of subtypes G_s, G_q, G₁₂, and G_i. In particular, interaction with G_s leads to activation of adenylyl cyclase and increased levels of cAMP. See Laugwitz, K. L., et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 116-120.

5 Although the presence of TSH receptors in adipose tissue has been the subject of controversy for some time, recent reports have documented the presence of TSHR in adipose tissue of humans and rodents. Se, Bell, A., et al. (2000) *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C335-340, and Endo, T., et al. (1995) *J Biol Chem* **270**, 10833-10837.

10 Example 1 demonstrates the production of elevated cAMP by CGH in cultured murine 3T3-L1 adipocytes and in primary human adipocytes. We have discovered that CGH produces activation of a luciferase reporter gene construct under the control of cAMP response element (CRE) enhancer sequences. We typically observe a 15-40 fold induction of the luciferase reporter gene in response to CGH treatment, indicating significant production of cAMP in adipocytes following activation of the TSHR. These 15 data suggest that CGH could be an important physiological regulator of adipose tissue lipolysis, which is primarily controlled by intracellular cAMP levels. For a review, see Astrup, A. (2000) *Endocrine* **13**, 207-212.

CGH Promotes Lipolysis in Adipocytes and Whole Animals

20 CGH was examined for its ability to activate lipolysis in cultured 3T3-L1 murine adipocytes. Following treatment of adipocytes for 4 hours, lipolysis was assessed by the accumulation of glycerol and FFA in the adipocyte culture medium. Treatment of adipocytes with 10 nM human recombinant CGH produced significantly elevated levels of extracellular glycerol and FFA. Example 2 compares the lipolytic 25 activity of CGH to isoproterenol, a non-specific β-adrenergic agonist. Maximal lipolysis achieved with CGH is at least 50% of that produced by isoproterenol. Lipolysis was significantly stimulated by CGH at concentrations of 0.1 nM, indicating that CGH is a potent regulator of lipolysis in adipocytes.

25 CGH also produced elevations in serum glycerol and FFA following IP injection into mice. As described in example 3, mice were fasted overnight before IP injection of either CGH (300 µg/kg), β3-AR agonist CL 316,243 (1 mg/kg), or vehicle saline. Serum was withdrawn before injection, or 2 hours post-injection. Although the vehicle controls showed decreases in serum glycerol and FFA levels, the animals treated with CGH showed significant elevations in both, indicating that CGH is a potent stimulator 35 of lipolysis in vivo.

Advantages of CGH as a Lipolysis Stimulating Agent

CGH presents a novel method of producing lipolysis and increasing metabolic rate. Other strategies employed thus far have suffered from lack of specificity, such as

- 5 β₁-AR agonists in general, or lack of efficacy, as for the most specific of the β₃-AR agonists developed thus far. Most of the agents investigated for human use have not exhibited sufficient selectivity and as a result, have produced increased blood pressure and heart rate due to activation of sympathetic pathways in tissues other than adipose.

See Arch, J. R. (2002) *Eur J Pharmacol* **440**, 99-107.

- 10 In spite of the emphasis on development of β₃-AR specific agonists, recent human studies have implicated the β₁- and β₂-adrenoreceptors as the primary mediators of sympathetically induced thermogenesis and energy expenditure. Further, studies in human obese populations suggest that decreases in resting metabolic rate observed in these individuals are the result of impaired function of β₂-adrenoreceptors in adipose tissue. See Schiffelers, S. L., et al. (2001) *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 2191-2199, and Blaak, E. E., et al. (1993) *Am J Physiol* **264**, E11-17. Thus, a novel mechanism of increasing lipolysis without invoking sympathetic innervation presents a unique opportunity for the treatment of obesity.

- 20 Other studies in human lean and obese subjects have found that increases in plasma FFA levels lead to similar increases in lipid oxidation and energy expenditure. These studies conclude that the accumulation of fat in obese subjects may be due to a defect in adipose tissue lipolysis rather than to defects in lipid utilization. See Schiffelers, S. L., et al. (2001) *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**, 33-38.

- 25 Increased adipose lipolysis and the resulting decrease in adipocyte size are negatively correlated with insulin resistance in human cross-sectional studies. See Weyer, C., et al. (2000) *Diabetologia* **43**, 1498-1506. Thus a method for stimulating lipolysis and reducing adipocyte size is predicted to decrease the insulin-resistant diabetic state associated with obesity. The presence of significant numbers of CGH receptors in adipose tissue represents a novel method for the control of lipolysis and

- 30 RMR in human obese populations.

Use of CGH to Treat Type-2 Diabetes

CGH can also be administered to treat type-2 diabetes mellitus (Type II DM).

Type II DM is usually the type of diabetes that is diagnosed in patients older than 30

- 35 years of age, but it also occurs in children and adolescents. It is characterized clinically

by hyperglycemia and insulin resistance. Type II DM is commonly associated with obesity, especially of the upper body (visceral/abdominal), and often occurs after weight gain.

- Type II DM is a heterogeneous group of disorders in which hyperglycemia results from both an impaired insulin secretory response to glucose and a decreased insulin effectiveness in stimulating glucose uptake by skeletal muscle and in restraining hepatic glucose production (insulin resistance). The resulting hyperglycemia may lead to other common conditions, such as obesity, hypertension, hyperlipidemia, and coronary artery disease.

CGH can be administered to an individual at dosages described below. CGH can also be administered in conjunction with insulin, and other diabetic drugs such as tolbutamide, chlorpropamide, acetohexamide, tolazamide, glyburide, gliclazide, glimepiride, metformin, acarbose, troglitazone and repaglinide.

15 **Formulations and Administration of CGH**

CGH can be administered to a human patient, alone or in pharmaceutical compositions where it is mixed with suitable carriers or excipient(s) at therapeutically effective doses to treat or ameliorate diseases associated with obesity and diabetes. Treatment dosages of CGH should be titrated to optimize safety and efficacy. Methods for administration include intravenous, intraperitoneal, rectal, intranasal, subcutaneous, and intramuscular. Pharmaceutically acceptable carriers will include water, saline, and buffers, to name just a few. Dosage ranges would ordinarily be expected from 0.1µg to 0.1mg per kilogram of body weight per day. A useful dose to try initially would be 25 µg/kg per day. However, the doses may be higher or lower as can be determined by a medical doctor with ordinary skill in the art. For a complete discussion of drug formulations and dosage ranges see *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th Ed., (Mack Publishing Co., Easton, Penn., 1990), and *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed. (Pergamon Press 1996).

Example 1**CGH Activation of 3T3 L1 Adipocytes and Human Adipocytes Results in cAMP Production****Summary**

5 Differentiated murine 3T3 L1 adipocytes and primary human adipocytes were used to study signal transduction of CGH. 3T3 L1 fibroblasts were differentiated into adipocytes and the cells were transduced with recombinant adenovirus containing a reporter construct, a firefly luciferase gene under the control of cAMP response element (CRE) enhancer sequences. This assay system detects cAMP-mediated gene induction 10 downstream of activation of G_s-coupled G-protein coupled receptors (GPCR's). Treatment of the differentiated 3T3 L1 cells with isoproterenol, a β-adrenoreceptor agonist, resulted in elevation of cAMP levels and an 80-fold induction of luciferase expression. Treatment of differentiated 3T3 L1 cells with CGH also resulted in elevated cAMP levels and a 27-fold induction of luciferase expression. In a separate 15 experiment, undifferentiated 3T3 L1 fibroblasts were transduced with the recombinant adenovirus. Treatment of the fibroblasts with CGH did not result in an increase in reporter gene induction. In another experiment, human primary adipocytes were also transduced with the recombinant adenovirus containing a reporter construct. Treatment of the human adipocytes with isoproterenol produced a 17-fold induction of luciferase 20 expression. Treatment of the human adipocytes with CGH resulted in a 14-fold induction of the reporter gene. These results demonstrate CGH signaling through a GPCR in murine adipocytes and human adipocytes, and the production of cAMP levels similar to those achieved through β-adrenoreceptor stimulation.

25 Experimental Procedure

3T3 L1 cells were obtained from the ATCC (CL-173) and cultured in growth medium as follows: the cells were propagated in DMEM high glucose (Life Technologies, cat. # 11965-092) containing 10% bovine calf serum (JRH Biosciences, cat. # 12133-78P). Cells were cultured at 37°C in an 8% CO₂ humidified incubator. Cells were seeded to 30 collagen-coated 96-well plates (Becton Dickinson, cat. # 356407) at a density of 5,000 cells per well. Two days later, differentiation medium was added as follows: DMEM high glucose containing 10% fetal bovine serum (Hyclone, cat. # SH30071), 1 µg/ml insulin, 1 µM dexamethasone, and 0.5 mM 3-isobutyl-methyl xanthine (ICN, cat. #195262). The cells were incubated at 37°C in 8% CO₂ for 4 days and the medium 35 replaced with DMEM high glucose containing 10% fetal bovine serum and 1 µg/ml insulin. The cells were incubated at 37°C in 8% CO₂ for 3 days, then the medium was

replaced with DMEM high glucose containing 10% fetal bovine serum. The cells were incubated at 37°C in 8% CO₂ for 3 days, and the medium was replaced with DMEM low glucose (Life Technologies, cat. # 12387-015) containing 10% fetal bovine serum. The day before the assay, the cells were rinsed with F12 Ham (Life Technologies, cat. # 12396-016) containing 2 mM L-glutamine (Life Technologies, cat. # 25030-149), 0.5% bovine albumin fraction V (Life Technologies, cat. # 15260-037), 1 mM MEM sodium pyruvate (Life Technologies, cat. # 11360-070), and 20 mM HEPES. Cells were transduced with AV KZ55, an adenovirus vector containing KZ55, a CRE-driven luciferase reporter cassette, at 5,000 particles per cell. Following overnight incubation, 10 the cells were rinsed once with assay medium (F12 HAM containing 0.5% bovine albumin fraction V, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 20 mM HEPES). 50 µl of assay medium were added to each well followed by 50 µl of 2X concentrated test protein. The plate was incubated at 37°C at 5% CO₂ for 4 hours. Medium was removed from the plate and the cells were lysed with 25 µl per well of 1X cell culture 15 lysis reagent supplied in a luciferase assay kit (Promega, cat. # E4530). The cells were incubated at room temperature for 15 minutes. Luciferase activity was measured on a microplate luminometer (PerkinElmer Life Sciences, Inc., model LB 96V2R) following automated injection of 40 µl of luciferase assay substrate into each well. The method described above, with modifications, was also used to test CGH and isoproterenol on 20 human adipocytes obtained from Stratagene (cat. # 937236) seeded in 96-well plates. Human adipocytes were rinsed once with basal medium (Stratagene, cat. # 220002) containing 0.5% bovine albumin fraction V, then transduced with AV KZ55 at 5,000 particles per cell. Following overnight incubation, the cells were rinsed once with assay medium comprised of basal medium containing 0.5% bovine albumin fraction V and 25 assayed as described above.

Example 2
CGH-Induced Lipolysis in 3T3 L1 Adipocytes

30 **Summary**

3T3 L1 Adipocytes were treated with CGH and the non-specific β-adrenoreceptor agonist isoproterenol for 4 hours. Lipolysis was assessed by the accumulation of glycerol and FFAs in the conditioned medium. Figure 1 displays dose-response curves of CGH and isoproterenol for glycerol (panel A) and FFA (panel B). CGH potently 35 stimulated lipolysis in the murine adipocytes, as shown in Figure 1.

*Measurement of free fatty acids in conditioned media from differentiated 3T3 L1**Cells*

Free fatty acids were measured using the Wako NEFA C kit for quantitative determination of non-esterified (or free) fatty acids with a modified protocol. Isoproterenol (ICN), a lipolysis-inducing positive control, was diluted to a starting concentration of 2 μ M in assay medium (Life Technologies low glucose DMEM, 1mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, and 0.5% BSA). The isoproterenol was further diluted in half log serial dilutions. CGH was serially diluted down to 0.06 nM. Medium was removed from 3T3 L1 adipocytes in 96-well plates. 50 μ l of assay medium were added to each well, followed by 50 μ l of CGH or isoproterenol to each well. The plates were incubated for 4 hours at 37 degrees. 40 μ l of conditioned medium were collected for glycerol assay analysis, and 40 μ l of conditioned medium were collected for free fatty acid analysis. Oleic acid (Sigma) was dissolved in methanol and used as a reference for determining the amount of free fatty acids in the conditioned media. Wako reagents A and B were reconstituted to 4X the recommended concentration. Conditioned media samples were assayed in 96-well plates. 50 μ l of Wako reagent A were added to 5 μ l of oleic acid standard plus 40 μ l of assay medium. 50 μ l of Wako reagent A were added to 40 μ l of conditioned medium from differentiated 3T3 L1 cells and 5 μ l of methanol. The 96-well plates were incubated at 37° C for 10 minutes. 100 μ l of Wako reagent B were added to each well. The 96-well plates were incubated at 37 degrees for 10 minutes. The 96-well plates were then allowed to sit at room temperature for 5 minutes. The 96-well plates were centrifuged in a Beckman Coulter Allegra 6R centrifuge at 3250Xg for 5 minutes to remove air bubbles. The absorbance at 530 nm was measured on the Wallac Victor2 Multilabel counter.

Measurement of glycerol in conditioned media from differentiated 3T3 L1 cells

Glycerol was measured in conditioned media using the Sigma Triglyceride (GPO-Trinder) kit with a modified protocol. Isoproterenol was diluted to a starting concentration of 2 μ M. The isoproterenol was further diluted in half log serial dilutions. CGH was diluted to starting concentrations of 300 nM in assay medium. CGH was then serially diluted down to 0.06 nM. Medium was removed from 3T3 L1 adipocytes in 96-well plates. 50 μ l of assay medium were added to each well, followed by 50 μ l of CGH or isoproterenol to each well. The plates were incubated for 4 hours at 37 degrees. 40 μ l of conditioned medium were collected for glycerol assay analysis, and 40 μ l of conditioned medium were collected for free fatty acid analysis. The

glycerol standard was diluted in water to a range from 200 nmols/10 µl to 0.25 nmols/10 µl. Glycerol was used as a reference for determining the amount of glycerol in the conditioned media. Sigma reagent A was reconstituted to the recommended concentration. Conditioned media samples were assayed in 96-well plates. 150 µl of 5 Sigma reagent A were added to 10 µl of glycerol standard plus 40 µl of assay medium. 150 µl of Sigma reagent A were added to 40 µl of conditioned medium from differentiated 3T3 L1 cells plus 10 µl of water. The 96-well plates were incubated for 15 minutes at room temperature. The 96-well plates were centrifuged in a Beckman Coulter Allegra 6R centrifuge at 3250Xg for 5 minutes to remove air bubbles. The 10 absorbance at 530 nm was measured on the Wallac Victor2 Multilabel counter.

Example 3
Stimulation of Lipolysis by CGH in Vivo

Summary

15 CGH, the β_3 -adrenoreceptor agonist CL 316,243 (CL), and saline vehicle were examined for stimulation of lipolysis in mice following an overnight fast. Mice (n=4) were bled immediately before IP injection of CGH (300 µg/kg), CL (1 mg/kg), or vehicle, and then sacrificed 2 hours later. Lipolysis was assessed as the percent change in serum glycerol or FFA over the 2 hour period. Figure 2 shows the changes in 20 glycerol (upper panel) and FFA (lower panel) for the treatment groups. The serum glycerol and FFA for the vehicle groups decreased by 7% +/- 9% and 24% +/- 15%, respectively. The serum glycerol for the CGH group increased by 57% +/- 20%; p=0.0254, and the FFA levels increased 25% +/- 5%; p=0.0188. The serum glycerol for the CL group increased 168% +/- 23%; p=0.0004, and the FFA increased 82% +/- 16%; 25 p=0.0029.

Treatment Protocol

C57 BL/6 male mice, age 19 weeks, were grouped to normalize weight (n=4 for each treatment; average group weight = 37.8 g +/- 0.4 g). Mice were housed individually for 30 18 hours prior to treatment, at which time food was withdrawn, with free access to water given. At approximately 8 a.m., the subjects were anesthetized with halothane and blood samples taken by retro-orbital eye bleed. The blood was allowed to clot, and the serum was separated by centrifugation and frozen for later analysis. Test substances were administered by IP injection in a volume of 0.1 ml, and the animals replaced in

their cages for 2 hours with free access to water. At 2 hours, the mice were sacrificed and blood drawn by cardiac puncture.

Measurement of glycerol and FFA in murine serum

- 5 For measuring free fatty acids in serum, the method previously described for measuring free fatty acids in conditioned media was followed, with the following modifications. Wako reagents A and B were reconstituted to 2X the recommended concentration. 75 µl of Wako reagent A were added to 5 µl of oleic acid standard plus 5 µl of water. 75 µl of Wako reagent A were added to 5 µl of serum plus 5 µl of methanol (to mirror the 10 oleic acid standard conditions). The 96-well plates were incubated at 37° degrees for 10 minutes. 150 µl of Wako reagent B were added to each well. The 96-well plates were incubated at 37° C for 10 minutes. The 96-well plates were allowed to sit at room temperature for 5 minutes. The 96-well plates were centrifuged in a Beckman Coulter Allegra 6R centrifuge at 3250Xg for 5 minutes to remove air bubbles. The absorbance 15 at 530 nm was measured on the Wallac Victor2 Multilabel counter.
- For measuring glycerol in serum, the method previously described for measuring glycerol in conditioned media was followed, with the modifications described below. Sigma reagent A was reconstituted to 0.5X the recommended concentration. 200 µl of Sigma reagent A were added to 10 µl of glycerol standard. 200 µl of Sigma reagent A 20 were added to 5 µl of serum plus 5 µl of water. The 96-well plates were incubated for 15 minutes at room temperature. The 96-well plates were centrifuged in a Beckman Coulter Allegra 6R centrifuge at 3250Xg for 5 minutes to remove air bubbles. The absorbance at 530 nm was measured on the Wallac Victor2 Multilabel counter.

25

Example 4
Expression and purification of recombinant CGH

Summary

- A Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line overexpressing both GPHA2 and GPHB5, 30 the subunits of CGH, was generated and named CHO 180. CHO 180 was found to secrete active, heterodimeric CGH. CGH was purified from the supernatant of CHO 180 using standard biochemical techniques.

Generation of CHO 180

- 35 The CGH-producing cell line CHO 180 was generated in two stages. A construct expressing GPHA2, GPHB5 and drug resistance (dihydrofolate reductase) from the CMV promoter was transfected to protein-free CHO DG44 cells (PF CHO) by

electroporation. The resulting pool was selected and amplified using methotrexate. Early analysis indicated a high level of GPHA2 expression, but a low level of GPHB5 expression. Therefore, a second construct expressing GPHB5 from the CMV promoter and zeocin resistance from the SV-40 promoter was transfected into the selected, 5 amplified pool by electroporation. After zeocin selection, the final pool (CHO 180) expressed significant levels of both GPHA2 and GPHB5; the proteins were secreted as the non-covalent heterodimer, CGH.

Purification of CGH from CHO culture supernatant

10 CGH was purified from CHO culture supernatant by established chromatographic procedures: first the CGH was captured on a strong cation exchanger, POROS HS50; next it was affinity purified using ConA Sepharose; and finally was polished and buffer-exchanged into PBS by Superdex 75 size exclusion chromatography.

15 **Cation Exchange Chromatography**
The CHO culture supernatant was 0.2 μ m filtered and adjusted to pH 6 and 20 mM 2-Morpholinoethanesulfonic Acid (MES). The CGH in the adjusted supernatant was captured at 55 cm/hr using a 1:2 online dilution with 20 mM MES pH 6 onto a 20 POROS HS 50 column that was previously equilibrated in 20 mM MES pH 6. After loading was complete, the column was washed with 20 column volumes (CV) of equilibration buffer. This was followed by a 3 CV wash with 250 mM NaCl in 20 mM MES pH 6 at 90 cm/hr. Next the CGH was eluted from the column with 3 CV of 500 mM NaCl in 20 mM MES pH 6 at the same flow rate. Finally the column was stripped 25 with steps of 1M and 2M NaCl and then re-equilibrated with 20 mM MES pH 6. The 500 mM NaCl-eluted pool containing the CGH was adjusted with NaOH to pH 7.4 for the next step.

ConA Sepharose Chromatography

30 ConA Sepharose is Concanavalin A coupled to Sepharose. Concanavalin A is a lectin, which binds reversibly to molecules, which contain D-mannopyranosyl, D-glucopyranosyl and related residues. The adjusted pool of CGH from the cation exchange chromatography was applied directly at 2 cm/hr to the ConA column equilibrated in 20 mM Tris pH 7.4 containing 0.5 M NaCl. After loading, the column 35 was washed with 20 CV of equilibration buffer. The CGH was then competed off the column at 1-2 cm/hr with 3 CV of 0.5M Methyl-D-Manno-Pyranoside in 20 mM Tris

pH 7.4. This CGH pool was concentrated via ultrafiltration using an Amicon stirred cell with a 5kDa-cutoff membrane.

Size-Exclusion Chromatography

The concentrated CGH ConA pool was then applied to an appropriately sized bed of Superdex 75 resin (i.e. $\leq 5\%$ of bed volume) for removal of remaining HMW contaminants and for buffer exchange into PBS. The CGH eluted from the Superdex 75 column at about 0.65 to 0.7 CV and was concentrated for storage at -80°C using the Amicon stirred cell with a 5kDa-cutoff ultrafiltration membrane. The heterodimeric protein was pure by Coomassie-stained SDS PAGE, had the correct NH₂ termini, the correct amino acid composition, and the correct mass by SEC MALS. The overall process recovery estimated by RP HPLC assay was 50-60%.

WO 03/006051

PCT/US02/22747

16

CLAIMS

We claim:

1. A method for inducing lipolysis in an individual comprising administering a pharmaceutically effective amount of corticotroph-derived glycoprotein hormone (CGH) to said individual, wherein CGH is a heterodimeric protein comprised of the polypeptides of SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:6.
2. A method for inducing weight loss in an individual comprising administering a pharmaceutically effective amount of CGH to said individual.
3. A method for treating type-2 diabetes in an individual comprising administering a pharmaceutically effective amount of CGH to said individual.
4. A method for improving insulin sensitivity in an individual comprising administering a pharmaceutically effective amount of CGH to said individual.
5. The method of claim 4 wherein said individual is obese.

Figure 1

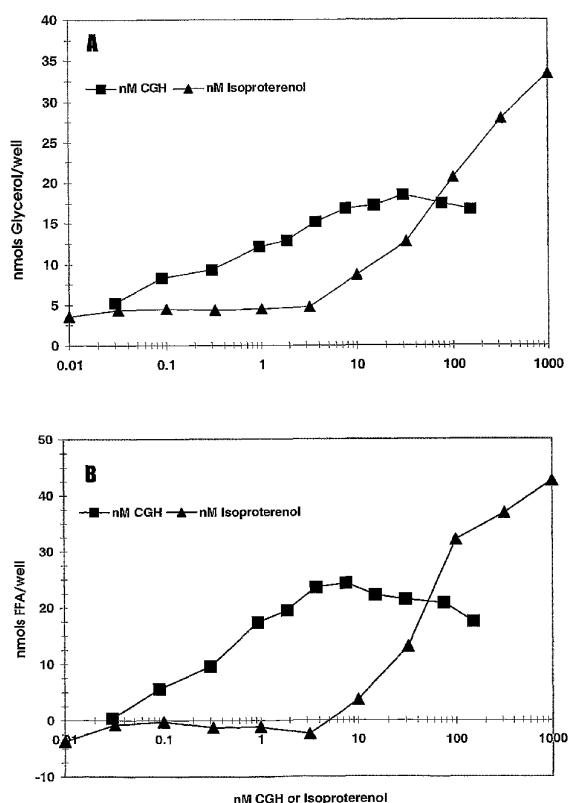
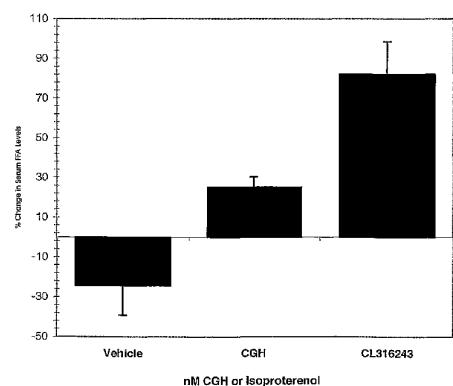
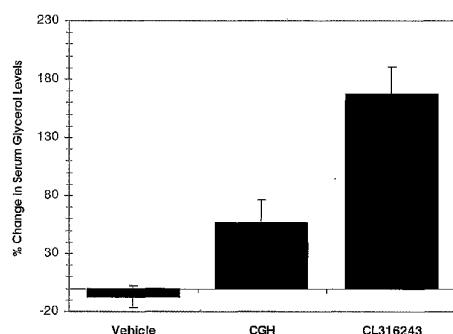


Figure 2



nM CGH or Isoproterenol

WO 03/006051

1/9

PCT/US02/22747

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> USE OF CORTICOTROPH-DERIVED GLYCOPROTEIN
HORMONE TO INDUCE LYPOLYSIS

<130> 01-16PC

<150> 60/305,284
<151> 2001-07-13

<160> 11

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 746
<212> DNA
<213> Homo sapiens<220>
<221> CDS
<222> (56)...(442)

<400> 1

ccagcaggag gcacaggaaa actgcaagcc gctctgttcc tgggcctcgaa	aagtgcatg	58
	Met	
	1	

cctatgcgtccctcaaaccctgttccttatctgtctgtgcgtgcgtgc	Pro Met Ala Ser Pro Gln Thr Leu Val Leu Tyr Leu Leu Val Leu Ala	106
5	10	15

gtcactgaagccatggggcagggatgcatccatggatgcactttg	Val Thr Glu Ala Trp Gly Gln Glu Ala Val Ile Pro Gly Cys His Leu	154
20	25	30

cacccttcaatgtgacaatgtgcggatgcacccggaccatgcacag		202
--	--	-----

WO 03/006051

2/9

PCT/US02/22747

His Pro Phe Asn Val Thr Val Arg Ser Asp Arg Gln Gly Thr Cys Gln			
35	40	45	
ggc tcc cac gtg gca cag gcc tgt gtg ggc cac tgt gag tcc agc gcc			250
Gly Ser His Val Ala Gln Ala Cys Val Gly His Cys Glu Ser Ser Ala			
50	55	60	65
ttc cct tct cgg tac tct gtg ctg gtg gcc agt ggt tac cga cac aac			298
Phe Pro Ser Arg Tyr Ser Val Leu Val Ala Ser Gly Tyr Arg His Asn			
70	75	80	
atc acc tcc gtc tct cag tgc tgc acc atc agt ggc ctg aag aag gtc			346
Ile Thr Ser Val Ser Gln Cys Cys Thr Ile Ser Gly Leu Lys Lys Val			
85	90	95	
aaa gta cag ctg cag tct gtg ggg agc cgg agg gag gag ctc gag atc			394
Lys Val Gln Leu Gln Cys Val Gly Ser Arg Arg Glu Glu Leu Glu Ile			
100	105	110	
ttc acg gcc agg gcc tgc cag tgt gac atg tgt cgc ctc tct cgc tac			442
Phe Thr Ala Arg Ala Cys Gln Cys Asp Met Cys Arg Leu Ser Arg Tyr			
115	120	125	
tagcccatcc ttcccccctcc ttcccccctt gggtcacagg gcttgacatt ctgggggggg			502
aaacctgtgt tcaagattca aaaactggaa ggagctcccg ccctgtatgt tacttgtat			562
ggaatttttt taataaaaggg gagggtttgtt ccagctttga tcctttgtaa gattttgtaa			622
ctgtcacctg ayaagagggg agtttttgtt ctcccccgtc ctctgcctgg ccctttctaaa			682
ccaaatcttc atcattttac ttccctcttt gccttaccc ctaataaaag caagcgttca			742
tttga			746
<210> 2			
<211> 129			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 2			
Met Pro Met Ala Ser Pro Gln Thr Leu Val Leu Tyr Leu Leu Val Leu			
1	5	10	15
Ala Val Thr Glu Ala Trp Gly Gln Glu Ala Val Ile Pro Gly Cys His			
20	25	30	
Leu His Pro Phe Asn Val Thr Val Arg Ser Asp Arg Gln Gly Thr Cys			
35	40	45	

WO 03/006051

3/9

PCT/US02/22747

Gln Gly Ser His Val Ala Gln Ala Cys Val Gly His Cys Glu Ser Ser
50 55 60
Ala Phe Pro Ser Arg Tyr Ser Val Leu Val Ala Ser Gly Tyr Arg His
65 70 75 80
Asn Ile Thr Ser Val Ser Gln Cys Cys Thr Ile Ser Gly Leu Lys Lys
85 90 95
Val Lys Val Gln Leu Gln Cys Val Gly Ser Arg Arg Glu Glu Leu Glu
100 105 110
Ile Phe Thr Ala Arg Ala Cys Gln Cys Asp Met Cys Arg Leu Ser Arg
115 120 125
Tyr

<210> 3
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Gln Glu Ala Val Ile Pro Gly Cys His Leu His Pro Phe Asn Val Thr
1 5 10 15
Val Arg Ser Asp Arg Gln Gly Thr Cys Gln Gly Ser His Val Ala Gln
20 25 30
Ala Cys Val Gly His Cys Glu Ser Ser Ala Phe Pro Ser Arg Tyr Ser
35 40 45
Val Leu Val Ala Ser Gly Tyr Arg His Asn Ile Thr Ser Val Ser Gln
50 55 60
Cys Cys Thr Ile Ser Gly Leu Lys Lys Val Lys Val Gln Leu Gln Cys
65 70 75 80
Val Gly Ser Arg Arg Glu Glu Leu Glu Ile Phe Thr Ala Arg Ala Cys
85 90 95
Gln Cys Asp Met Cys Arg Leu Ser Arg Tyr
100 105

<210> 4
<211> 390
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(390)

WO 03/06051

PCT/US02/22747

4/9

<400> 4
atg aag ctg gca ttc ctc ttc ctt ggc ccc atg gcc ctc ctc ctt ctg 48
Met Lys Leu Ala Phe Leu Phe Leu Gly Pro Met Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
gct ggc tat ggc tgt gtc ctc ggt gcc tcc agt ggg aac ctg cgc acc 96
Ala Gly Tyr Gly Cys Val Leu Gly Ala Ser Ser Gly Asn Leu Arg Thr
20 25 30
ttt gtg ggc tgt gcc gtg agg gag ttt act ttc ctg gcc aag aag cca 144
Phe Val Gly Cys Ala Val Arg Glu Phe Thr Phe Leu Ala Lys Lys Pro
35 40 45
ggc tgc agg ggc ctt cgg atc acc acg gat gcc tgc tgg ggt cgc tgt 192
Gly Cys Arg Gly Leu Arg Ile Thr Thr Asp Ala Cys Trp Gly Arg Cys
50 55 60
gag acc tgg gag aaa ccc att ctg gaa ccc ccc tat att gaa gcc cat 240
Glu Thr Trp Glu Lys Pro Ile Leu Glu Pro Pro Tyr Ile Glu Ala His
65 70 75 80
cat cga gtc tgt acc tac aac gag acc aaa cag gtg act gtc aag ctg 288
His Arg Val Cys Thr Tyr Asn Glu Thr Lys Gin Val Thr Val Lys Leu
85 90 95
ccc aac tgt gcc ccg gga gtc gac ccc ttc tac acc tat ccc gtg gcc 336
Pro Asn Cys Ala Pro Gly Val Asp Pro Phe Tyr Thr Tyr Pro Val Ala
100 105 110
atc cgc tgt gac tgc gga gcc tgc tcc act gcc acc acg gag tgt gag 384
Ile Arg Cys Asp Cys Gly Ala Cys Ser Thr Ala Thr Thr Glu Cys Glu
115 120 125
acc atc 390
Thr Ile
130

<210> 5
<211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens

WO 03/06051

5/9

PCT/US02/22747

<400> 5
Met Lys Leu Ala Phe Leu Phe Leu Gly Pro Met Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ala Gly Tyr Gly Cys Val Leu Gly Ala Ser Ser Gly Asn Leu Arg Thr
20 25 30
Phe Val Gly Cys Ala Val Arg Glu Phe Thr Phe Leu Ala Lys Lys Pro
35 40 45
Gly Cys Arg Gly Leu Arg Ile Thr Thr Asp Ala Cys Trp Gly Arg Cys
50 55 60
Glu Thr Trp Glu Lys Pro Ile Leu Glu Pro Pro Tyr Ile Glu Ala His
65 70 75 80
His Arg Val Cys Thr Tyr Asn Glu Thr Lys Gln Val Thr Val Lys Leu
85 90 95
Pro Asn Cys Ala Pro Gly Val Asp Pro Phe Tyr Thr Tyr Pro Val Ala
100 105 110
Ile Arg Cys Asp Cys Gly Ala Cys Ser Thr Ala Thr Thr Glu Cys Glu
115 120 125
Thr Ile
130

<210> 6
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Ala Ser Ser Gly Asn Leu Arg Thr Phe Val Gly Cys Ala Val Arg Glu
1 5 10 15
Phe Thr Phe Leu Ala Lys Lys Pro Gly Cys Arg Gly Leu Arg Ile Thr
20 25 30
Thr Asp Ala Cys Trp Gly Arg Cys Glu Thr Trp Glu Lys Pro Ile Leu
35 40 45
Glu Pro Pro Tyr Ile Glu Ala His His Arg Val Cys Thr Tyr Asn Glu
50 55 60
Thr Lys Gln Val Thr Val Lys Leu Pro Asn Cys Ala Pro Gly Val Asp
65 70 75 80
Pro Phe Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Ile Arg Cys Asp Cys Gly Ala Cys
85 90 95
Ser Thr Ala Thr Thr Glu Cys Glu Thr Ile
100 105

<210> 7
<211> 5605

WO 03/006051

PCT/US02/22747

6/9

<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

WO 03/006051

PCT/US02/22747

7/9

WO 03/006051

PCT/US02/22747

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
tcagaacaaa atcagaggaa tc 22

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 9
ggccatccgatccatccgtgc 22

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 10
atccccatcc acacccggggc

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

WO 03/006051

9/9

PCT/US02/22747

<400> 11
ccgtttgcat atactttct gag

23

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/22747
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) A61K 55/18 US CL 514/9, 12 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) U.S. : 514/9, 12		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/40291 A2 (CURAGEN CORPORATION) 07 JUNE 2001 (07-06-2001), pages 2, 4, 49-51 and 74.	1-5
Y	WO 00/78964 A1 (AMGEN INC.) 28 DECEMBER 2000 (28-12-2000), pages 2, 4, 9-10 and 65-68.	1-5
Y	WO 99/41377 A1 (ZYMOGENETICS, INC.) 19 AUGUST 1999 (19-08-99), pages 11-12, 26 and 35.	1-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See parent family annex.		
* Special categories of cited documents "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "N" 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 "E" another document published on or after the international filing date "X" document of particular relevance; the claimed inventiveness cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "L" document which contains details on patentable claim(s) or which is cited to support the application date of another citation or other special reason (as specified) "Y" document of particular relevance; the claimed inventiveness cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other specific documents, this combination being obvious to a person skilled in the art "O" document referring to an oral disclosure, oral exhibition or other means "G" document member of the same patent family "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 24 SEPTEMBER 2002	Date of mailing of the international search report 12 DEC 2002	
Name and mailing address of the ISA/US U.S. Patent and Trademark Office Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-8290	Authorized officer ROBERT C. HAYES, PH.D. Telephone No. (703) 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. PCT/US02/22747	
B. FIELDS SEARCHED Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used) MEDLINE, BIOSIS, USPATFULL, PCTFULL, GENCORE search terms: corticotroph-derived glycoprotein hormone, CGH, heterodimer##, lipolysis, weight loss, diabet##, insulin, obes##	

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1998)*

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
// C 1 2 N 15/09 C 1 2 N 15/00 Z N A A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ケリー,ジェイムズ ディー.

アメリカ合衆国,ワシントン 98040,マーサー アイランド,ウエスト マーサー ウェイ
3330

(72)発明者 ウエブスター,フィリップ ジェイ.

アメリカ合衆国,ワシントン 98103,シアトル,デンズモア アベニュー ノース 4317

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA01 CA04 DA02 EA04 GA14

4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA21 DB01 MA17 MA59 MA60 MA66
NA14 ZA422 ZA452 ZA702 ZC032 ZC332 ZC352