



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02820403.4

[43] 公开日 2005 年 1 月 26 日

[11] 公开号 CN 1571675A

[22] 申请日 2002.10.15 [21] 申请号 02820403.4

[30] 优先权

[32] 2001.10.15 [33] US [31] 60/329,947

[86] 国际申请 PCT/US2002/032874 2002.10.15

[87] 国际公布 WO2003/032810 英 2003.4.24

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.15

[71] 申请人 杰南技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 维尼塔·I·迪尔迈达

蒂莫西·A·斯图尔特

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

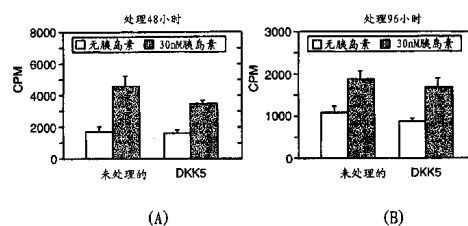
代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 3 页 说明书 39 页 附图 9 页

[54] 发明名称 胰岛素抵抗状态的治疗和诊断

[57] 摘要

本发明涉及给药有效量的 Dickkopf - 5 (Dkk - 5) 蛋白治疗涉及胰岛素抵抗的病症, 如非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM) 或肥胖症。本发明还提供了一种以 Dkk - 5 作为检测指标诊断胰岛素抵抗及相关病症的方法, 诊断和治疗用试剂盒, 以及生产抗 Dkk - 5 抗体的杂交瘤和包含 Dkk - 5 的制剂。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种治疗哺乳类动物胰岛素抵抗病症的方法，包括给药有此需要的哺乳动物有效量的 Dickkopf-5(Dkk-5)。
- 5 2. 权利要求 1 的方法，其中所述病症为非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)或肥胖症。
 3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中 Dkk-5 与图 2 的 SEQ ID NO:5 有至少约 85%的氨基酸序列同一性，或 Dkk-5 与 SEQ ID NO:5 的第 20 个残基至第 30 个残基和第 347 个残基之间的序列有至少约 85%的氨基酸序列同一性。
- 10 4. 权利要求 1-3 之一的的方法，其中 Dkk-5 包含图 2 的 SEQ ID NO:5 或包含 SEQ ID NO:5 的第 20 个残基至第 30 个残基和第 347 个残基之间的序列。
 5. 权利要求 1-6, 8, 9 或 11 之一的的方法，其中所述 Dkk-5 包含 SEQ ID NO:5 第 25 个残基和第 347 个残基之间的序列。
 6. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 Dkk-5 是 SEQ ID NO:5 的内部裂解蛋白片段，具有 N-末端序列 MALFDWTDYEDLK (SEQ ID NO:8)，分子量约 16 kDa；或者是含 SEQ ID NO:5 的 Dkk-5 和所述内部裂解蛋白片段的混合物；或者是含 SEQ ID NO:5 第 20 个残基至第 30 个残基和第 347 个残基之间的序列的 Dkk-5 和该内部裂解蛋白片段的混合物。
- 20 7. 权利要求 1-6 之一的的方法，进一步包含给药有效量的胰岛素抵抗治疗制剂。
 8. 权利要求 7 的方法，其中所述制剂为胰岛素、IGF-1 或磺酰脲。
 9. 一种检测哺乳动物胰岛素抵抗病症存在或发作的方法，包括以下步骤：
 - (a) 检测该哺乳动物的样品中 Dickkopf-5(Dkk-5)的量；
 - 25 (b) 比较步骤(a)检测到的 Dkk-5 量和标准品中 Dkk-5 的量，步骤(a)中检测到的 Dkk-5 的量下降提示胰岛素抵抗病症。
 10. 权利要求 9 的方法，其中所述检测用抗 Dkk-5 抗体进行免疫测定来完成。
 11. 权利要求 10 的方法，其中所述抗 Dkk-5 抗体包含标记物。
 - 30 12. 权利要求 11 的方法，其中所述标记物选自荧光标记物、放射性标记物或酶标记物。

13. 权利要求 9-12 之一的方法, 其中所述胰岛素抵抗病症为非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)或肥胖症。

14. 权利要求 9-13 之一的方法, 其中所述 Dkk-5 是包含 SEQ ID NO:5 的 Dkk-5; 或是包含 SEQ ID NO:5 第 20 个残基至第 30 个残基和第 347 个残基之间的序列的 Dkk-5; 或是 SEQ ID NO:5 的内部裂解蛋白片段, 其具有 N-末端序列 MALFDWTDYEDLK(SEQ ID NO:8), 分子量约 16 kDa; 或是含 SEQ ID NO:5 的 Dkk-5 和含 SEQ ID NO:5 第 20 个残基至第 30 个残基和第 347 个残基之间的序列的 Dkk-5, 它们两者的其中之一或它们两者与该裂解产物的混合物。

15. 一种用于检测胰岛素抵抗病症的存在或发作的诊断试剂盒, 该试剂盒包括:

(a) 包含与 Dickkopf-5(Dkk-5)结合的抗体的容器;

(b) 包含含有 Dkk-5 的标准品的容器; 和

(c) 用所述抗体和标准品检测所述病症的用法说明, 其中结合 Dkk-5 的所述抗体进行了可检测标记, 或该试剂盒进一步包括含有第二抗体的另一个容器, 所述第二抗体进行了可检测标记, 并能与 Dkk-5 结合, 或能与结合 Dkk-5 的抗体结合。

16. 权利要求 15 的试剂盒, 其中结合 Dkk-5 的抗体是单克隆抗体。

17. 权利要求 15 或 16 的试剂盒, 其中所述 Dkk-5 是包含 SEQ ID NO:5 的 Dkk-5; 或包含 SEQ ID NO:5 第 20 个残基至第 30 个残基和第 347 个残基之间的序列的 Dkk-5; 或是 SEQ ID NO:5 的内部裂解蛋白片段, 其具有 N-末端序列 MALFDWTDYEDLK (SEQ ID NO:8), 分子量约 16 kDa; 或是含 SEQ ID NO:5 的 Dkk-5 和含 SEQ ID NO:5 第 20 个残基至第 30 个残基和第 347 个残基之间的序列的 Dkk-5, 它们两者的其中之一或它们两者与该裂解产物的混合物。

18. 一种用于治疗胰岛素抵抗病症的试剂盒, 该试剂盒包括:

(a) 一个包含 Dkk-5 的容器; 和

(b) 用 Dkk-5 治疗所述病症的用法说明

19. 权利要求 18 的试剂盒, 其中所述病症为非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)或肥胖症。

20. 权利要求 18 或 19 的试剂盒, 其中所述容器是小玻璃瓶, 所述用法

说明规定把小玻璃瓶的内容物放进注射器里用于立即注射。

21. 权利要求 18-20 之一的试剂盒还包含了内有胰岛素抵抗治疗制剂的容器。

22. 权利要求 18-21 之一的试剂盒, 其中所述 Dkk-5 是包含 SEQ ID NO:5 的 Dkk-5; 或包含 SEQ ID NO:5 第 20 个残基至第 30 个残基和第 347 个残基之间的序列的 Dkk-5; 或是 SEQ ID NO:5 的内部裂解蛋白片段, 其具有 N-末端序列 MALFDWTDYEDLK (SEQ ID NO:8), 分子量约 16 kDa; 或是含 SEQ ID NO:5 的 Dkk-5 和含 SEQ ID NO:5 第 20 个残基至第 30 个残基和第 347 个残基之间的序列的 Dkk-5, 它们两者的其中之一或它们两者与该裂解产物的混合物。

23. 一种分离的 SEQ ID NO:5 内部裂解蛋白片段, 其具有 N-末端序列 MALFDWTDYEDLK (SEQ ID NO:8), 分子量约 16 kDa。

24. 一种包含权利要求 23 的蛋白片段和载体的组合物。

25. 权利要求 24 的组合物, 进一步包含了含 SEQ ID NO:5 的 Dickkopf-5(Dkk-5)或含 SEQ ID NO:5 第 20 个残基至第 30 个残基和第 347 个残基之间的序列的 Dkk-5。

26. 权利要求 24 或 25 的组合物, 其中所述 Dkk-5 包含 SEQ ID NO:5 第 25 个残基和第 347 个残基之间的序列。

27. 一种生产抗 Dkk-5 抗体的杂交瘤, 该杂交瘤选自 PTA-3090、PTA-3091、PTA-3092、PTA-3093、PTA-3094、PTA-3095 或 PTA-3096。

28. 一种由权利要求 27 的任一杂交瘤生产的抗体。

胰岛素抵抗状态的治疗和诊断

5 背景技术
发明领域

本发明提供了一种诊断和治疗疾病的方法，所述疾病涉及胰岛素抵抗，如非胰岛素依赖型或II型糖尿病和其它胰岛素抵抗状态，例如与肥胖症 (obesity)和老化相关的胰岛素抵抗状态。本发明尤其涉及应用 Dkk-5 治疗胰岛素抵抗病症。本发明还特别涉及到用 Dkk-5 的水平诊断胰岛素抵抗病症在怀疑患有胰岛素抵抗或相关病症，尤其是非胰岛素依赖型糖尿病的个体中的存在。

相关领域的描述

15 胰岛素抵抗定义为对给定剂量胰岛素的生物应答低于预期的生物应答。其与肥胖症普遍相关。确实，肥胖症的病理后果中多数被认为涉及胰岛素抵抗，包括高血压、高血脂和，最显著的，非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)。大多数 NIDDM 患者是肥胖的，而在 NIDDM 的发展进程中胰岛素抵抗是非常核心和早期的组成部分(Moller 等, New Eng. J.Med., 325:938 (1991))。研究
20 证明，在胰岛素抵抗病程中产生了受体后(post-receptor)异常，另外在该病的最初阶段胰岛素受体是下调的(Olefsky 等, in Diabetes Mellitus, Rifkin and Porte, Jr., Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4,1990), pp. 121-153)。

关于作为受体缺陷可能位点的葡萄糖转运系统的数个研究表明，在啮齿
25 类动物和人的胰岛素抵抗状态下，胰岛素敏感的葡萄糖转运体(Glut4)的数量和功能都是不足的(Garvey 等, Science, 245:60 (1989); Sivitz 等, Nature, 340:72 (1989); Berger 等, Nature, 340:70 (1989); Kahn *et al.*, J. Clin. Invest., 84:404 (1989); Charron 等, J. Biol. Chem., 265:7994 (1990); Dohm 等, Am. J. Physio., 260:E459(1991); Sinha 等, Diabetes, 40:472 (1991); Friedman 等, J. Clin. Invest.,
30 89:701 (1992)。胰岛素敏感的葡萄糖转运体的正常集合体(normal pool)的缺陷理论上可以致使个体胰岛素抵抗(Olefsky 等, in Diabetes Mellitus, 同上)。

但是,也有一些研究在人 NIDDM 中没有显示 Glut4 的下调,特别是在葡萄糖处理的主要部位肌肉中(Bell, *Diabetes*, 40:413 (1990); Pederson 等, *Diabetes*, 39:865 (1990); Handberget ai., *Diabetologia*, 33:625 (1990); Garvey 等, *Diabetes*, 41:465(1992))。

- 5 来自动物模型的体内研究和临床研究的证据提示,胰岛素信号传导通路中的中间物(intermediate)的表达和活性改变、胰岛素刺激葡萄糖转运率的改变、或 GLUT4 易位(translocation)到质膜的改变都可导致 II 型糖尿病的胰岛素抵抗(Zierath 等,*Diabetologia*, 43:821-835 (2000))。动物实验的结果表明,肌肉胰岛素信号缺陷改变了整个机体葡萄糖稳态(Saad 等, *J. Clin. Invest.*, 10 90:1839-1849(1992); Folli 等, *J. Clin. Invest.*, 92:1787-1794 (1993); Heydrick 等, *J. Clin. Invest.*, 91:1358-1366 (1993); Saad 等, *J. Clin. Invest.*, 92:2065-2072 (1993); Heydrick 等, *Am. J. Physio.*, 268:E604-612 (1995)), 胰岛素信号通路级联反应(cascade)中的中间物,包括 IR、IRS-1 和 PI 3-激酶的缺陷可导致胰岛素抵抗及 II 型糖尿病患者骨骼肌葡萄糖转运下降和胰岛素刺激的 GLUT4 易位减少。在一些研究中观察到 IRS-1(Saad 等, 1992, 同上; Saad 等, 1993, 同上; 15 Goodyear 等, *J. Clin. Invest.*, 95:2195-2204 (1995))、PI 3-激酶 (Anai 等, *Diabetes*, 47:13-23(1998))或 GSK-3 (Nikoulina 等, *Diabetes*, 49:263-271(2000))的表达改变,或 PKC θ (Chalfant 等, *Endocrinolog*, 141:2773-2778(2000)), 或 PTP1B(Dadke 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274:583-589 (2000))下降。
- 20 人们在一些 II 型糖尿病患者骨骼肌中也发现 IR(Arner 等,*Diabetologi*, 30:437-440(1987); Maegawa 等, *Diabetes*, 44:815-819(1991) ; Saad 等, 1992, 同上, Saad 等, 1993, 同上, Goodyear 等, 同上)、IRS-1(Saad 等, 1992, 同上 ; Saad 等, 1993, 同上; Goodyear 等, 同上)和 Akt(Krook 等, *Diabetes*, 47:1281-1286 (1998))的磷酸化作用降低。另外,资料显示 PI-3 激酶活性降低 25 (Saad 等, 1992, 同上; Heydrick 等, 1995, 同上; Saad 等, 1993, 同上; Goodyear 等, 同上; Heydrick 等, 1993, 同上; Folli 等, *Acta Diabetol.*, 33:185-192 (1996); Bjornholm 等, *Diabetes*, 46:524-527(1997); Andreelli 等, *Diabetologia*, 42:358-364 (1999); Kim 等, *J:Clin.Invest.*,104:733-741(1999); Andreelli F,等, *Diabetologia*, 43:356-363(2000); Krook 等, *Diabetes*, 49:284-292(2000))和 30 GSK-3(Eldar-Finkelman 等, *Diabetes*, 48:1662-1666 (1999))、PKC(Avignon 等, *Diabetes*, 45:1396- 1404 (1996))和 PTP1B (Dadke 等, 同上) 活性增高与 II 型

糖尿病相关。此外，糖尿病动物的骨骼肌中 PKC 亚型的分布发生变化 (Schmitz- Peiffer 等, *Diabetes*, 46:169-178 (1997)), 非肥胖型 Goto-Kakizaki (GK)糖尿病大鼠的 PKC α , PKC β , PKC ϵ , 和 PKC δ 含量在比目鱼肌的胞膜部分增高, 在胞质部分下降(Avignon 等, 同上)。

- 5 在有或没有 II 型糖尿病的胰岛素抵抗患者的骨骼肌中观察到 GLUT4 异常亚细胞定位(Vogt 等, *Diabetologia*, 35:456-463 (1992); Garvey 等, *J. Clin. Invest.*, 101:2377-2386 (1998)), 提示骨骼肌 GLUT4 的运输和易位缺陷可能引起胰岛素抵抗。体内和体外研究显示, 在一些 II 型糖尿病患者的骨骼肌中胰岛素刺激的葡萄糖转运率下降(Andreasson 等, *Acta Physiol. Scand.*, 10 142:255-260(1991); Zierath 等, *Diabetologia*, 37:270-277 (1994); Bonadonna 等, *Diabetes*, 45:915-925 (1996))。

- 虽然有症状的糖尿病诊断不困难, 但无症状疾病的检测存在许多问题。诊断通常可以通过空腹高血糖症来确定。对处于临界线的病例, 通常应用众所周知的葡萄糖耐量试验。然而, 一些证据表明, 口服葡萄糖耐量试验在相当程度上过多诊断(over-diagnoses)了糖尿病, 可能是由于来自多方面的紧张(通过肾上腺素释放介导的)可引发异常反应。为了克服这些困难, 国立卫生研究院的国家糖尿病资料小组推荐了口服葡萄糖后糖尿病的诊断标准(国家糖尿病资料小组(National Diabetes Data Group):糖尿病和其它类葡萄糖非耐受疾病的诊断和分类. *Diabetes*, 28:1039 (1979))。

- 20 糖尿病在整个人群中的发病率很难准确探知, 但是相信超过一千万的美国人受到这种病症的影响。糖尿病通常不能治愈只能控制。近年来, 很明显“糖尿病”这一综合术语包含一系列不同的综合征。这些综合征的临床表现和遗传模式都不相同。人们认为糖尿病这一术语适用于一系列具备本文所述特点的高血糖状态。

- 25 糖尿病分为两个基本类别: 原发的和继发的, 且包括葡萄糖耐量下降, 可以定义为一种与口服葡萄糖负荷后血葡萄糖水平异常升高有关的状态, 这种状态下血糖升高的程度不足以做出糖尿病的诊断。这类人发展成空腹高血糖症或有症状的糖尿病的危险度高于葡萄糖耐量正常的人, 尽管在个体患者这样的进展不能预测。事实上, 几项大的研究提示, 大多数葡萄糖耐量下降患者(大约 75%)没有发生糖尿病(Jarrett 等, *Diabetologia*. 16:25-30 (1979))。

- 30 动脉粥样硬化疾病的独立危险因子肥胖和高血压也同胰岛素抵抗有关。

通过联合使用胰岛素/葡萄糖夹(clamp)、葡萄糖示踪剂灌注和间接测热法发现,原发性高血压的胰岛素抵抗发生在外周组织(主要是肌肉),并且同高血压的严重程度直接相关(DeFronzo and Ferrannini, Diabetes Care 14:173 (1991))。在肥胖者的高血压中,胰岛素抵抗致使高胰岛素血症,这是作为通过产热来限制体重进一步增加的机制来产生的,但是胰岛素也增加了肾脏钠的重吸收,并刺激肾脏、心脏和血管的交感神经系统,产生高血压。现在认为胰岛素抵抗通常是胰岛素受体信号系统中胰岛素与受体结合后的位点上的缺陷造成的。已有的科学证据显示,对胰岛素有反应的主要组织(肌肉、肝脏、脂肪)中胰岛素抵抗强烈提示,胰岛素信号传导缺陷出现在这个级联反应的早期,特别是在胰岛素受体激酶的活性上,而这一激酶的活性显示是减少的(Haring, Diabetologi, 34:848(1991))。

值得注意的是,尽管有其它治疗途径,胰岛素治疗仍是许多II型糖尿病患者治疗的选择,特别是那些经历过初级饮食控制治疗失败者和非肥胖症患者,或是那些既经历过初级饮食控制治疗失败,又经历过之后的口服降糖药治疗失败的人。但是同样清楚的是,胰岛素治疗必须同坚持不懈的饮食控制和生活方式的改变相结合,这些是没有任何方法可以替代的。为了得到理想的结果,胰岛素治疗应当伴以自身血糖监测和糖基化血液蛋白的适当评估:不同的治疗方法胰岛素给药方式不同,可以用短效、中效或长效胰岛素,或一种以上的混合物,可以单次注射、两次注射和多次注射。对任何患者来说,最好的治疗方法必须是胰岛素治疗与每个患者监测的反应相适合的方法。

随着现代人们对严格控制血糖以避免长期糖尿病并发症的重要性的认识,使用胰岛素治疗II型糖尿病趋势在增加。然而,随后的(secondary)口服降糖药治疗失败的非肥胖症II型糖尿病患者,虽然胰岛素治疗可以成功地控制血糖,但决不能保证会有理想的反应(Rendell等, Ann. Int. Med., 90:195-197 (1979))。在一项研究中,58名服用最大剂量的口服降糖药未能很好控制血糖的非肥胖症患者,经客观证实,只有31人用单一胰岛素治疗方法血糖控制得到改善(Peacock等, Br. Med. J., 288:1958-1959 (1984))。对于随后的治疗失败的肥胖的糖尿病患者,情况就不那么简单了,因为在这种情况下胰岛素常常会增加体重,而体重的增加常伴随血糖控制的恶化。

因此,显然关于II型糖尿病治疗的认识和实践的现状不令人满意。大多数人经历了最初的(primary)饮食控制治疗的失败,而大多数肥胖的II型糖尿

病患者没能达到理想的体重。虽然在最初饮食控制治疗失败的情况下，口服降糖药常常能成功地降低血糖水平，但很多专家怀疑这种血糖控制的程度是否足以避免久病的II型糖尿病患者长期并发症的发生，如动脉粥样硬化病、神经障碍、肾病、视网膜病变、外周血管病。原因是根据现在的认识，甚至最轻的葡萄糖不耐受，大约相当于5.5到6.0mmol/L空腹血浆葡萄糖水平，都与心血管病死亡的危险性增高有关(Fuller等, Lancet, 1:1373-1378 (1980))。胰岛素治疗的长期后果是否优于口服降糖药治疗还不是很清楚。因此，可以认为较好的治疗方法将会非常有用。

Dickkopf (dkk)蛋白家族是分泌型 Wnt 抑制因子的家族(Krupnik等, Gene, 238:301-313 (1999); Monaghan等, Mech.Dev., 87:45-56 (1999))。Dkk-1 (WO 00/12708 2000年3月9日公开，其中Dkk-1命名为PRO1316，编码DNA为DNA60608)通过抑制 Wnt 信号，被视为非洲爪蟾属头部形成的诱导因子(Glinka等, Nature, 391:357-362 (1998))，后来又发现其涉及肢体发育(Grotewold等, Mech. Dev., 89:151-153 (1999))和抑制 Wnt 诱导的形态学改变(Fedi等, J. Biol. Chem., 274:19465-19472 (1999))。人们发现Dkk-1和Dkk-2具有相互拮抗作用，Dkk-2激活而不是抑制非洲爪蟾属胚胎 Wnt/ β 连环蛋白信号通路(Wu等, Current Biology, 10:1611-1614 (2000))。也有报道Dkk-1抑制 Wnt 信号，Dkk-1的一个裂解产物则激活 Wnt 信号(Brott and Sokol, Mol. Cell. Biol., 22:6100-6110 (2000))。

最近的研究提示 Dkks 通过结合到低密度脂蛋白相关蛋白 LRP6 上发挥作用，后者是 Wnt 信号的共同受体(Pinson等, Nature, 407:535-538 (2000); Tamai等, Nature, 407:530-535 (2000); Wehrli等, Nature, 407:527-530 (2000))。Dkk-1 通过在某些区域结合 LRP6 而拮抗 Wnt 信号，所述区域与涉及其与 Wnt 和 Frizzled 的相互作用的区域截然不同，因此抑制了 LRP6 介导的 Wnt/ β 连环蛋白信号传递(Bafico等, Nat. Cell.Biol., 3:683-686 (2001), Mao等, Nature, 411:321-325 (2001); Semenov等, Current Biology, 11:951-961 (2001))。

Wnt 信号通路在胚胎发育、不同细胞类型的分化和肿瘤发生中起关键作用(Peifer and Polakis, Science, 287:1606-1609 (2000))。分泌的 Wnts 和它们的受体，卷曲(frizzled)的蛋白之间的相互作用激活 Wnt 信号通路(Hlsken and Behrens, J CellSci., 113:3545-3546 (2000))。它导致散乱(Disheveled)(Dvl1)的蛋白激活，后者激活 Akt，Akt 随后被募集到 Axin- β -连环蛋白

- GSK3 β -APC(Fukumoto 等, J. Biol.Chem., 276:17479-17483 (2001))。随后 GSK3 β 磷酸化并失活, 导致 β -连环蛋白磷酸化和降解的抑制。聚积的 β -连环蛋白转移到细胞核, 在那里与淋巴增强因子-T 细胞因子(LEF/TCF)家族的转录因子相互作用, 从而诱导靶基因表达。
- 5 Wnt 信号的两个下游效应物 Akt 和 GSK3 β , 是胰岛素信号通路/葡萄糖代谢中关键的中间物。Wnt 信号涉及肌肉分化的调节(Borello 等, Development, 126:4247-4255 (1999); Cook 等, EMBOJ., 15:4526-4536 (1996); Cossu and Borello, EMBOJ., 18:6867-6872 (1999); Ridgeway 等, J. Biol. Chem., 275:32398- 32405 (2000); Tian 等, Development, 126:3371-3380 (1999);
- 10 Toyofuku 等, J. Cell.Biol., 150:225-241 (2000))和脂肪形成(Ross 等, Science, 289:950-953 (2000))。Wnt 信号的抑制可以刺激肌细胞向脂肪细胞的转移分化(trans-differentiation)(Ross 等, 同上)。另外, LRP5 在遗传学上与 I 型糖尿病有关。胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)的基因位于染色体 11q13 的 IDDM4(Hey 等, Gene, 216:103-111 (1998)), 并且在胰岛、巨噬细胞和维生素
- 15 A 系统的细胞上表达, 而这些细胞类型涉及到 I 型糖尿病的进展(Figueroa 等, J. Histochem. Cytochem., 48:1357-1368 (2000))。LRP5mRNA 在 LDLR-缺陷的 Watanabe 可遗传高脂蛋白血症家兔的肝脏是升高的, 并聚积在动脉粥样硬化灶的充满胆固醇的泡沫细胞内(Kim 等, J. Biochem.(Tokyo), 124:1072- 1076 (1998))。
- 20 WO01/40465(PCT/US00/30873)中有对 Dkk-5 分子的描述, 其中 Dkk-5 被命名为 PRO10268, 其编码 DNA 是 DNA145583-2820, ATCC 保藏号为 PTA- 1179, 保藏于 2000 年 11 月 1 日。另一个同 WO01/40465 分子相比在成熟区氨基酸有变化的 Dkk-5 分子在 2001 年 1 月 10 日公开的 EP 1067182-A2 中被鉴定(命名为 PSEC0258)。后者的应用涉及到数个编码人分泌型蛋白或
- 25 膜蛋白和抗体的核酸序列。以下两个实例包含了它们应用焦点。第一个是用 RA 抑制剂处理有类风湿性关节炎(RA)的 NT 细胞, 当它们经历神经元分化时观察已发现基因亚群的上调/下调。第二个实例是用 TNF- α 处理 RA 滑膜组织的原代细胞, 然后观察它们的基因亚群的上调/下调。在这两个实例中 EP1067182-A2 的 Dkk-5 分子都不是阳性的表现(hit)。
- 30 因此, 需要有一种能够用于诊断和治疗患有胰岛素抵抗病症, 包括 NIDDM, 的有效治疗剂。

发明概述

在培养的骨骼肌细胞和脂肪细胞中，Dkk-5 蛋白鉴定为葡萄糖代谢的调节剂。用 Dkk-5 处理肌细胞导致基础和胰岛素刺激的葡萄糖摄取的增加。

- 5 这种作用是在长期治疗后观察到的，提示 Dkk-5 不但影响了肌肉的分化，还影响了胰岛素信号通路中蛋白的表达水平。资料显示，Dkk-5 在体外可以刺激基础和胰岛素刺激的葡萄糖代谢。因此，Dkk-5 治疗胰岛素抵抗病症，包括伴随肥胖症、葡萄糖不耐受、糖尿病、高血压和大、小血管缺血性疾病的病症是有效的。
- 10 如权利要求的，本发明包括方法、试剂盒和组合物。特别是本发明提供了哺乳动物胰岛素抵抗病症治疗方法的实施方案，包含按哺乳动物的需要给予有效量的 Dkk-5。优选地，哺乳动物是人，并有 NIDDM 或是肥胖症。也优选系统给药。在进一步优选的实施方案中，除 Dkk-5 外，也服用另外的胰岛素抵抗治疗剂来治疗胰岛素抵抗病症。
- 15 在更进一步优选的实施方案中，用于治疗的 Dkk-5 多肽与图 2 有或无其相关的信号肽的 SEQ ID NO:5 有至少约 85%、更优选至少约 90%、更优选至少约 95%、更优选至少约 99% 的同一性，最优选与图 2 的 SEQ ID NO:5 有 100% 的氨基酸序列同一性。在另一个优选的实施方案中，Dkk-5 是 SEQ ID NO:5 的内部裂解蛋白片段，具有 N-末端序列 MALFDWTDYEDLK (SEQ ID
- 20 NO:8)，分子量约为 16 kDa；或者是混合物，包含具有 SEQ ID NO:5 的 Dkk-5，和氨基末端序列为 MALFDWTDYEDLK (SEQ ID NO:8)、分子量约为 16 kDa 的 SEQ ID NO:5 内部裂解蛋白片段；或是混合物，包含具有 SEQ ID NO:5 但缺乏它的相关信号肽的 Dkk-5，和 N-末端序列为 MALFDWTDYEDLK (SEQ ID NO:8)、分子量约为 16 kDa 的 SEQ ID NO:5 内部裂解蛋白片段。更
- 25 优选地，Dkk-5 是包含 SEQ ID NO:5 的 Dkk-5，或是包含 SEQ ID NO:5 第 20 个残基至第 30 个残基和第 347 个残基(末端)之间的序列的 Dkk-5，优选的 Dkk-5 包含 SEQ ID NO:5 第 25 个残基和第 347 个残基之间的序列；或是 SEQ ID NO:5 的内部裂解蛋白片段，具有 N-末端序列 MALFDWTDYEDLK (SEQ ID NO:8)，分子量约 16 kDa；或是所述裂解片段与如下物质之一或它们两者
- 30 的组合：包含 SEQ ID NO:5 的 Dkk-5 和包含 SEQ ID NO:5 第 20 个残基到第 30 个残基和第 347 个残基之间的序列的 Dkk-5。

在本发明的另一个实施方案中，提供了一种检测哺乳动物胰岛素抵抗病症存在或发作的方法，该方法包括以下步骤：

(a)测定来自所述哺乳动物样品中 Dickkopf-5(Dkk-5)的量；和

(b)将步骤(a)测定的 Dkk-5 量同标准品中 Dkk-5 的量比较，步骤(a)检测的 Dkk-5 的量呈下降水平是胰岛素抵抗病症的征兆。优选地，哺乳动物是人。也优选，测量是用抗 Dkk-5 抗体，如单克隆抗体，进行免疫测定完成的。也优选，这样的抗 Dkk-5 抗体包含标记物，更优选荧光标记物、放射性标记物或酶标记物，例如生物发光标记物或化学发光标记物。也优选，免疫测定是放射免疫测定、酶免疫测定、酶联免疫吸附测定、夹心法免疫测定、沉淀测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、蛋白 A 免疫测定或免疫电泳测定。也优选胰岛素抵抗病症的状态为 NIDDM。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种诊断试剂盒，用于检测哺乳动物胰岛素抵抗病症的存在或发作，该试剂盒包括：

(a)一个装有与 Dkk-5 结合的抗体的容器；

(b)一个装有含 Dkk-5 的标准品的容器；和

(c)用所述抗体和标准品，利用来自哺乳动物的样品检测病症的使用说明，其中结合 Dkk-5 的抗体进行了可检测标记，或该试剂盒还包含另外的容器，其中包含第二抗体，该抗体经过可检测标记并能与 Dkk-5 结合，或者能与结合 Dkk-5 的抗体结合。优选地，与 Dkk-5 结合的抗体是单克隆抗体，而所述哺乳动物是人。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种试剂盒，用于治疗哺乳动物胰岛素抵抗病症，该试剂盒包括：

(a)一个包含 Dkk-5 的容器；

(b)用 Dkk-5 治疗所述病症的用法说明。

在一个优选的实施方案中，所述病症为 NIDDM，所述容器是小玻璃瓶，而用法说明规定把小玻璃瓶的内容物放进注射器里立即注射。也优选该试剂盒还包含其中装有胰岛素抵抗治疗剂的容器，并且也优选所述哺乳动物是人。

在另一个实施方案中，本发明提供了一个分离的 SEQ ID NO:5 内部裂解蛋白片段，具有 N-末端序列 MALFDWTDYEDLK (SEQ ID NO:8)，分子量约 16 kDa。

另一方面, 本发明提供了一种组合物, 包含这个蛋白片段和一个载体, 更优选地, 该组合物进一步包含一个含 SEQ ID NO:5(具有或缺乏它的相关信号肽)的 Dkk-5。如果这个含 SEQ ID NO:5 的 Dkk-5 缺乏它的相关信号肽, 它通常包含 SEQ ID NO:5 第 20 个残基到第 30 个残基和末端之间的序列, 更优选的是从 SEQ ID NO:5 第 25 个残基到第 347 个残基之间的序列。

本发明另外提供了制备抗 Dkk-5 抗体的杂交瘤, 所述杂交瘤选自 PTA-3090、PTA-3091、PTA-3092、PTA-3093、PTA-3094、PTA-3095 或 PTA-3096。也提供了一种由这些杂交瘤中的任何一个生产的抗体。

本发明还提供了一种评价哺乳动物胰岛素抵抗病症的候选药物的作用的方法, 包括对一种过表达 dkk-5 cDNA 的非人类转基因动物模型给予该药, 并确定所述药物对该模型的血液葡萄糖廓清率的影响。优选地, 所述动物模型是啮齿类, 更优选是小鼠或大鼠, 而最优选的是小鼠模型。在另一优选实施方案中, 被该模型过表达的 dkk-5cDNA 受肌肉特异的启动子调控, 而该 cDNA 在肌肉组织中过表达。

15

附图简述

图 1 公开了人 Dkk 家族蛋白的概要结构(hDkk-1、 hDkk-2、 hDkk-4、 hDkk-3 和 hDkk-5)。

图 2 显示人 Dkk 家族蛋白的序列对比, Dkk-1 (SEQ ID NO:1)、 Dkk-2 (SEQ IDNO:2)、 Dkk-3 (SEQ ID NO:3)、 Dkk-4 (SEQ ID NO:4)和 Dkk-5 (SEQ ID NO:5)。矩形区域表示半胱氨酸丰富的区域, 倒三角表示这个家族的蛋白内部裂解位点的位置。

图 3 显示 Dkk-5 在成人不同组织中的相对表达水平。

图 4 显示 Dkk-5 在小鼠胚胎中的相对表达水平。

图 5A-5E 显示整个小鼠胚胎在发育不同天数的原位杂交分析, 图 5A 是 8.5-9 天 p.c., 图 5B 是 10 天 p.c., 图 5C 是 10 天(特写镜头)p.c., 图 5D 是 11 天 p.c., 图 5E 是 12.5 天(头部)p.c..

图 6 显示在 L6 细胞分化第 1-8 天时 Dkk-5 的相对表达水平。

图 7 显示在杆状病毒和它的剪取物中表达的 hDkk-5 考马斯蓝染色的 SDS-PAGE 胶, 第一泳道是非还原条件, 第二泳道是还原条件。

图 8A-8B 显示 Dkk-5 处理 L6 肌细胞 48 小时(图 8A)和 96 小时(图 8B)

后对基础的和胰岛素刺激的葡萄糖摄取的影响。较低的柱代表没有用胰岛素，较高的柱代表使用 30 nM 胰岛素。

图 9A-9B 显示处理 L6 肌细胞 48 小时(图 9A)和 96 小时(图 9B)后 Dkk-5 对基础的和胰岛素刺激的葡萄糖掺入糖原的影响。较低的柱代表未使用胰岛素，而较高的柱代表使用 30nM 胰岛素。

图 10A-10G 描述了 Dkk-5 对 L6 肌细胞涉及肌发生的不同基因表达水平的影响。图 10A 显示的是对肌球蛋白轻链(MLC-2)表达的影响；图 10B 显示了对 Myf5 表达的影响；图 10C 显示了对肌细胞生成素(myogenin)表达的影响；图 10D 显示了对 Pax3 表达的影响；图 10E 显示了对 MLC 1/3 表达的影响；图 10F 显示了对 MyoD 表达的影响；图 10G 显示了对肌球蛋白重链(HC)表达的影响；菱形代表未处理细胞，三角形代表 Dkk-5 处理细胞。

图 11 显示了 Dkk-5 对涉及胰岛素信号通路的基因(涉及葡萄糖新陈代谢)表达的影响。每一对柱中左边的一个代表 Dkk-5 处理 5 天，每一对柱中右边的一个代表 Dkk-5 处理 7 天。

图 12 显示 Dkk-5 对 L6 细胞的结合及结合解除因素的 FACS 分析。

图 13A-13B 显示处理脂肪细胞 48 小时(图 13A)和 96 小时(图 13B)后 Dkk-5 对基础的和胰岛素刺激的葡萄糖摄取的影响。较低的柱代表未使用胰岛素，较高的柱代表使用 30 nM 胰岛素。

图 14A-14B 显示处理脂肪细胞 48 小时(图 14A)和 96 小时(图 14B)后 Dkk-5 对基础的和胰岛素刺激的葡萄糖掺入脂质的影响。较低的柱代表未使用胰岛素，较高的柱代表使用 30 nM 胰岛素。

优选实施方案详述

定义

在此使用的"Dkk-5"或者"Dickkopf-5"或者"Dkk-5 多肽"是指这样的多肽，该多肽与图 2(SEQ ID NO:5)所示的 Dkk-5 多肽全长氨基酸序列有至少约 80% 的氨基酸序列同一性，或者该多肽与图 2(SEQ ID NO:5)所示的 Dkk-5 多肽缺乏其相关信号肽的氨基酸序列有至少约 80% 的氨基酸序列同一性，或者该多肽与 ATCC 保藏号为 PTA-1179 的 DNA 全长编码序列所编码的氨基酸序列至少有 80% 的氨基酸序列同一性，或者是本文公开的全长多肽 SEQ ID NO:5 的任何其它片段，只要本文所定义的该 Dkk-5 多肽具有治疗胰岛素抵抗病症

的活性。

在此定义的 Dkk-5 可以从许多种来源中分离出来，例如从人的组织类型或从其它天然来源，或通过重组或合成的方法制备。“Dkk-5”这一术语明确包含这个特定多肽的天然存在的截短或分泌形式(例如胞外结构域序列)、天然存在的变体形式(例如，不同的剪接形式)和该多肽天然存在的等位基因变体。在本发明不同的实施方案中，Dkk-5 多肽是成熟的或包含图 2 所示 SEQ ID NO:5 全长氨基酸序列的全长天然序列的多肽。然而，尽管在附图 2 作为 SEQ ID NO:5 公开的 Dkk-5 多肽显示以蛋氨酸残基开始，其它位于 SEQ ID NO:5 起始氨基酸位置的上游或下游的蛋氨酸残基可以用作 Dkk-5 多肽的起始氨基酸残基是可以想象和可能的。

Dkk-5 多肽包括，例如，其中在 SEQ ID NO:5 全长天然氨基酸序列 N-末端或 C-末端添加或缺失 1 个或多个氨基酸残基形成的多肽。Dkk-5 多肽可以与本文公开的 SEQ ID NO:5，或缺少信号肽的 SEQ ID NO:5，有至少约 80% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 81% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 82% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 83% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 84% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 85% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 86% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 87% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 88% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 89% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 90% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 91% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 92% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 93% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 94% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 95% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 96% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 97% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 98% 的氨基酸序列同一性，或者，有至少约 99% 的氨基酸序列同一性，或者，有 100% 的氨基酸序列同一性，只要其具有治疗胰岛素抵抗病症的活性。

通常，Dkk-5 多肽的长度是至少约 10 个氨基酸、可选择至少约 20 个氨基酸、可选择至少约 30 个氨基酸、可选择至少约 40 个氨基酸、可选择至少约 50 个氨基酸、可选择至少约 60 个氨基酸、可选择至少约 70 个氨基酸、可选择至少约 80 个氨基酸、可选择至少约 90 个氨基酸、可选择至少约 100 个氨基酸、可选择至少约 150 个氨基酸、可选择至少约 200 个氨基酸、可选

择至少约 300 个氨基酸或更多个氨基酸, 只要它有治疗胰岛素抵抗病症的活性。

在图 2 SEQ ID NO:5 中反向箭头标示的内部位点裂解形成的, 分子量约 16 kDa 的分离的内部裂解产物(从 MA 开始)有增强肌细胞基础和胰岛素刺激的葡萄糖摄取活性, 就象主要包含成熟蛋白和/或含信号序列蛋白的重组制剂一样。

优选的是那些与 SEQ ID NO:5 有至少约 85%、更优选地至少约 90%、更优选地至少约 95%、更优选地至少约 99% 氨基酸序列同一性的产物。更优选地还是本文图 2 SEQ ID NO:5 的多肽, 该多肽在 WO01/40465(PCT/US00/30873)命名为 PRO 10268, 和 2001 年 1 月 10 日公开的 EP 1067182-A2 中命名为 PSEC0258 的多肽。还更优选的是具有本文图 2 的 SEQ ID NO:5 的多肽和 WO01/40465 中的 PRO10268, 和来自它们的成熟多肽, 以及具有 N-末端序列 MALFDWTDYEDLK (SEQ ID NO:8)、分子量约 16 kDa 的 SEQ ID NO:5 内部裂解蛋白片段和该片段与具有 SEQ ID NO:5 (该 SEQ ID NO:5 有或无其相关信号肽)的 Dkk-5 的混合物。最优选的是包含本文图 2 的 SEQ ID NO:5 (该 SEQ ID NO:5 有或无其相关信号肽), 和/或具有 N-末端序列 MALFDWTDYEDLK (SEQ ID NO:8)、分子量约 16 kDa 的 SEQ ID NO:5 内部裂解蛋白片段的多肽。

在此公开的多肽“信号肽”的大概定位从图 2 SEQ ID NO:5 第 1 位的蛋氨酸到第 24 位的丙氨酸, 裂解位点是图 2 SEQ ID NO:5 的第 24 位丙氨酸和第 25 位甘氨酸之间。但是, 值得注意的是信号肽的 C-末端边界是可以改变的, 不过最可能的是本文最初鉴定的信号肽 C-末端边界的任一边不超过约 5 个氨基酸, 其中信号肽 C-末端边界可以按照鉴定氨基酸序列成份类型领域的常规标准(例如, Nielsen 等, *Prot. Eng.*, 10:1-6 (1997)和 von Heinje 等, *Nucl. Acids. Res.*, 14:4683-4690 (1986))来鉴定。此外, 人们也认识到在一些情况下, 信号序列从分泌的多肽上的裂解是不完全一致的, 导致一个以上的分泌型别。这些成熟的多肽, 象本文鉴定的一样, 它们的信号肽是在信号肽 C-末端边界的任一边不超过约 5 个氨基酸以内分裂的, 而编码它们的多核苷酸, 也是本发明所关注的。

本文的“百分比(%)氨基酸序列同一性”, 定义为候选序列的氨基酸残基与选择序列的氨基酸残基进行序列对比, 并在必要时导入空隙以获取最大百

分比的序列同一性，而不将任何保守取代视为序列同一性的部分时，候选序列与选择序列的氨基酸残基相同的百分数。可使用本领域各种方法进行序列对比以便测定氨基酸序列同一性百分比，例如，使用公众可得到的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign (DNASTAR) 软件。

5 本领域技术人员可以决定测量对比的适宜参数，包括对所比较的序列全长获得最大对比所需的任何算法。然而，为此目的，氨基酸序列同一性 % 值是使用下述序列对比计算机程序 ALIGN-2 而获得的。ALIGN-2 序列对比计算机程序的作者是 Genentech, Inc.，该程序和用户资料一起已经提交地处 Washington D. C., 20559 的美国版权局，其美国版权注册登记号为
10 TXU510087。公众通过 Genentech, Inc., South San Francisco, California 可以得到 ALIGN-2 程序。ALIGN2 程序应当为在 UNIX 操作系统，优选在数码 UNIX V4.0D 使用而进行编制。ALIGN-2 程序设定了所有序列对比参数并且不变。

为了本发明目的，给定氨基酸序列 A 相对于给定氨基酸序列 B 的氨基酸序列同一性 % (或者说：给定氨基酸序列 A 具有或含有给定氨基酸序列 B 相同氨基酸序列的 %) 如下计算：
15

X/Y 比值乘以 100

其中 X 是用序列对比程序 ALIGN-2 比较 A 和 B 的氨基酸残基后计算出的相同氨基酸数，其中 Y 是 B 的氨基酸残基总数。可以理解，当氨基酸序列 A 与氨基酸序列 B 的长度不相等时，A 相对于 B 的氨基酸序列同一性 %
20 将不等于 B 相对于 A 的氨基酸序列同一性 %。2001 年 3 月 8 日公开的 WO01/16319 的表 2 和表 3 中和 2000 年 12 月 7 日公开的 WO00/73452 中提供了用 ALIGN-2 程序计算氨基酸序列同一性的实例。

除非另外特殊说明，在本文用的所有氨基酸序列同一性 % 的值都是用 ALIGN-2 计算机程序如前段所描述的那样得到的。可是，氨基酸序列同一性的 % 也可以如下面将描述的那样用 WU-BLAST-2 计算机程序获得 (Altschul
25 等, Methods in Enzymology. 266:460-480 (1996))。大部分 WU-BLAST-2 搜索参数设为默认值。那些没有设为默认值的参数，如校正参数，可以用下面的值来设置：重叠跨度 (overlap span) = 1，重叠比例 (overlap fraction) = 0.125，语言阈值 (word threshold) (T) = 11，评分矩阵 (scoring matrix) = BLOSUM62。
30 使用 WU-BLAST-2 时，氨基酸序列同一性 % 的值是这样得出的：用由 WU-BLAST-2 测定的，在具有衍生自天然 Dkk-5 多肽序列的感兴趣的 Dkk-5

多肽氨基酸序列, 和感兴趣的对比氨基酸序列(如与感兴趣的 Dkk-5 多肽对比的序列)之间完全匹配的氨基酸残基数目(a), 除以感兴趣的 Dkk-5 多肽氨基酸残基总数(b)。例如, 在“一个包含氨基酸序列 A 的多肽与氨基酸序列 B 有至少 80%氨基酸序列同一性”的描述中, 氨基酸序列 A 是感兴趣的对比氨基酸序列, 氨基酸序列 B 是感兴趣的 Dkk-5 多肽氨基酸序列。

氨基酸序列同一性百分比也可以用序列对比程序 NCBI-BLAST2 (Altschul 等, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)) 来测定。NCBI-BLAST2 序列对比程序可以从 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 下载, 或者从 the National Institute of Health, Bethesda, MD. 得到。NCBI-BLAST2 用数个搜索参数, 其中所有这些搜索参数都设为默认值, 包括例如未覆盖 (unmask)=是(yes), 链 (strain)=全部(all), 预计出现次数(expected occurrences) = 10, 最小低复杂度长度(minimum low complexity length)=15/5, 多次通过 e 值(multi-pass e-value) = 0.01, 多次通过的常数(constant for multi-pass) = 25, 最终缺口对比的遗漏(dropoff for final gapped alignment) = 25 和评分矩阵= BLOSUM62。

用 NCBI-BLAST2 进行氨基酸序列对比时, 给定氨基酸序列 A 相对于给定氨基酸序列 B 的氨基酸序列同一性%(或者说: 给定氨基酸序列 A 具有或含有给定氨基酸序列 B 相同氨基酸序列的%)如下计算:

X/Y 比值乘以 100

其中 X 是用序列对比程序 ALIGN-2 比较 A 和 B 的氨基酸残基后计算出的相同氨基酸数, 其中 Y 是 B 的氨基酸残基总数。可以理解, 当氨基酸序列 A 与氨基酸序列 B 的长度不相等时, A 相对于 B 的氨基酸序列同一性%将不等于 B 相对于 A 的氨基酸序列同一性%。

本文用的“治疗”是指为了抗击胰岛素抵抗病症对患者进行的处置和照顾, 包括给药以防止症状或并发症的出现、减轻症状或并发症、或者消除胰岛素抵抗疾病、状态或病症。为了本发明的目的, 有利的或者想得到的临床结果包括但不限于, 胰岛素抵抗相关症状的减轻、胰岛素抵抗症状的范围的缩小、胰岛素抵抗症状的稳定(即不恶化)(例如胰岛素需求的减少)、胰岛素敏感性和/或胰岛素分泌的增加以预防胰岛细胞衰竭、胰岛素抵抗的进程, 比如糖尿病进程的延迟或减慢。与该领域技术人员理解的一样, 本发明所要治疗的 30 症状将取决于所治疗的胰岛素抵抗病症的类型。“治疗需要”既包括已患病症的哺乳动物, 也包括有患该病症倾向的群体, 包含需要预防该病症的群

体。

为了治疗和诊断，术语“哺乳动物”指被分类为哺乳动物的任何动物，包括但不限于人、突变(sport)的动物、动物园(zoo)的动物、宠物和家畜(domestic animal)或耕种用动物(farm animal)，如狗、猫、牛、羊、猪、马和灵长类动物如猴。优选地，哺乳动物是人。

“胰岛素抵抗病症”是由于外周组织对外源性胰岛素的作用不能产生正常代谢应答(不敏感)而导致的一种疾病、一种状态或一种病症，如，这是一种对胰岛素的存在产生低于正常(subnormal)的生物应答的一种状态。以临床术语描述，对应于胰岛素水平正常或升高时血葡萄糖水平持续正常或升高即胰岛素抵抗是存在的。这种情况实质上代表糖原合成的抑制，由此导致基础的或胰岛素刺激的糖原合成，或二者都降到正常水平以下。胰岛素抵抗在II型糖尿病中起主要作用，这一点通过II型糖尿病中的高血糖症有时可通过表面上足以恢复外周组织对胰岛素敏感性的饮食和体重减轻来逆转的事实得到了证明。该术语包括葡萄糖耐受异常和很多胰岛素抵抗在其中起关键作用的病症，如肥胖症、糖尿病、卵巢性雄激素过多症(ovarian hyperandrogenism)和高血压。

“糖尿病”指慢性高血糖状态，即血液中糖过剩，其继发于相对或绝对胰岛素功能不足。糖尿病有三种基本类型：I型或胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)、II型或非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)和A型胰岛素抵抗，尽管A型比较罕见。I型或II型糖尿病患者由于不同机制而对外源性胰岛素的作用不敏感。A型胰岛素抵抗是由胰岛素受体基因突变或对葡萄糖代谢起关键作用的受体后(post-receptor)位点缺陷所致。糖尿病患者很容易被内科医师发觉，而且这些患者具有以下特点：高血糖、葡萄糖耐受障碍、糖基化血红蛋白，有时有伴随创伤和疾病的酮症酸中毒。

“非胰岛素依赖型糖尿病”或“NIDDM”指II型糖尿病。当空腹和餐后或众所周知的葡萄糖耐量诊断试验后葡萄糖的细胞摄取延迟时，NIDDM患者血中葡萄糖浓度异常升高。NIDDM是在公认标准的基础上诊断的(胰岛素依赖型(I型)糖尿病内科医师指南，1988；美国糖尿病切合非胰岛素依赖型(II型)糖尿病内科医师指南，1988)。

治疗的糖尿病症状和并发症同本文定义的病症一样，包括高血糖症、不满意的血糖控制、酮症酸中毒、胰岛素抵抗、高生长激素水平、高糖基化血

红蛋白水平和晚期糖基化终产物(advanced glycosylation end-products) (AGE)、黎明现象(dawn phenomenon)、不满意的脂质谱、血管疾病(例如动脉粥样硬化)、微血管疾病、视网膜病症(例如糖尿病性视网膜增生)、肾病、神经病、妊娠并发症(如早产和出生缺陷)等等。治疗的定义包括这些目的，如

5 提高胰岛素敏感性，降低维持血糖的控制所需胰岛素的剂量，减少 HbA1c，改善血糖的控制，减轻血管、肾、神经、视网膜的并发症和其它糖尿病的并发症，防止或减轻“黎明现象”，改善脂质谱，减少妊娠并发症和减少酮症酸中毒。

本文用的“治疗的组合物”或“组合物”定义为包含 Dkk-5 和可药用载体，

10 如水、矿物质、蛋白质和其它该领域专业人士知道的赋形剂。

本文在最广泛意义上应用的术语“抗体”具体覆盖了完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)，和抗体片段，只要它们具有本发明所需的生物学活性，例如在诊断测定中同 Dkk-5 结合。

15 本文中术语“单克隆抗体”，是指来自基本上均质的抗体群的抗体，即除了可能少量存在的天然突变以外，该抗体群中的各个抗体均相同。单克隆抗体具有高度的特异性，是抗单一抗原位点。而且，与通常包括的抗不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反，每种单克隆抗体针对抗原上的单个表位。

20 除它们的特性外，单克隆抗体的优点在于它们可以在不被其他抗体污染的情况下合成。修饰词“单克隆”指该抗体是基本上从同质(homogeneous)的抗体群中得到的特征，不解释为需通过任何特殊方法产生该抗体。例如，本发明所用的单克隆抗体可通过由 Kohler 等(Nature, 256:495(1975))首先描述的杂交瘤法进行制备，或者可通过重组 DNA 法进行制备(例如，美国专利

25 4,816,567)。“单克隆抗体”还可利用例如 Clackson 等(Nature, 352:624-628 (1991))和 Marks 等(分子生物学杂志, 222:581-597(1991))所述技术从噬菌体抗体文库中分离。

本文中的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体，其重链和/或轻链的一部分与源自特殊物种或属于特殊抗体种类或亚类的抗体的相应序列相同或同源，但

30 所述链的其余部分的序列与源自另一个物种或属于另一个抗体种类或亚类的抗体(以及此抗体的片段，只要它们显示所需的生物学活性)的相应序列相

同或同源 (美国专利 4,816,567; 和 Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:6851-6855(1984))。本文感兴趣的嵌合抗体包括“灵长类的”抗体, 它包含来自非人灵长类可变区的抗原结合序列(例如旧世界猴、猿(Old World Monkey, ape)等)和人类恒定区的序列。

5 “抗体片段”包含完整抗体的一部分, 优选地包含其抗原结合区或其可变区。抗体片段实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段; 双抗体(diabodies); 线性抗体; 单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

“完整的”抗体是指既包含抗原结合可变区, 也包含轻链恒定区(CL)和重链恒定区(CH1, CH2 和 CH3)的抗体。恒定区可以是天然序列恒定区(例如人天然序列恒定区)或它的氨基酸序列变体。

10 本文用的“样品”指包含或怀疑包含 Dkk-5 的生物学样品。该样品可来自任何来源, 优选哺乳动物, 更优选人。这样的样品包括水样液体, 如血清、血浆、淋巴液、滑液、卵泡液、精液、乳液、全血、尿液、脑脊液、唾液、痰、泪液、汗液、粘液、组织培养基、组织提取物和细胞提取物。

15 “胰岛素抵抗治疗剂”或“降血糖药”(在本文可交替使用)是不同于 Dkk-5 的用来治疗胰岛素抵抗病症的制剂, 如胰岛素(一种或多种不同胰岛素)、胰岛素模拟物, 象小分子胰岛素例如 L-783,281、胰岛素类似物(例如 LYSPRO™ (Eli Lilly Co.)、Lys^{B28} 胰岛素、Pro^{B29} 胰岛素或 Asp^{B28} 胰岛素, 或那些在比如美国专利 5,149,777 和 5,514,646 中描述的制剂)或其生理活性片段、胰岛素相关肽(C-肽、GLP-1、IGF-1 或 IGF-I/IGFBP-3 复合物)或其类似物或片段、ergoset、pramlintide、勒帕茄碱(leptin)、BAY-27-9955、T-1095、胰岛素受体酪氨酸激酶抑制剂拮抗药、TNF- α 作用拮抗药、生长激素释放剂、胰岛淀粉样多肽(amylin)或胰岛淀粉样多肽的抗体、胰岛素致敏剂(sensitizer)如格列酮(glitazone)家族的化合物, 包括在美国专利 5,753,681 中描述的那些, 如曲格列酮、匹格列酮、englitazone 及相关的化合物, LINALOL™ 单用或与维生素 E 同用(美国专利 6,187,333), 和胰岛素分泌促进剂如 nateglinide (AY-4166)、钙(2S)-2-苄基-3-3(顺式-六氢化-2-异二氢氮茛基羰基)丙酸盐二水合物(mitiglinide, KAD-1229)、repaglinide 和磺脲类药如醋磺己脲、氯磺丙脲、妥拉磺脲、甲磺丁脲、格列吡脲和它的铵盐、格列苯脲、格列波脲、格列齐特、25 1-丁基-3-间氨基苯磺酰脲、氨磺丁脲、格列吡嗪、格列喹酮、格列派特、格列噻唑、glibuzole、glyhexamide、格列嘧啶、格列平脲、苯磺丁脲、甲磺

环己脲、格列美脲等，还有双胍类(如苯乙福明、二甲双胍、丁福明等)，和 α -葡萄糖苷酶抑制剂(如阿卡波糖、voglibose、米格列醇、乙格列酯等)，和非典型治疗如胰岛移植或自身免疫制剂。

5 本文用的“胰岛素”指任何和所有具有胰岛素功能的物质，例如从牛或猪胰岛提取的动物胰岛素，从猪胰腺提取的胰岛素经酶合成的半成人胰岛素，和用大肠杆菌或酵母等通过基因工程技术合成的人胰岛素。此外，所述胰岛素还包括含锌约0.45-0.9(w/w)%的胰岛素-锌复合物，用氯化锌，鱼精蛋白硫酸盐和胰岛素等等生产的鱼精蛋白-胰岛素-锌复合物。所述胰岛素可以是其片段或衍生物形式，例如INS-1。所述胰岛素也包含胰岛素样物质如
10 L83281，和胰岛素激动剂。胰岛素可以多种形式使用，如超速效、速效、双峰效(bimodal-acting)、中效、长效等等，这些形式可按照患者不同情况进行适当选择。

本文用的术语“转基因”指一种部分或全部异源的，即外来的、被导入到转基因动物中的核酸序列，或引入转基因动物中的与内源基因同源的核酸序列，但要设计该序列将嵌入，或嵌入到动物基因组中的方式以改变它所嵌入的细胞基因组(例如其被嵌入的位置不同于天然基因的相应位置)。转基因可以被可操作性地同一种或多种转录调控序列和任何其它核酸，如内含子相连，这对于所选的核酸进行理想的表达是必要的。本文的转基因编码Dkk-5。
15

本文的“转基因非人动物”全部包括其中有Dkk-5编码转基因的多种细胞，这改变了宿主细胞有关血中葡萄糖廓清率的表型。
20

“分离的”当用来描述在此公开的各种多肽和蛋白片段时，意味着该多肽和蛋白是从它的自然环境的成分中鉴定和分离和/或回收的。其自然环境的污染成分是显著妨碍该多肽或蛋白诊断或治疗用途的物质，可能包括酶、激素和其它蛋白质的或非蛋白质的溶质。在优选的实施方案中，所述多肽将被纯化到(1)足够用旋转杯序列分析仪(spinning cup sequenator)获得至少15个残基的N-末端或内部所述氨基酸序列的程度，或(2)用SDS-PAGE在非还原条件或还原条件下用考马斯蓝染色或，优选地，银染色时达到均一(homogeneity)的程度。分离的多肽包括在重组细胞中原位的多肽，因为所述Dkk-1自然环境的至少一个成分不会存在。然而，通常分离的多肽需要至少一个纯化步骤
25
30 来制备。

完成发明的方法

在本文 Dkk-5 对 L6 肌细胞的作用这一发现和其它资料的基础上，公开了用 Dkk-5 诊断和治疗胰岛素抵抗病症的新方法。因而，本发明提供了在体外和体内诊断和治疗的许多情况下都有用的方法。

治疗用途

5 Dkk-5 可以任何合适给药途径给予哺乳动物，包括不经肠道给药的途径，例如但不限于静脉内(IV)、肌肉内(IM)、皮下(SC)和腹膜内，还有皮内给药、口腔给药、舌下给药、直肠内给药、鼻内给药和吸入途径。IV、IM、SC 和 IP 给药可能是通过大丸剂(bolus)或输注，而肌肉给药也可能是缓释的可植入装置，包括但不限于泵、缓释制剂和机械装置。优选地，给药是系统的，而偶
10 而检测患者葡萄糖和/或胰岛素的循环水平时胰岛素抵抗的降低是明显的。

一个特别优选的 Dkk-5 给药方法是皮下注射，特别是用仪表输注装置，如泵。这样的泵可以是重复使用的或一次性使用的，和可植入的或可外部安装的。比如，为这个目的使用的医用输注泵包括公开于美国专利 5,637,095; 5,569,186; 和 5,527,307 的泵。组合物可以连续地或间歇地从这样的装置中给
15 药。

适合储存的 Dkk-5 治疗制剂包括含有理想纯度的蛋白和可药用载体、赋形剂或稳定剂的混合物(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), 可以是冻干制剂或水溶液。允许的载体、赋形剂或稳定剂在使用剂量和浓度时对接受者是无毒的，包括缓冲液，如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸的缓冲液；抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸；防腐剂(如十八烷基二甲苯酰氯化铵；氯己双铵；氯苄烷铵；苄索氯铵；酚，丁醇或苯甲醇；烷基对羟苯甲酸酯，如甲基或丙基对羟苯甲酸酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇和 m-甲酚)；低分子量多肽(少于约 10 个残基)；蛋白质，如血清白蛋白、明胶，或免疫球蛋白；亲水的多聚体，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，
20 如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖或其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，如 EDTA；糖，如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐反离子，如钠；金属复合物(如锌-蛋白复合物)；例和/或非离子表面活性剂，如吐温、PLURONICS™、或聚乙二醇(PEG)。优选的是 WO 97/04801 中描述的 Dkk-5 冻干制剂。这些组合物包含
25 Dkk-5，活性的 Dkk-5 约占重量的 0.1-90%，优选可溶的形式，通常占重量的 10-30%。

活性成分也可容纳在通过凝聚技术或界面聚合作用制备的微胶囊中，如分别在胶体性质的药物运送系统(如脂质体，白蛋白小球体，微乳剂，纳米颗粒及纳米胶囊)或大乳剂(macroemulsions)的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(异丁烯酸甲酯)微胶囊。这些技术见雷氏药理学，第16版 Osol, A.编(1980)。

5 本文公开的 Dkk-5 也可以配制成免疫脂质体(immunoliposome)。包含 Dkk-5 的脂质体可用该领域熟知的方法制备，如 Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); 美国专利 4,485,045 和 4,544,545; 和 1997 年 10 月 23 日公开的 W097/38731 描述的方法。循环时间增加的脂质体公开于美国专利 5,013,556。

10 独特用途的脂质体可用包含卵磷脂、胆固醇和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)脂质组合物通过反相蒸发方法制备。用限定孔径的滤器过滤脂质体以得到理想直径的脂质体。

也可制备控释制剂。控释制剂的适当实例包括含有抗体的固态疏水聚合物的半通透性基质，所述基质为具有一定形状的产品，如膜或微胶囊。控释
15 制剂实例包括聚酯、水凝胶(如聚(2-羟基乙基-异丁烯酸酯)或聚(乙烯醇)、聚交酯(美国专利 3,773,919)、L-谷氨酸与 γ 乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯乙酸乙酯、可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-羟基乙酸共聚物和亮氨酸脯氨酸(leuprolide)乙酸酯组成的可注射的微球体)，以及聚 D-(-)-3-羟丁酸。

20 Dkk-5 可以结合到一个载体蛋白上以延长它的血清半衰期。该制剂体内给药时必须消毒。消毒在用无菌滤膜过滤时已经完成。

因为接受治疗的特殊指征的需要，本文的制剂还可以包含一种以上活性化合物，优选的是那些彼此活性互补、没有不利反应的物质。而且该活性化合物可以对所治疗的哺乳动物分开给药。这样的其它药物的给药途径和给药
25 量可以是其通常所使用的，可以与 Dkk-5 同时或顺序给药。当 Dkk-5 与一种或多种其它药同时使用时，优选药物单位剂量形式除 Dkk-5 外还包含所述的其它药物。因此，本发明的药物组合物包括那些除 Dkk-5 外，还包含一种或多种其它活性成分的药物组合物。可与 Dkk-5 联合使用的胰岛素抵抗治疗药或降血糖药，可分别给药或以同一药物组合物给药，所述胰岛素抵抗治疗药
30 或降血糖药的实例包括但不限于：

a) 胰岛素致敏剂，包括(i) PPAR- γ 激动剂，如 glitazones(例如包括那些美

- 国专利 5,753,681 描述的制剂, 如曲格列酮(Noscal 或 Resiline)、盐酸匹格列酮、englitazone、MCC-555、BRL-49653、ALRT 268、LGD1069、甲基吡啶铬(chromic picolinate)、DIAB IITM (V-411)或 GLUCANINTM 等等), 和公开于 WO 97/27857、WO 97/28115、WO 97/28137、和 WO 97/27847 的化合物,
- 5 和(ii)双胍类, 如二甲双胍和苯乙福明;
- (b)胰岛素(一种或多种不同的胰岛素)、胰岛素模拟物, 如小分子胰岛素, 例如 L-783,281、胰岛素类似物(例如 LYSPROTM (Eli Lilly Co.), Lys^{B28} 胰岛素、Pro^{B29} 胰岛素、Asp^{B28} 胰岛素或那些在比如美国专利 5,149,777 和 5,514,646 中描述的制剂)或其生理活性片段、胰岛素相关的肽(C-肽, GLP-1, IGF-1,
- 10 或 IGF-I/IGFBP-3 复合物)或其类似物或片段;
- (c)磺脲类, 如醋磺已脲、氯磺丙脲、妥拉磺脲、甲磺丁脲、格列苯脲、格列波脲、格列齐特、格列吡嗪、格列喹酮和格列塞唑;
- (d) α -糖苷酶抑制剂(如阿卡波糖);
- (e)降胆固醇药, 如(i) HMG-CoA 还原酶抑制剂(洛伐他汀、斯伐他汀和
- 15 普伐他汀、氟伐他汀、阿伐他汀和其它他汀); (ii)降血脂药(考来烯胺、考来替泊和交联右旋糖酐的二烷基氨基烷基衍生物); (iii)烟醇(nicotinyl alcohol)烟酸或它的盐; (iv)增殖剂-活化剂 α -受体激动剂, 如 fenofibric acid 衍生物(吉非贝齐、氟贝特、非诺贝特和苯扎贝特); (v)胆固醇吸收抑制剂, 例如 β -麦固醇和(酰基 CoA: 胆固醇酰基转移酶)抑制剂, 例如亚油甲苄胺; (vi)丙丁酚;
- 20 (vii)维生素 E; 和(viii) thyromimetics;
- (f) PPAR- δ 激动剂, 如公开于 WO 97/28149 的那些 PPAR- δ 激动剂;
- (g)抗肥胖症化合物, 如氟苯丙胺、右苯丙胺、芬特明、西布曲明、奥利斯特和其它 β_3 肾上腺素能受体激动剂;
- (h)摄食行为调节(modifying)药, 如神经肽 Y 拮抗剂(例如神经肽 Y5),
- 25 例如公开于 WO 97/19682、WO 97/20820、WO 97/20821、WO 97/20822 和 WO 97/20823 的那些摄食行为调节药;
- (i) PPAR- α 激动剂, 如描述于 WO 97/36579 中的 PPAR- α 激动剂;
- (j) PPAR- γ 拮抗剂, 如描述于 WO 97/10813 的 PPAR- γ 拮抗剂;
- (k)5-羟色胺(serotonin)重摄取抑制剂, 如氟西汀和舍曲林;
- 30 (l)一种或多种胰岛素致敏剂连同一种或多种描述于美国专利 6,291,495 中的口服摄入胰岛素、注射胰岛素、磺酰脲、双胍或 α -糖苷酶抑制剂;

(m)自身免疫剂;

(n)胰岛素受体酪氨酸激酶抑制剂的拮抗剂(美国专利 5,939,269 和 5,939,269);

(o) IGF-I/IGFBP-3 复合物(美国专利 6,040,292);

5 (p) TNF- α 功能拮抗剂(美国专利 6,015,558);

(q)生长激素释放剂(美国专利 5,939,387); 和

(r)抗胰岛淀粉样多肽抗体(美国专利 5,942,227)。

其它药物为上述定义中指定的或本领域专业人员熟知的。

10 该附加的分子以能达到预期目的有效剂量适当存在或联合给药,通常该剂量少于无 Dkk-5 情况下单独给药时的剂量。如果把它们组合在一起,制剂成分的量依照如研究对象、研究对象的年龄和体重、当前的临床状况、给药时间、剂型、给药方式等等来确定。例如,并用的药物优选使用的重量构成比约 0.0001-10,000 份对应 1 份本文的 Dkk-5。

15 降血糖药可以任何适合的技术给予哺乳动物,包括肠胃外的、鼻内的、经口的或其它任何有效途径。最优选地,注射给药(同胰岛素的给药方式)或经口途径。例如, MICRONASETM 片剂(格列苯脲)是 Upjohn 以适合口服给药的 1.25、2.5 和 5mg 每片浓度上市的。对于 II 型糖尿病的该种治疗,通常的维持剂量为每日 1.25-20mg,可以一次服用或按照认为合适的次数在一日中分次给药(Physician's Desk Reference, 2563-2565 (1995))。另一个实例是处方
20 获得的以格列苯脲为基础的片剂包括 GLYNASETM 标牌的药物(Upjohn)和 DIABETATM 标牌的药物(Hoechst-Roussel)。GLUCOTROLTM (Pratt)是格列吡嗪片剂的商标(1-环己基-3- [p- [2- (5-甲基吡嗪咪唑羧酰胺) 乙基]苯] 磺酰脲),有 5mg 和 10mg 的片剂,该药也可以给 II 型糖尿病饮食控制后需要降糖治疗的患者或对其它磺脲类药物停止反应的患者服用(Physician's Desk
25 Reference,1902-1903 (1995))。

与同时单独用胰岛素的剂量相比, Dkk-5 与胰岛素合用能使胰岛素的剂量降低。因而,诱发血管并发症和低血糖症的危险降低了,这二者是给予胰岛素时大量出现的问题。给予成人糖尿病患者胰岛素(体重约 50kg),例如,每日剂量通常约 10-100U(单位),优选约 10-80U,但这可能比内科医师确定的
30 的剂量小。给药同类型患者胰岛素分泌促进剂,例如,每日剂量优选约 0.1-1000mg,更优选约 1-100mg。例如,给药同类型患者双胍,每日剂量优

选约 10-2500mg, 更优选约 100-1000mg。给药同类型患者 α -糖苷酶抑制剂, 例如, 每日剂量优选约 0.1-400mg, 更优选约 0.6-300mg。给同样患者 ergoset、pramlintide、勒帕茄碱、BAY-27-9955 或 T-1095 在一个优选剂量约 0.1-2500mg, 更优选约 0.5-1000mg 是有效的。上述所有剂量都可以一日一次到几次给药。

Dkk-5 也可以同适合的非药物治疗方法联合使用治疗胰岛素抵抗, 如胰岛移植。

胰岛素抵抗哺乳动物给予 Dkk-5 的剂量将由内科医师根据相应状况确定, 包括哺乳动物的状况和选择的给药途径。本文提出的剂量范围不是旨在以任何方式限制本发明的范围。本文能达到目的的“治疗有效”剂量是由上述因素确定的, 但通常约为 0.01-100mg/kg 体重/日。优选剂量是约 0.1-50mg/kg/日, 更优选约 0.1-25mg/kg/日。还更优选, 每日给予 Dkk-5 时, 一个人的静脉注射和肌肉注射的剂量约为 0.3-10mg/kg 体重/日, 更优选地约 0.5-5mg/kg。至于皮下给药, 剂量优选大于静脉注射和肌肉注射治疗等效剂量。优选地, 一个人的每日皮下给药剂量约为 0.3-20mg/kg, 更优选地, 约 0.5-5mg/kg。

本发明考虑到了多种剂量时间表(dosing schedule)。本发明包含了连续给药剂量时间表, 在表中可以按规律(每日的、每周的、或每月的, 取决于剂量和剂型)给予 Dkk-5, 而没有实质性的间断。优选连续给药的剂量时间表包括每日的连续输注, 即每日输注 Dkk-5, 和连续大丸剂(bolus)给药剂量时间表, 即通过大丸剂注射或吸入或鼻内给药途径每日至少一次给予 Dkk-5。本发明还包含了间断给药剂量时间表(如间歇的和维持的)。该间断给药剂量时间表的准确参数将根据制剂、给药方式和所治疗哺乳动物的临床需要而改变。例如, 如果 Dkk-5 是输注给药, 给药时间表可包含给药的第一阶段和随后的第二阶段, 在第二阶段不再给大于、等于或小于第一阶段的 Dkk-5。

在大丸剂注射时, 特别是缓释制剂大丸剂注射给药时, 给药剂量时间表可以是连续的, 其中 Dkk-5 每日给药, 也可以是不连续的, 如上述的第一和第二阶段等等。

通过任何方法进行的连续或不连续给药时间表也包括给药剂量时间表, 在表中第一阶段的剂量自始至终是要调整的, 例如在第一阶段的开始剂量是低的, 然后升高直至第一阶段结束; 剂量最初是高的, 在第一阶段期间是降低的; 剂量最初是低的, 升高到峰水平, 然后减少直到第一阶段结束, 和它

们的任何组合。

给予 Dkk-5 的疗效可通过该领域熟知的许多种方法来判断。最普通地，糖尿病影响的减轻致使血糖控制改善(如同血葡萄糖连续测定监测到的那样)，维持好的血糖水平所需的胰岛素降低，血清胰岛素水平下降，糖基化红蛋白减少，血中晚期糖基化终产物(AGE)水平下降，“黎明现象”减轻，酮症酸中毒减轻和脂质谱改善。或者，给药 Dkk-5 可使糖尿病症状稳定，这显示为血葡萄糖水平下降，胰岛素需求降低，血清胰岛素水平下降，糖基化红蛋白和血中 AGE 减少，血管、肾、神经和视网膜并发症减少、妊娠并发症减少和脂质谱改善。

5 Dkk-5 降低血糖的作用可通过测定给药前后静脉血浆葡萄糖或 Hb(血红蛋白) A_{1c} 的浓度，然后比较给药前后得到的浓度来评价。Hb A_{1c} 指糖基化血红蛋白，是在对血葡萄糖浓度的反应中逐渐产生的。因而，Hb A_{1c} 作为血糖控制的一个指标被认为是重要的，它不易受糖尿病患者快速血糖变化的影响。

15 本发明还提供了治疗胰岛素抵抗病症的试剂盒。本发明的试剂盒包含一个或多个含有预定量的 Dkk-5 的容器，还有一套用法说明，通常是书面用法说明，涉及用 Dkk-5 治疗胰岛素抵抗病症，优选糖尿病，的用法和剂量。用法说明包含了试剂盒通常包含的关于治疗胰岛素抵抗病症的剂量、剂量时间表和给药途径等的信息。含 Dkk-5 的容器可以是单位剂量、大包装(例如多剂包装)或亚单位剂量。

20 Dkk-5 可以任何方便的、合适的包装方式进行包装。例如，如果 Dkk-5 是冻干制剂，带弹性塞子的安瓿或小玻璃瓶可通常用作容器，以便药物通过经弹性塞子注入的液体很容易地重新配制。无弹性可移动盖子的安瓿(如密封的玻璃)或带弹性塞子的安瓿最方便用于 Dkk-5 的可注射形式。在这种情况下，用法说明优选规定把小玻璃瓶的内容物放进一个注射器里立即注射使用。还考虑到的是可与特殊装置如吸入器、经鼻给药装置(如雾化器)或输注装置，如微型泵联合使用的包装。

该试剂盒包含一个含预定量的胰岛素抵抗治疗剂的容器。

诊断用途

25 许多不同的测定法和测定形式可用来检测样品中 Dkk-5 的量，并与对照品比较。这些形式可以依次在本发明的诊断测定中使用，该诊断测定用于检测哺乳动物胰岛素抵抗病症的存在或发作。

本领域熟知的任何可溶性分析样品的测定方法都可在本发明的实践中使用。这样的方法包括但不限于竞争和非竞争测定系统使用的技术，如放射免疫测定、酶免疫测定(EIA)，优选 ELISA、“夹心法”免疫测定、沉淀反应、凝胶扩散反应、免疫扩散反应、凝集反应、补体固定测定、免疫放射测定、5 荧光免疫测定、蛋白 A 免疫测定和免疫电泳测定。优选的免疫测定方法实例见美国专利 4,845,026 和 5,006,459。

在一个实施方案中，一种或多种抗-Dkk-5 抗体用来检测样品中 Dkk-5 的含量。为了诊断应用，如果抗 Dkk-5 抗体用于检测，该抗体通常用可检测的部分标记。优选地，这样的抗体用于免疫测定。在标记时一方面是标记一10 种或多种所用的抗 Dkk-5 抗体，另一方面是不标记第一抗体，而用标记的第二抗体来检测结合到第一抗体上的 Dkk-5，或是检测第一抗体。

可以利用的标记物很多，通常可分为以下几类：

(a)放射性同位素，如 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I 是可以得到的。例如抗体可用放射性同位素或放射性核素通过 Current Protocols in15 Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen 等, Ed. (Wiley-Interscience: New York, 1991)描述的技术标记，而放射活性可用闪烁计数仪测定。

(b)荧光标记物，如稀土元素螯合物(钆螯合物)或荧光素和它的衍生物(如异硫氰酸荧光素)、罗丹明和它的衍生物、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛、荧光胺、丹黄酰、丽丝胺和得克萨斯红是可以得到的。荧光20 标记物可用例如公开于 Current Protocols in Immunology(同上)的技术结合到抗体上，荧光可用荧光测定计定量。检测用抗体也可用发射荧光的金属，如 ^{152}Eu 或其他稀土属元素进行可检测标记。这些金属可用金属螯合剂如二乙三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)连接到抗体上。

(c)EIA 用的各种酶-底物标记物是可以得到的，美国专利 4,275, 149 对它们中的一些做了综述。酶通常催化显色底物的化学变化，而这可以用不同的技术测定出来。例如，酶可以催化底物的颜色变化，而这可通过分光光度计检测出来。可选择地，酶可以改变底物的荧光、化学发光、和生物发光。定量检测荧光变化的技术如上所述。化学发光底物经化学反应电子激活后发出可以测量到的光(例如用化学发光仪)或给予荧光受体能量。酶标记物的实例30 包括荧光素酶(例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶美国专利 4,737, 456)、荧光素、水母发光蛋白、2,3-dihydrophthalazinediones、苹果酸脱氢酶、脲酶、

过氧化物酶如辣根过氧化物酶(HRPO)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、酵母乙醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、葡萄球菌核酸酶、 δ -V-类固醇异构酶、磷酸丙糖异构酶、天冬酰胺酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、乙酰胆碱酯酶、杂环氧化酶(如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等等。连接酶到抗体上的技术公开于 O'Sullivan 等, *Methods in Enzym.*, ed. Langone 和 Van Vunakis (Academic Press:New York) 73:147-166(1981)。

酶-底物组合的实例包括:

10 (i) 以过氧化氢为底物的辣根过氧化物酶,其中过氧化氢使染料前体(如邻苯二胺(OPD)或 3,3', 5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMB))氧化;

(ii) 以对硝基苯基磷酸盐为生色底物的碱性磷酸酶(AP); 和

(iii) β -D-半乳糖苷酶(β -D- Gal)和生色底物(例如 p-硝基苯基- β -D-半乳糖苷酶)或产生荧光的底物 4-甲基伞形基(methylumbelliferyl)- β -D-半乳糖苷酶。

15 其它本领域熟知的众多酶-底物组合都可以使用。关于它们的综述见美国专利 4,275, 149 和 4,318, 980。

有时,标记物不直接连接到抗体上,本领域技术人员知道各种完成这一工作的技术。例如抗体可以连接到生物素上,而上面提到的三大类标记物中任何一种可以同亲和素结合,反之亦然。生物素选择性地与亲和素结合,因此,标记物以这种间接方式结合到抗体上。

20 可选择地,要完成标记物和抗体的间接连接,抗体要同一个小半抗原(如地高辛)相连,而上述不同类型标记物之一再同含半抗原的抗体连接(如抗地高辛抗体)。至此,标记物和抗体的间接连接完成了。

在本发明的另一个实施方案中,抗 Dkk-5 抗体不需要标记,而它的存在 25 可由结合到抗 Dkk-5 抗体上的经过标记的抗体检测出来。

本发明的抗体可用于已知的任何测定方法,如竞争性结合测定法,直接和间接夹心法测定和免疫沉淀测定(Zola, *Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。

30 在本发明的检测中,抗原 Dkk-5 或它的抗体优选结合到一个固相支持物或载体上。所谓“固相支持物或载体”意指能结合抗原或抗体的任何支持物。众所周知的支持物或载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、

尼龙、纤维素样淀粉、天然或修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁性物质。用于本发明的载体可以是某种程度上可溶的或是不可溶的。事实上支持物可以是可能的任何结构外形，只要连接的分子能够结合到抗原或抗体上。因此，支持物的构型可以是球面的，如珠子，或是圆柱形的，象试管的内表面或杆的外表面。可选择地，所述表面可以是平的，如薄片、测试条等。优选的支持物包括聚苯乙烯珠子。本领域技术人员知道其它许多适合抗体或抗原结合的载体，或能够通过常规实验确定的相同物质。

5 在一个优选的实施方案中使用的是抗体-抗原-抗体夹心法免疫测定，即测定抗原的方法包含第一抗体和抗原的结合、第二抗体和抗原的结合，及检测或测定已被第一抗体和第二抗体免疫特异性结合的抗原。在一个特定的实施方案中，第一和第二抗体是单克隆抗体。在该实施方案中，如果抗原不包含被单克隆抗体识别的重复抗原表位，第二单克隆抗体必须结合到不同于第一抗体所结合的位置上(这一点可通过例如与抗原结合的两个抗体之间不具备竞争性抑制反映)。在另一个特有的实施方案中，第一或第二抗体是多克隆抗体。在另一个特有的实施方案中，第一和第二抗体都是多克隆抗体。

15 在一个优选的实施方案中使用了一种“向前(forward)”夹心法酶免疫测定，就象下面概述的一样。直接针对 Dkk-5 的抗体(捕获抗体, Abl)粘附在固相基质上，优选微量反应板。样品同 Abl 包被的基质接触，以便样品中 Abl 特异的任何 Dkk-5 结合到固相 Abl 上。洗去未结合的样品成分。酶联的第二抗体(探测抗体, Ab2)可通过抗原的第二表位直接结合到被 Abl 捕获的抗原上，从而完成夹心过程。洗去未结合的 Ab2 后，加入酶的显色底物，与夹心物中酶的量成比例的有色产物形成了，可以反映样品中抗原的量。反应通过加入终止液终止。用分光光度计在合适的吸收波长测定颜色。根据抗原已知浓度制作标准曲线，根据它确定未知样品的值。

25 其它类型的“夹心法”测定是所谓的“同时(simultaneous)”或“反相(reverse)”测定。同时测定即当结合到固相支持物上的抗体和标记抗体同时加到受试样品中时，只需一步孵育。孵育完成后，洗去残余的样品液体和未形成复合物的标记抗体。然后与传统的“向前”夹心法测定一样，测定与固相支持物相结合的标记抗体的存在。

30 在“反相”测定中，逐步地先把标记抗体溶液加到样品溶液中，经适当时间的孵育后加入结合在固相支持物上的未标记抗体，第二次孵育后，按传统

方式洗去固相支持物上残余的受试样品和未反应的标记抗体溶液。可象“同时”和“向前”测定法一样检测结合在固相支持物上的标记抗体的量。

包含一个或多个装有完成本发明的测定所需成分的容器或小玻璃瓶的试剂盒也在本发明的范围内。这样的试剂盒是含有预定量试剂的包装的组合，配有进行诊断测定的用法说明。例如，这样的试剂盒包含一种抗体或多种抗体，优选一对抗 Dkk-5 抗原的抗体，优选这对抗体不竞争抗原同一个结合位点。在一个特有的实施方案中，Dkk-5 可预先吸附到固相基质上。试剂盒优选包含本领域熟知的其它必需的清洗剂。对于 EIA，试剂盒包含显色底物和显色后终止酶反应的试剂。试剂盒包括的底物是与连接到抗体制剂上的酶适合的物质。它们是本领域熟知的，而一些是在下面例示的。该试剂盒可选择地包含 Dkk-5 标准品，即对应于标准品中正常量 Dkk-5 的纯化 Dkk-5 的量。

抗体用酶标记时，该试剂盒将包括底物和酶需要的辅因子(如能提供可检测发色团或荧光团的底物前体)。另外，也可以包括其它添加剂，如稳定剂、缓冲液(例如阻断性缓冲液或溶解缓冲液)等等。不同试剂的相对量可宽范围改变，以得到基本上使测定灵敏度最优化的试剂溶液的浓度。特别地，所述试剂可以干粉，通常是冻干的形式提供，包括溶解时可提供具有合适浓度的试剂溶液的赋形剂。

在一个特有的实施方案中，用于检测胰岛素抵抗病症的存在或发作的诊断试剂盒包含：(1)一个容器，包含与 Dkk-5 结合的抗体；(2)一个容器，包含一个含 Dkk-5 的标准品；和(3)用抗体和标准品检测病症的用法说明，其中连接 Dkk-5 的抗体进行了可检测到的标记，或该试剂盒另外包括另一容器，该容器含有第二抗体，该抗体已经过可检测标记，并能与 Dkk-5 结合或能与 Dkk-5 结合抗体结合。优选地结合到 Dkk-5 上的抗体是单克隆抗体。

在另一个特定的实施方案中，本发明的试剂盒在一个或多个容器中包含：(1)固相载体，如包被了第一抗体的微反应板；(2)一个可检测标记的第二抗体；和(3)一种含能够被第一和第二抗体识别的 Dkk-5 分子的标准品，和合适的用法说明。

用转基因动物筛选

肌细胞过表达 dkk-5cDNA 的非人转基因动物可被用来筛选有效提高血中葡萄糖廓清率的候选药物(蛋白质、肽、多肽、小分子等)，以指出一种胰

胰岛素抵抗病症的治疗方法。

5 在一个实施方案中，转基因动物是通过把 dkk-5 转基因引入非人动物的胚系中。可以用不同发育期的胚的靶细胞引入转基因。不同方法的选用取决于胚靶细胞的发育期。用于本发明实践的任何动物特定的系都要选择一般健康状况良好的、胚胎产量好的、胚胎中生殖核的可视性好的和繁殖适应性好的。另外，单倍型是一个重要的因素。例如，当生产转基因小鼠时，经常使用品系如 C57BL/6 或 FVB 系。本发明使用的系可以自身是转基因的，和/或基因敲除的(即从一种或多种基因部分或全部被抑制的动物获得的)。

10 转基因构建体可被引入单细胞阶段(single-stage)的胚胎。受精卵是最好的显微注射目标。受精卵作为基因转移目标的主要益处是在大多数情况下注入的 DNA 可以在第一次分裂前掺入到宿主基因中(Brinster 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4438-4442 (1985))。结果转基因动物的所有细胞都将携带掺入的转基因。这一般可反映在转基因有效传递到创建者(founder)的后代上，因为 50%的生殖细胞会携带转基因。

15 正常地，受精的胚孵育在合适的培养基中直到生殖核出现。大约在这个时间，包含转基因的核苷酸序列引入到雌性或雄性生殖核中。在一些物种中，如小鼠，雄性生殖核是优选的。外源性遗传物质可以在其被卵细胞核或受精卵的雌性生殖核处理前加到雄性受精卵 DNA 互补体(complement)中。

20 因此，外源性遗传物质可以在其被雌性生殖核作用前加到雄性 DNA 互补体或任何其它的 DNA 互补体中，这是在雄性和雌性生殖核分离得很好并且二者都接近于细胞膜的时候。可选择地，外源性遗传物质可以在精子解凝后加到精子的细胞核中。然后包含外源性遗传物质的精子可加到卵子中，或解凝后的精子可加到卵子中，其后尽快加入转基因构建体。

25 任何能把外源性遗传物质加到核遗传物质中的技术都可以使用，只要它不会破坏细胞、核膜或其它现有细胞的或遗传的结构。可以用任何本领域熟知的方法完成转基因核苷酸序列到胚胎的引入，如显微注射、电穿孔或脂转染。外源性遗传物质优选用显微注射插入到核遗传物质中。细胞和细胞结构的微注射是本领域熟知和使用的。在小鼠，雄性生殖核直径达到约 20 μ m，此时可重复注射 1-2 pl 的 DNA 溶液。转基因核苷酸序列引入到胚胎后，胚胎
30 可在体外孵育不同时间，或再植入到代育宿主体内，或二者都做。体外孵育至成熟是在本发明范围内。一个普通的方法是体外孵育胚胎约 1-7 天，取决

于物种，然后把它们植入到代育宿主体内。

加到受精卵的转基因构建体的拷贝数取决于所加的外源性遗传物质的总量，并且将是能发生遗传转化的量。理论上只需要一个拷贝，但是通常要用很多拷贝数，例如，1.000-20.000 个拷贝的转基因构建体，以确保一个拷贝是有功能的。关于本发明，有一个优点：在插入的外源性 DNA 序列中有

5 多于一个的有功能的拷贝，以增强它的表型表达。

代育宿主的转基因后代可以通过任何方法用转基因的存在和/或表达来筛选。筛选常用一个至少同转基因的一部分互补的探针通过 DNA 印迹或 RNA 印迹分析完成。用抗由转基因编码的 Dkk-5 的抗体进行的蛋白质印迹

10 分析可作为可选择的或另外的方法以筛选转基因产物的存在。通常，DNA 由尾部组织制备，然后用 DNA 印迹或 PCR 分析转基因。可选择地，用认为转基因表达水平最高的组织或细胞通过 DNA 印迹或 PCR 来检测转基因的存在和表达，尽管任何类型的组织和细胞都可用于这项分析。

评价转基因存在的可选择的或另外的方法包括但不限于合适的生物化学测定，如酶和/或免疫学测定、特殊标志或酶活性的组织学染色、流式细胞

15 术分析等等。血液分析也可以用来检测血液中转基因产物的存在，也可以用血液成分如葡萄糖的水平评价转基因的功能。

转基因动物的后代可通过转基因动物和适合的配偶交配，或通过转基因动物的卵或精子体外授精来获得。与配偶进行交配时，配偶可以是，也可以

20 不是转基因或基因敲除动物，如果它是转基因的，它可以包含相同或不同的转基因，或二者都包含。可选择地，配偶可以是亲代品系。用体外授精时，受精的胚胎可以植入到代育宿主体内或体外孵育，或二者都做。用任一方法，后代都可以用来通过上述方法或其它合适方法评价转基因的存在。

按照本发明产生的转基因动物包括外源性遗传物质，即导致 Dkk-5 生成的 DNA 序列。该序列将被可操作地连接于转录调控元件如启动子上，优选

25 其允许转基因产物在特定类型的细胞中表达。本文最优选的这样的调控元件是肌肉特异的启动子，它能使 dkk-5cDNA 在肌肉组织中过表达。这样的启动子的实例是肌球蛋白轻链启动子(Shani, Nature, 314:283-6 (1985))，或驱动 smoothelin A 或 B 表达的启动子，或类似的启动子，如 2002 年 3 月 15 日公

30 开的 WO01/18048 中描述的类似的启动子。

也可以用逆转录病毒感染把转基因引入非人动物体内。发育的非人胚胎

可在体外培养到胚泡期。在此期间，卵裂球(blastomere)是逆转录病毒感染的目标(Jaenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73:1260-1264 (1976))。可通过酶处理去除透明带获得卵裂球的有效感染(Manipulating the Mouse Embryo, Hogan, ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1986))。通常，用于引入转基因的病毒载体系统是携带转基因的复制缺陷逆转录病毒(Jahner 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6972-6931 (1985); Van der Putten 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6148-6152 (1985))。通过在单层病毒产生细胞上培养卵裂球很容易和有效地获得转染(Van der Putten 等, 同上; Stewart 等, EMBOJ., 6:383-388 (1987))。可选择地，在晚期可以进行注射。病毒或病毒产生细胞可注射到囊胚腔中(Jahner 等, Nature, 298:623-628 (1982))。大多数创建者是转基因的嵌合体，因为掺入只发生在形成非人转基因动物的细胞的亚型上。此外，生成者可包含不同逆转录病毒转基因在基因组不同位置的插入，它们通常在后代中是分离的(segregate)。另外，通过妊娠中期子宫内逆转录病毒感染把转基因引入生殖系也是可能的(Jahner 等 (1982), 同上)。

第三种用于转基因引入的靶细胞是胚胎干细胞(ES)。ES 细胞来自体外培养的要植入的胚，并与胚胎融合 (Evans 等, Nature, 292:154-156(1981); Bradley 等, Nature, 309:255-258 (1984); Gossler 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:9065-9069 (1986)); Robertson 等, Nature, 322:445-448 (1986))。转基因可通过 DNA 转染或逆转录病毒介导的转染有效地引入 ES 细胞。其后如此改变的 ES 细胞同来自非人动物的胚囊结合。其后，ES 细胞定居在胚胎并进入到将形成嵌入型动物的生殖系中。相关的综述见 Jaenisch, Science, 240:1468-1474 (1988)。

候选药物以合适的剂量给予这样的动物(通过如吸入、摄食、注射、植入等)，测定葡萄糖廓清率或摄取潜力来评价其治疗胰岛素抵抗病症的能力以筛选候选药物。葡萄糖廓清率或摄取升高表示药物具有治疗糖尿病和其它胰岛素抵抗病症的能力。

用 Dkk-5 做基因治疗

Dkk-5 可用在治疗糖尿病的基因治疗上。可使用不同的方法，如皮肤的基因治疗或逆转录病毒载体基因治疗以纠正勒帕茄碱(leptin)缺陷，这样可以产生与人先天性肥胖症和糖尿病一样的脂肪组织和胰岛素抵抗减少的表型。另一个通过基因治疗恢复胰岛素敏感性的方法是 Ueki 等, J. Clin. Invest.,

105:1437-1445 (2000)描述的用腺病毒介导的基因治疗。另外的方法是 Otaegui 等, Human Gene Therapy, 11:1543-1552 (2000) 描述的用基因治疗通过骨骼肌工程学表达 Dkk-5 编码 DNA 抵消糖尿病的高血糖症。

5 下面的实施例提出来以帮助理解本发明,当然不应该被解释作本发明在本文的描述和权利要求的明确限制。本发明在本领域相应范围内的变更,包括现在已知的或后来发展的所有相等物的替代,都将考虑列入在下文中本发明权利要求范围内。本文公开的所有引文都是合并参考文献编入的。

实施例 1

Dkk-5 的作用

10 材料与方法

L6 细胞培养

L6 成肌细胞在由 MEM α (Gibco-BRL)组成的生长培养基中增殖,所述 MEM α 含 10%胎牛血清的生长培养基。在细胞汇合前用胰酶分散细胞,然后再接种到新鲜的生长培养基中。成肌细胞融合是在细胞汇合时把培养基改为
15 分化培养基(含 2%胎牛血清的 MEM α)诱导的。细胞在该培养基中生长 3-9 天,而用于治疗应长于 28 小时, Dkk-5 加入该培养基中。短于 28 小时的治疗在含 0.5%胎牛血清(FBS)的 MEM α 中进行。

重组 Dkk-5 的表达

人类的 Dkk-5 (hDkk-5) (见本文表 2 的 SEQ ID NO:5) 是在杆状病毒感染
20 的昆虫细胞中作为 C-末端 8X 组氨酸标记融合体表达,经镍亲和柱层析法 (WO01/40465 和 WO 01/16319)纯化。纯化的蛋白的同一性用 N-端序列分析验证。纯化蛋白的内毒素水平少于 0.3 EU/ml。

DOG 摄取

对照细胞和 Dkk-5 处理细胞在含 0.5 μ Ci 的 2-脱氧[14 C] 葡萄糖有或无
25 0.5 μ M 胰岛素的 Krebs-Ringer 磷酸盐-HEPES 缓冲液 (KRHB) (130mM NaCl、5mM KCl 1.3mM CaCl₂、1.3mM MgSO₄、10mM Na₂HP0₄ 和 25mM HEPES, pH 7.4)中 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。细胞用 KRHB 洗两次后用 100 mM NaOH 裂解,在细胞裂解物中细胞内 2-脱氧[14 C] 葡萄糖的量可用液体闪烁计数器(LSC)测定。

30 糖原合成

糖原合成用掺入糖原的[14 C] 葡萄糖来确定。对照 L6 细胞和 Dkk-5 处理

的细胞在含[U-¹⁴C]葡萄糖(5mM 葡萄糖; 1.25 μ Ci/ml)的无血清 MEM α 中, 在有或无 0.5 μ M 胰岛素的情况下孵育 2 小时。通过去除培养基终止实验, 细胞用冰冷的 PBS 快速洗三次, 然后用 20% (w/v) KOH 裂解, 1 小时后加入 1 M HCl 中和。裂解物煮沸 5 分钟, 离心澄清, 用 1 mg/ml 冷的糖原作载体, 用 5 异丙醇 0 $^{\circ}$ C 沉淀上清液中的细胞糖原 2 小时。离心分离沉淀的糖原, 用 70% 乙醇洗涤, 用水再溶解, 用 LSC 测定掺入糖原中的 [¹⁴C] 葡萄糖。

葡萄糖掺入脂质

对照和处理的 3T3 L1 脂肪细胞在含 D-[U-¹⁴C]葡萄糖(0.2 μ Ci/ml) 的无血清 MEM α 中, 在有或无 0.5 μ M 胰岛素的情况下, 37 $^{\circ}$ C 培养 2 小时。细胞用 10 冰冷的 PBS 洗两次, 然后用 100 mM NaOH 裂解。裂解物用 100 mM HCl 中和。裂解物中的细胞脂质用 n-庚醇提取, 用液体闪烁计数器(LSC)测定掺入脂质中的 [¹⁴C] 葡萄糖。

实时定量 PCR

RTQ-PCR 是用 ABI PRISM 7700TM 序列测定系统的设备和软件(PE 15 Applied Biosystems, Inc. , Foster City, CA)按照 Gibson 等, GenomeRes., 6:995-1001 (1996) and Heid 等, GenomeRes., 6:986-994 (1996)的描述进行的。

分析

除非另外声明, 所有资料用均数加减标准差表示。对照同处理的细胞的比较和转基因同野生型小鼠的比较采用不成对斯氏(student's)t 检验进行。

20 3T3/L1 脂肪细胞的培养

3T3/L1 纤维母细胞生长至汇合并分化为脂肪细胞(Rubin 等, J. Biol. Chem., 253:7570-7578 (1978)). 诱导分化后 72 小时用 Dkk-5 处理分化的细胞。

动物

所有方案都经 Institutional Use and Care Committee 认可。除非另外声明, 25 小鼠在标准实验室中, 在控制温度和湿度的环境下饲养, 采用 12 小时 (6.00pm/6.00am)光周期。

转基因小鼠

人 dkk-5 cDNA 连接到在肌球蛋白轻链启动子之前的 pRK 剪接供体/受体位点的 3' 端(Shani, Nature 314:283-6(1985)). dkk-5 cDNA 之后连接存在于 30 人生长激素基因的第四和第五个外显子之间的剪接供体/受体位点(Stewart 等, Endocrinology. 130:405-414 (1992))。全部表达片段从杂合(contaminating)

的载体序列中纯化出来,注射到从 FVB X FVB 交配得到的单细胞小鼠卵内。转基因小鼠通过从尾部活组织检查提取 DNA 进行 PCR 分析来鉴定。

结果

Dkk-5 是同蛋白的 dickkopf 家族高度相关的分泌蛋白。见表 1 和表 2。

- 5 本发明者通过放射杂交作图,把 Dkk-5 基因定位在 1 号染色体 DIS434 (32.2 cM)和 DIS2843 (48.8 cM)之间。这一定位为来自其它序列测定工作的资料所证实,就象公共序列数据库的 BLAST 分析确定的一样(如下)。

HS330 O12 人染色体 1 克隆 RP3-330O12 图 p36.11-36.23,

测序过程,按次序排列.119969 bp

- 10 DNA,HTG 28-JUN-2001

登录号 AL031731

版本 AL031731.36 GI:14575526

来源 人

有机体 人

- 15 参考 1 (1119969 个碱基)

作者 Martin, S.

标题 直接提交

递交的杂志 (26-JUN-2001) Sanger Centre, Hinxton, Cambridgeshire,CB 10 ISA, UK. 评论 2001 年 6 月 28 日, 该序列版本取代 gi:14422201.

- 20 如图 3 所示,研究发现 Dkk-5 可以在成人的组织中广泛表达。如上所述这是经实时定量 PCR 测定的。

- 25 在小鼠胚胎发育的时候 Dkk-5 表达是有差异的。小鼠胚胎的实时定量 RT-PCR 分析显示, Dkk-5 在第 10 天 p.c.开始表达,持续到第 16 天 p.c., 在第 12 天 p.c.达到高峰。见图 4。全胚的原位杂交分析显示该表达是在中脑后脑接合部并沿着顶板,一个中胚层发育特化的重要区域。见图 5。

- 30 结果显示在 L6 肌细胞分化的时候, Dkk-5 表达是受到调节的。转录水平就象实时定量 RT-PCR 测定的那样,在分化的第 3 天开始升高,在分化的第 7 天开始下降。图 6 显示了在 L6 细胞分化第 1 天到第 8 天 Dkk-5 的相对表达水平。这种表达模式对应于 L6 细胞对 Dkk-5 的反应时间阶段,也对应于可检测到 Dkk-5 与 L6 细胞结合的时间阶段。

当在杆状病毒感染的昆虫细胞中表达时,全长的 Dkk-5 蛋白从内部剪

接,形成从 16-kDa 到 20-kDa 的三个裂解产物。在图 7 所示的胶上,条带“b”对应于全长蛋白。包含信号序列的全长蛋白的 N-末端序列是 MAGPAIHTAPML (SEQ ID NO:6)。成熟蛋白从 GALAPGTP (SEQ ID NO:7) 开始,以便信号肽裂解位点是在 SEQ ID NO:5 第 24 位的丙氨酸和第 25 位的甘氨酸之间。“a”条带群对应于内部剪接蛋白,都有氨基末端序列 MALFDWTDYEDLK (SEQ ID NO:8)。该蛋白形成二聚体(图 7 泳道 1 的条带 c),其在还原条件下转变成单体形式。16-kDa 的剪接蛋白在用 MONO-Q™ 牌的柱子经阴离子交换层析法从重组生产的全长 Dkk-5 制剂中大部分纯化(纯度约 90%)后,可提高肌细胞的基础代谢和胰岛素刺激的葡萄糖摄取。下面的实验中提到的 Dkk-5 是一个包含全长和内部剪接蛋白的混合物制剂,其中大约含 5%的剪接蛋白。

剪接蛋白片段可以通过任何标准的蛋白质化学技术,不限于离子交换层析法,从全长的重组蛋白和任何其它不想要的蛋白中纯化出来。另外,大量的 Dkk-5 全长蛋白可以伴随有限的蛋白酶解进行表达,以获得大部分剪接物质;分子中精氨酸-精氨酸位点也可剪接,得到的想要的裂解产物可用大小排阻或其它本领域专业人员熟知的传统的蛋白质纯化技术纯化。

用 Dkk-5 处理 L6 肌细胞提高了葡萄糖(2-DOG)的摄取。见图 8。Dkk-5 的作用可以在 48 小时内观察到(图 8A),并依赖于细胞的分化状态。Dkk-5 处理提高胰岛素依赖的葡萄糖摄取的作用在 96 小时更显著($p=0.001$)(图 8B),尽管甚至在 48 小时时就可以观察到这一作用 ($p=0.05$)。

用 Dkk-5 处理 L6 肌细胞提高了糖原中葡萄糖的掺入。见图 9。如图 9A 所示,Dkk-5 的作用可以在 48 小时内观察到($p=0.003$),而且,这种作用可通过 Akt 和/或 GSK-3p 活性调节来介导,而二者都是 Wnt 和胰岛素信号通路上的媒介物,对此的解释,不限于任何一种理论。

Dkk-5 在 L6 细胞中影响了肌发生。因为 Dkk-5 的作用是在长期治疗后观察到的,不限于任何一种理论,蛋白通过影响 L6 细胞分化而发挥作用是可能的。用 TAQMAN™ PCR 完成的 RT-PCR 分析测定了涉及到肌发生的基因,如肌球蛋白重链(MHC)、肌球蛋白轻链(MLC)、肌细胞生成素(myogenin)、Pax3、Myf5 和 MyoD 基因在 Dkk-5 处理后的 L6 肌细胞中的表达水平。图 10A-G 显示 Dkk-5 处理导致在分化的第 4 和第 6 天之间肌细胞生成素和 MyoD 的表达及分化的第 2 和第 4 天之间 MLC、Myf5 和 Pax3 的表达发生改

变。

在肌细胞中 Dkk-5 调节了胰岛素信号通路的基因的表达。RT-PCR 分析 (TAQMAN™) 测定 Dkk-5 是否影响涉及葡萄糖代谢的基因的表达水平。如图 11 所示, Dkk-5 处理 96 小时后提高了 Akt (2 倍), 糖原合酶(4 倍), 和 IRS-1(2 5 倍)的表达, 降低了 IRS-2 的表达(处理 48 小时后 0.2 倍)和 Glut-1、PDK-1 的表达(96 小时后)。

用抗 Dkk-5 多克隆抗体和抗组氨酸 8 表位标记的单克隆抗体的 FACS 分析证明, Dkk-5 是从分化的第 2 天到第 5 天结合 L6 细胞, 但这种结合到第 6 天减少/消失了。Dkk-5 与 L6 的结合可通过使蛋白变性解除, 可被过量 Fc- 10 标记的 Dkk-5 竞争, 而不受过量不相关的组氨酸-标记的蛋白影响, 提示这是一个特异的相互作用。见图 12。因此, Dkk-5 在肌细胞表面有特异的受体。相关蛋白 Dkk-1 与 LRP6 结合, 不限于任何一种理论, 很可能 Dkk-5 也通过这个受体起作用。本发明者发现这些受体在 L6 细胞上表达, 其它人发现其 15 在小鼠和人正常肌肉中表达(Hey 等, Gene, 216:103-111 (1998); Brown 等, Biochem.

Dkk-5 处理降低了脂肪细胞基础和胰岛素刺激的葡萄糖摄取。特别是 Dkk-5 处理的 3T3L1 细胞显示基础和胰岛素刺激的葡萄糖摄取水平增加了 (图 13A 和 13B), 胰岛素刺激后脂质的葡萄糖掺入也增加了(图 14A 和 14B)。处理后 48 小时可观察到的胰岛素依赖葡萄糖摄取增加, 处理 96 小时增加更 20 明显, 在脂质中, 胰岛素依赖的葡萄糖掺入也观察到相似的情况。

以肌肉特异的启动子为对照, 通过分析表达 Dkk-5cDNA 的转基因小鼠的葡萄糖代谢确定 Dkk-5 在体内的作用(Shani, 同上)。初步结果显示这些特殊的转基因动物葡萄糖代谢没有任何改变。不限于任何一种理论, 这个结果可归因于这些动物中该蛋白的低表达、蛋白裂解的不正确或缺失, 或者是该 25 蛋白从肌细胞到邻近细胞的分泌缺失, 从而解释未观察到任何对葡萄糖代谢明显的影响。用不同的启动子或其它表达系统, 如在 dkk-5 DNA 任何一端不同的剪接供体/受体位点, 以期得到较高表达。另外, 用本领域技术人员常见的合适的起始密码子和表达构建体中的其它元件, 对编码 Dkk-5 的唯一活性裂解产物, 如 16-kDa 的内部裂解产物, 的 cDNA 进行表达, 可测定它在 30 这些转基因动物中对葡萄糖代谢的影响。

总结和讨论

Dkk-5 对肌细胞和脂肪细胞的葡萄糖摄取有显著的影响。Dkk-5 处理的肌细胞对胰岛素治疗更敏感。在肌细胞中，Dkk-5 处理刺激糖原的葡萄糖摄入轻度增高，而，不限于任何一种理论，这可能归因于它对糖原合成酶表达水平的影响。Dkk-5 也可能通过影响胰岛素信号通路蛋白的表达水平发挥它在肌肉中对葡萄糖代谢的作用。此外，很可能 Dkk-5 也影响了胰岛素信号通路蛋白的活性和/或调节了胰岛素诱导的葡萄糖运载体(transporter)(GLUT-4)在 L6 细胞中的易位(translocation)。

在脂肪细胞，处理后 96 小时 Dkk-5 处理增加了基础的及胰岛素刺激的葡萄糖摄取，和脂质的葡萄糖掺入。脂肪细胞的葡萄糖摄取和脂质聚积依赖于细胞的分化状态，而脂肪细胞的分化是由 Wnt 信号调节的。可以认为，活性 Dkk-5 过表达的小鼠增加了对葡萄糖的耐受。

结论

Dkk-5 在 L6 肌细胞中影响了葡萄糖的代谢，预计用类似于以上所述的表达系统使该蛋白在其肌肉中过表达的转基因小鼠上也会产生同样的作用。同样也可以预计，使用如图 7 胶中所示，包含全长和它的 16-kDa 部分的注射用重组 Dkk-5 蛋白制剂或只有 16-kDa 部分的注射剂也能治疗哺乳动物胰岛素抵抗。用 Dkk-5(全长和 16- kDa 内部裂解产物)处理肌细胞可导致基础和胰岛素刺激的葡萄糖摄取增加。这个作用是在长期治疗后观察到的，提示，不限于任何一种理论，Dkk-5 可能影响肌肉分化和胰岛素信号通路中蛋白的活性和表达水平。以上观察显示 Dkk-5 诱导了胰岛素敏感性。胰岛素抵抗是大多数 NIDDM 的重要特点。因此，Dkk-5 在胰岛素抵抗病症的治疗中会是有效的，而且 Dkk-5 还可以用作该病症检测中的诊断标记物。Dkk-5 也预期能抑制转基因动物模型糖尿病表型的进展(progression)，例如，象公开于美国专利 6,187,991 的一样，既可用于鉴定治疗胰岛素抵抗病症的新药，又可用于使用 Larcher 等(同上),Ueki 等(同上)和 Otaegui 等(同上)提出的技术进行的基因治疗中。

实施例 2

抗-Dkk-5 单克隆抗体的制备

五只雌性 Balb/c 小鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, DE)用纯化的重组多组氨酸标记(HIS8)的人 Dkk-5 超免疫(hyperimmunize),所述人 Dkk-5 表达于杆状病毒感染的昆虫细胞(按实施例 1 中的参考文献制备)，并用

RIBI™ 佐剂(RibiImmunochem Research, Inc., Hamilton, MO)稀释。每周免疫两次动物, 每只动物用 50μl, 足垫给药。注射 5 次后, 从 5 只小鼠的淋巴结中取出具有高抗 Dkk-5 抗体效价的 B 细胞, 用 Kohler 和 Milstein(同上), 以及 Hongo 等,Hybridom 14:253-260(1995)中所描述的方法同小鼠骨髓瘤细胞 (X63.Ag8.653;美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA)融合。10-14 天后收集上清, 并用直接 ELISA 筛选抗体产物。经有限稀释在第二轮亚克隆之后, 将显示最高免疫结合的 7 个阳性克隆注射到 PRISTANE™ 致敏的小鼠体内 (Freund and Blair, J. Immunol., 129:2826-2830 (1982)), 以在体内产生单克隆抗体。汇集腹水后用蛋白 A 亲和层析柱(PHARMACIA™ fast-protein liquid chromatography [FPLC]; Pharmacia, Uppsala, Sweden)纯化, 如 Hongo 等(同上)所述。纯化的抗体制剂进行无菌过滤(0.2μm 孔径, Nalgene, Rochester NY), 4℃保存在磷酸缓冲盐溶液(PBS)中。

从以下保藏的杂交瘤制备的这些抗体, 可通过如上所述的技术用于在本文提出的诊断方法中。

15 材料的保藏

下面的材料已被保藏在美国典型培养物保藏中心, 10801 Blvd.大学, 马萨诸塞, VA 20110-2209, USA (ATCC):

| 名称 | ATCC 保藏号 | 保藏日期 |
|-----------------------------|----------|-----------------|
| DKK5. MAB3060.7A9. 1A1. 2G5 | PTA-3090 | 2001 年 2 月 21 日 |
| DKK5.MAB3058.13E10.1G4. 2B8 | PTA-3091 | 2001 年 2 月 21 日 |
| DKK5. MAB3059.3A4.1B10. 1G8 | PTA-3092 | 2001 年 2 月 21 日 |
| DKK5. MAB3057.6C5. 2C2. 2E3 | PTA-3093 | 2001 年 2 月 21 日 |
| DKK5. MAB3063.11A82F1. 2B8 | PTA-3094 | 2001 年 2 月 21 日 |
| DKK5.MAB3061. 11H3. 2F6.1E3 | PTA-3095 | 2001 年 2 月 21 日 |
| DKK5. MAB3056.7H4.1H6. 2B3 | PTA-3096 | 2001 年 2 月 21 日 |

上述保藏是依照关于用于专利程序目的的微生物保藏国际认可的布达佩斯条约的规定进行的。这确保了从保藏之日起 30 年保藏培养物的存活。

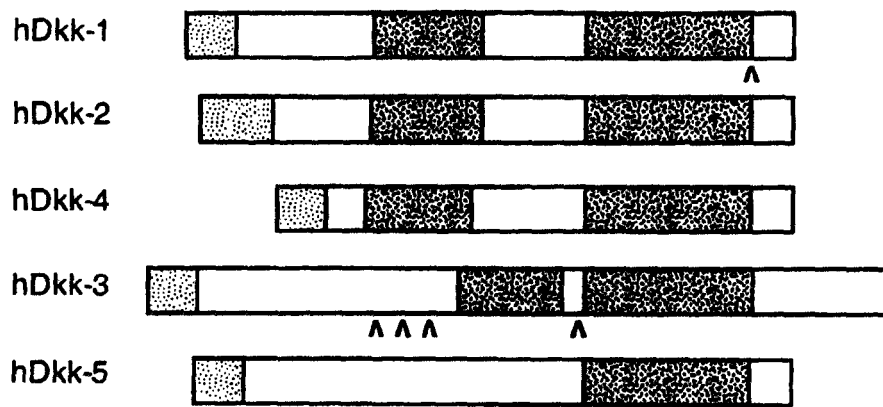
20 该保藏物依据布达佩斯条约的条款, 并遵从 Genentech, Inc.和 ATCC 间的协议, 可通过 ATCC 得到, 这确保了在相关美国专利授权时, 或在对任何美国或外国专利申请的公众开放时, 公众无论先后可永久、不受限制地得到该保藏物的培养后代, 并保证了按照 35 USC 章节 122 和所遵循的委员会条款(包

括 37CFR 章节 1.14, 具体参照 886 OG 638), 由美国专利和商标委员会确定的有资格者获得该培养物的后代。

本申请的申请人同意, 如果在合适的条件下培养时, 保藏材料的培养物死亡或丢失或毁坏, 一经得到通知便迅速用另一相同者来代替。在违反任何政府的权利部门按照其专利法授予的权利时, 保藏材料的可获得性不解释为可以实施本发明的一种许可。

前面的书面说明被认为足以使本领域技术人员实施本发明。本发明不通过所保藏的构建体限定范围, 因为保藏的实施方式只为了对本发明一些方面进行描述, 而任何功能相等的构建体都在本发明范围内。本文材料的保藏不构成承认本文包含的书面说明不足以实施本发明的任何方面, 包括这其最佳方式, 也不解释为对它代表的具体说明的权利要求范围的限制。的确, 除那些本文展示和描述的以外, 在前面描述的基础上, 对本发明所作的各种修改, 对该领域技术人员而言将是显而易见的, 自然落入本发明权利要求范围内。

原则上, 本发明优选的实施方式和方式在前面的说明书中已经加以描述了。然而, 本文所要保护的发明不解释为只限于所公开的具体形式, 因为这些具体形式是用于说明而非限制。本领域技术人员在不偏离本发明的基础上可以作多种修改和变动。



^表示推定的糖基化位点

图 1

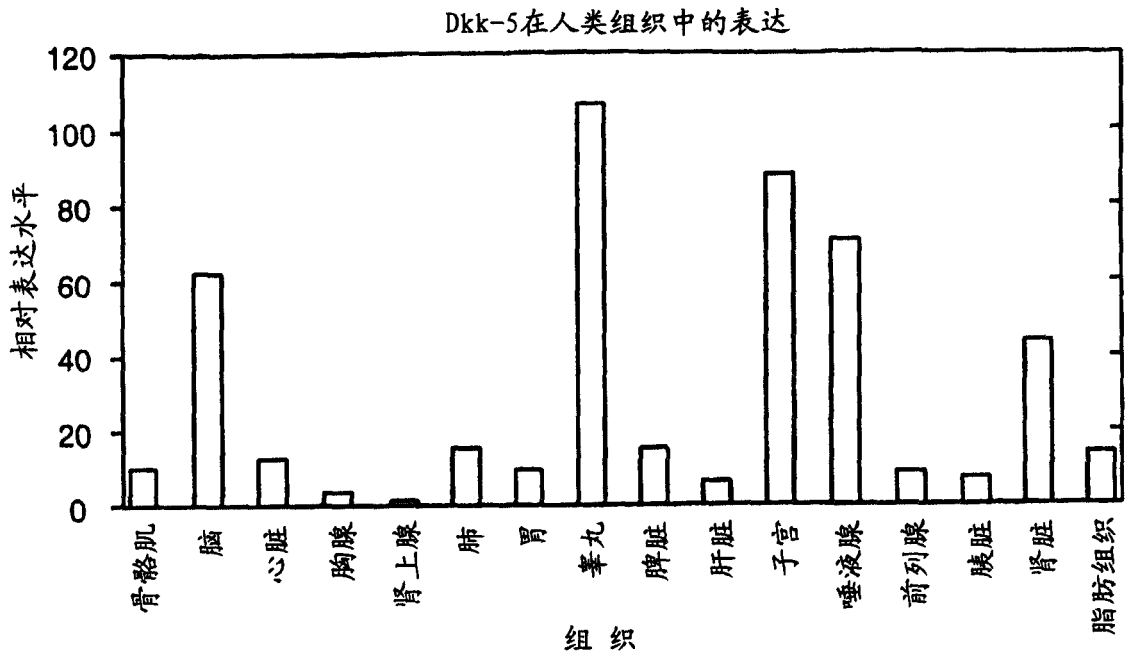


图 3

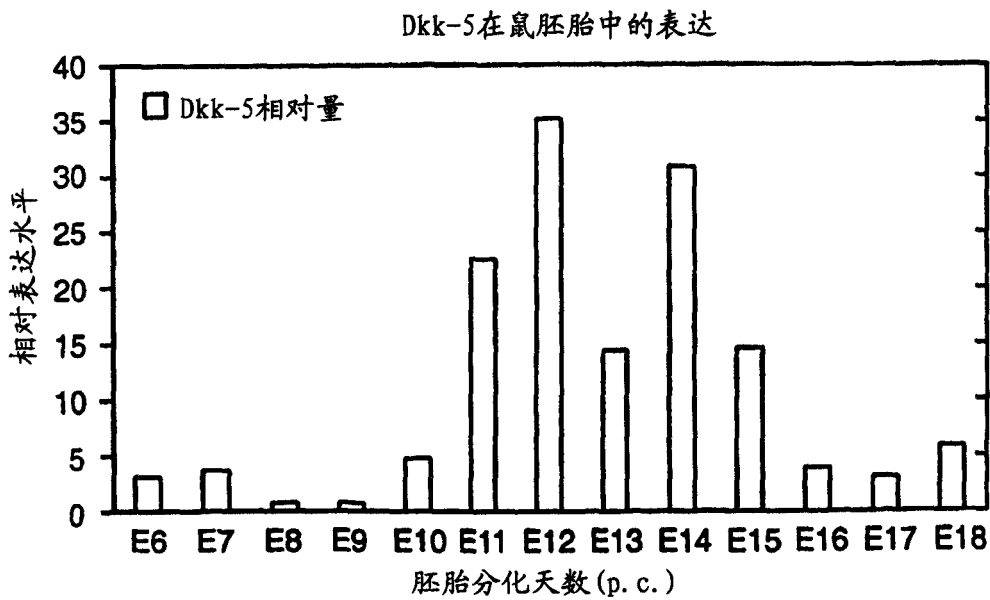


图 4

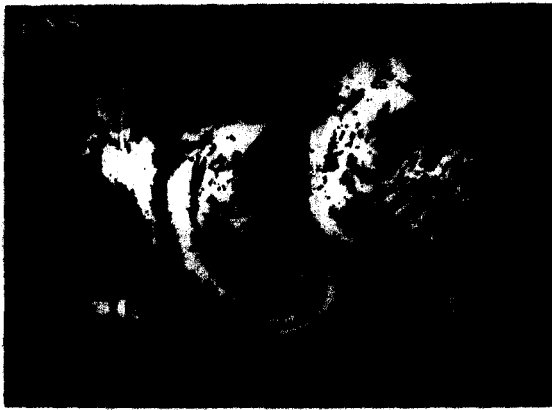


图 5A

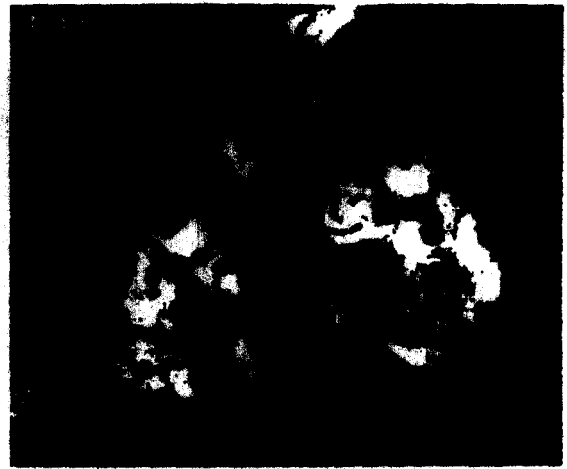


图 5B



图 5C



图 5D



图 5E

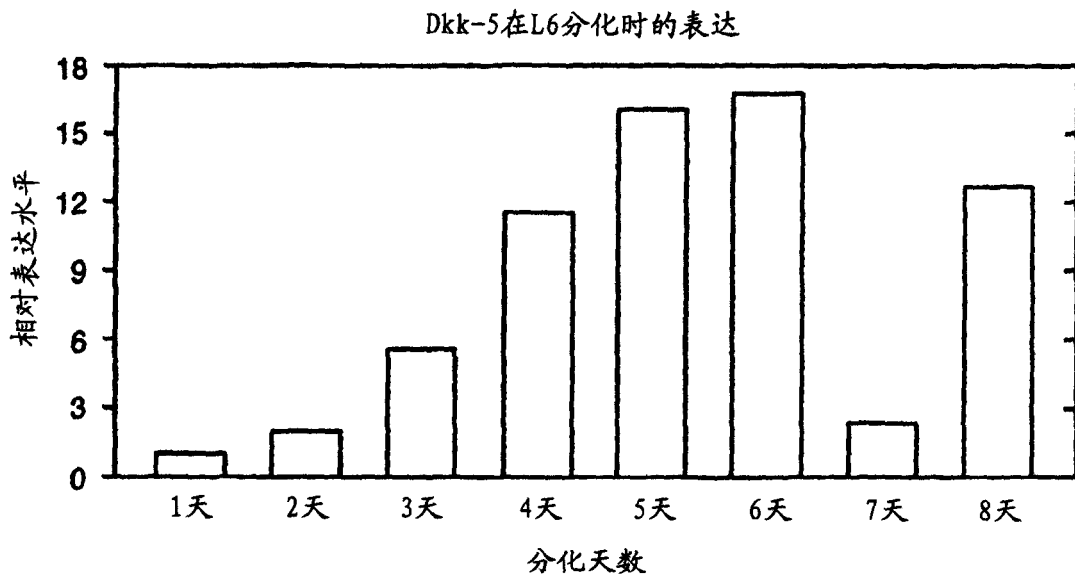


图 6

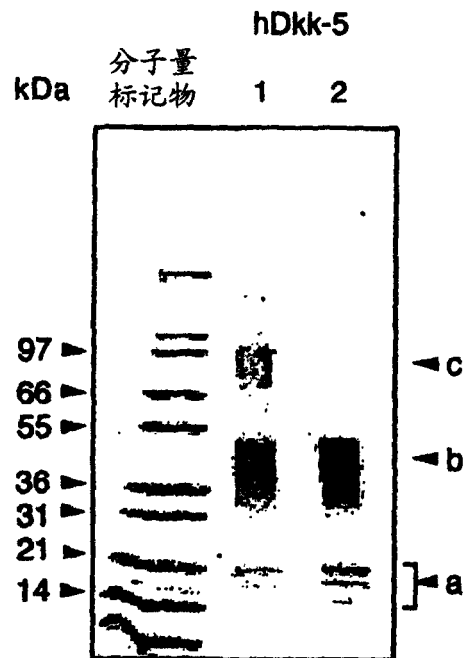


图 7

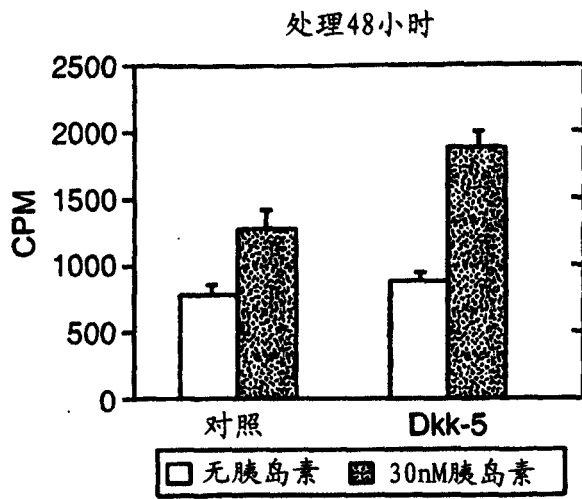


图 8A

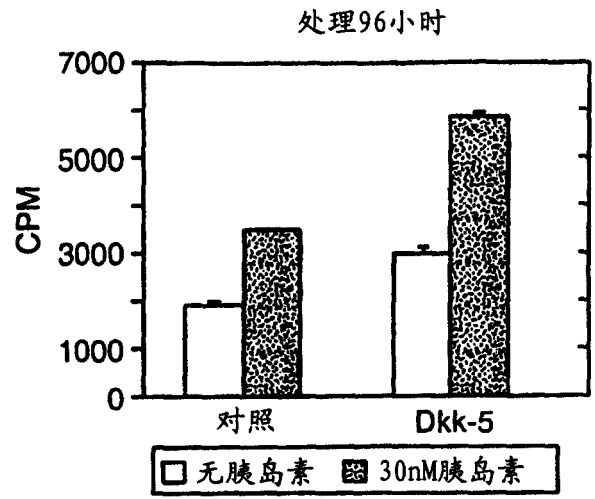


图 8B

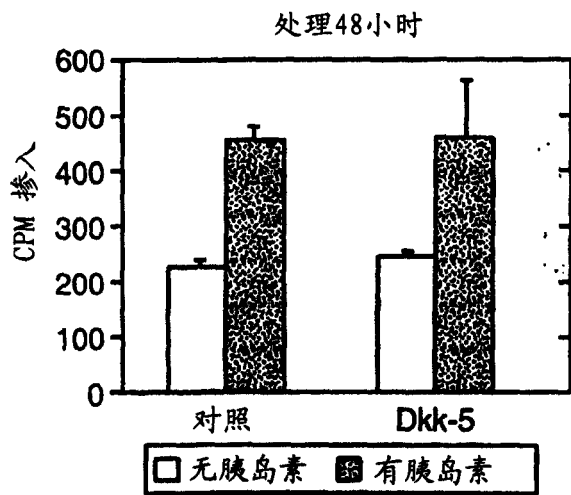


图 9A

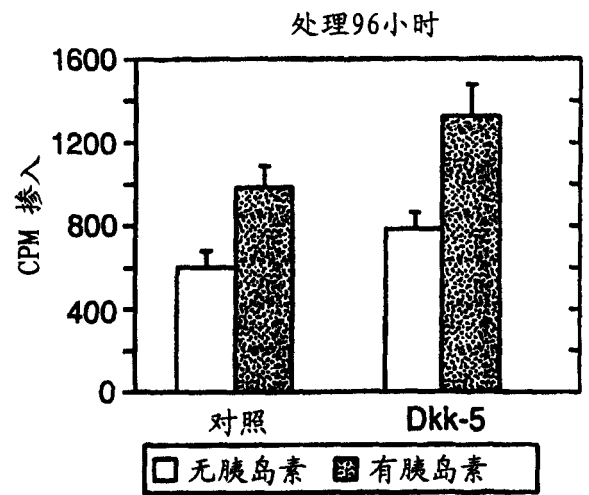


图 9B

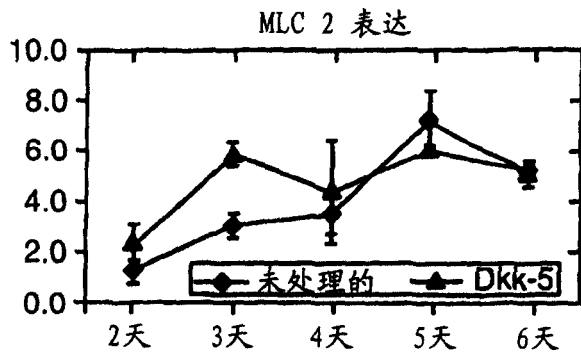


图 10A

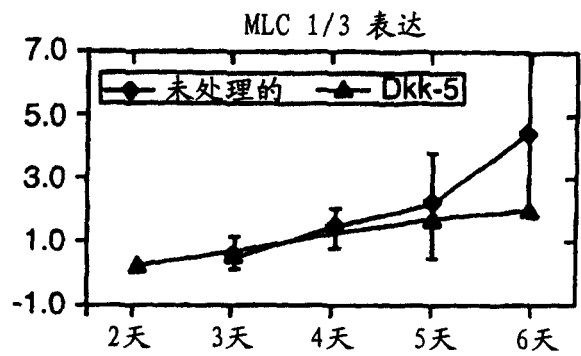


图 10E

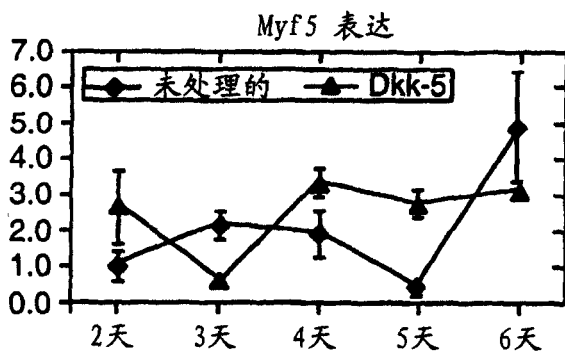


图 10B

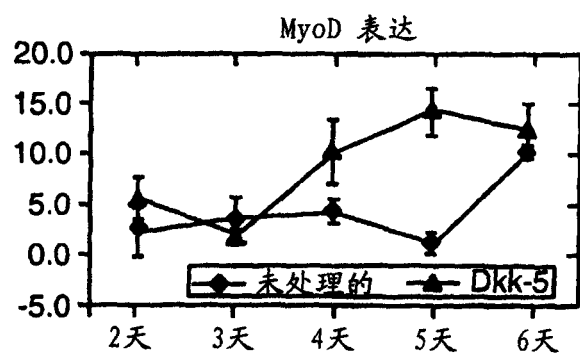


图 10F

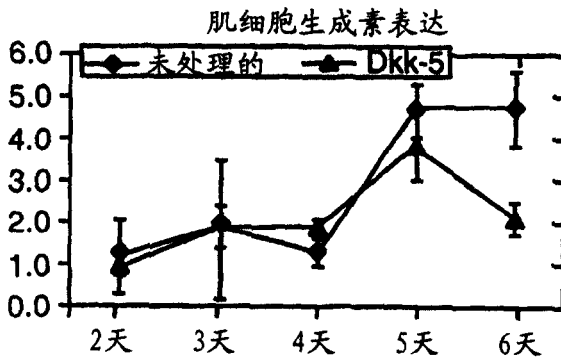


图 10C

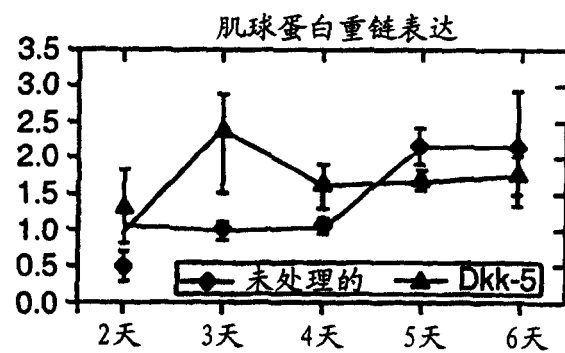


图 10G

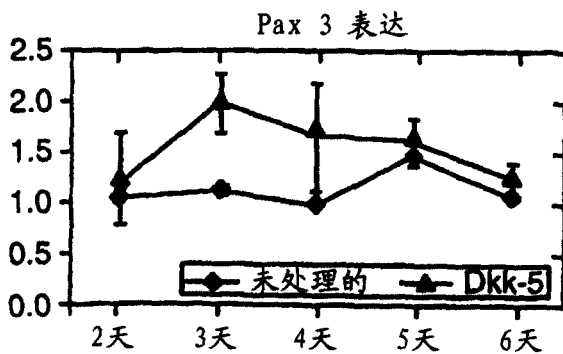


图 10D

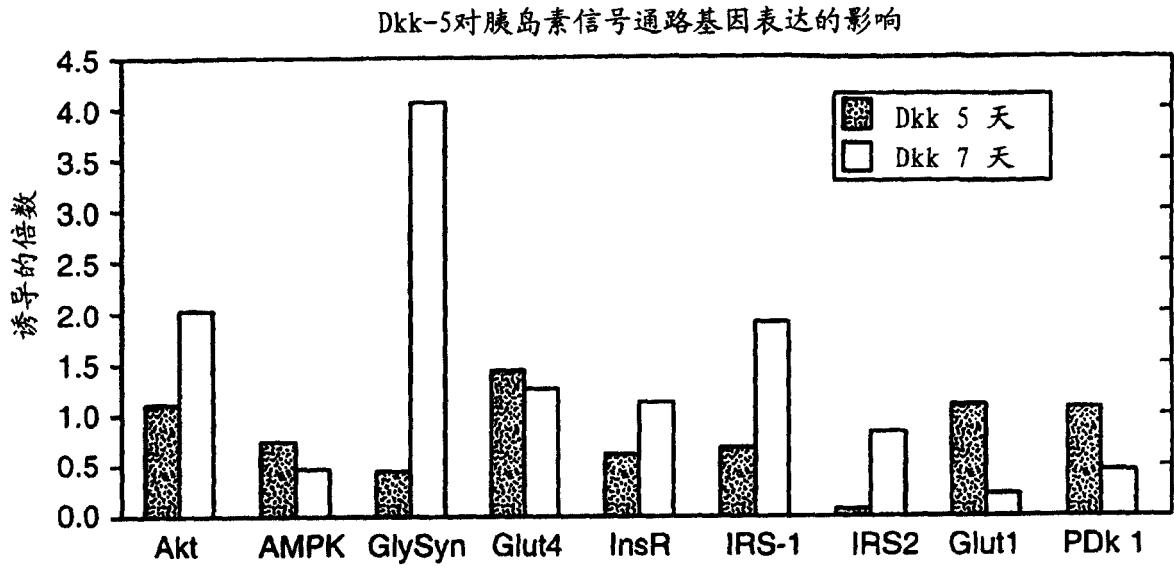


图 11

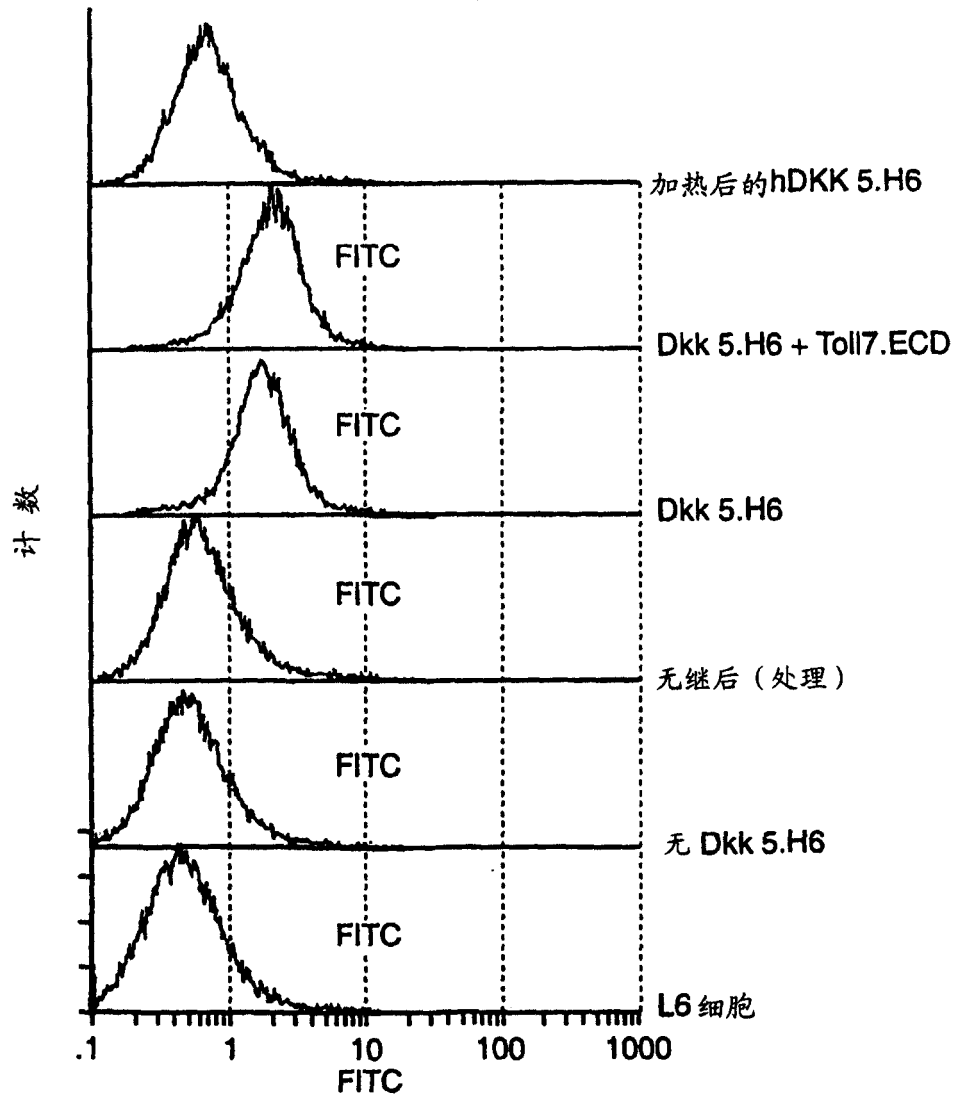


图 12

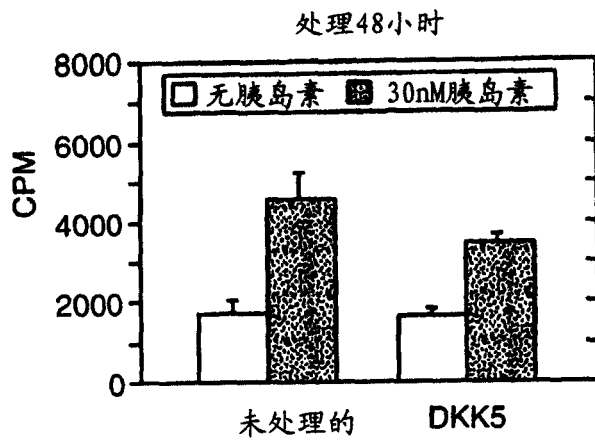


图 13A

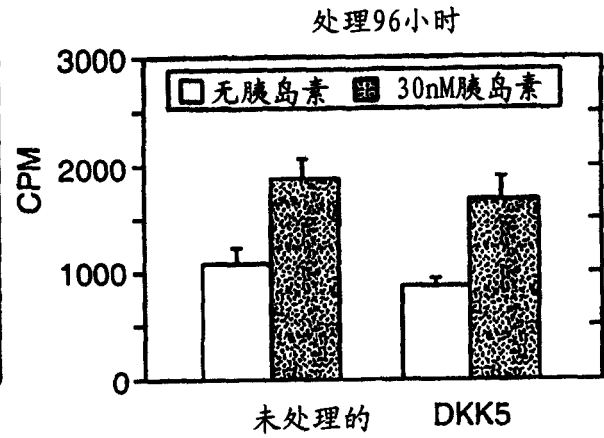


图 13B

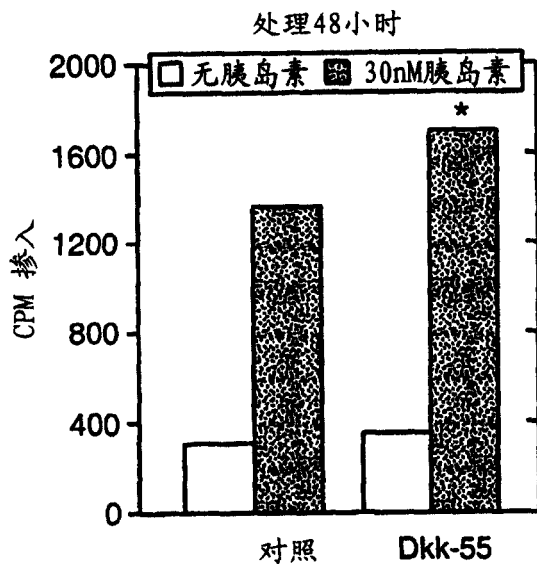


图 14A

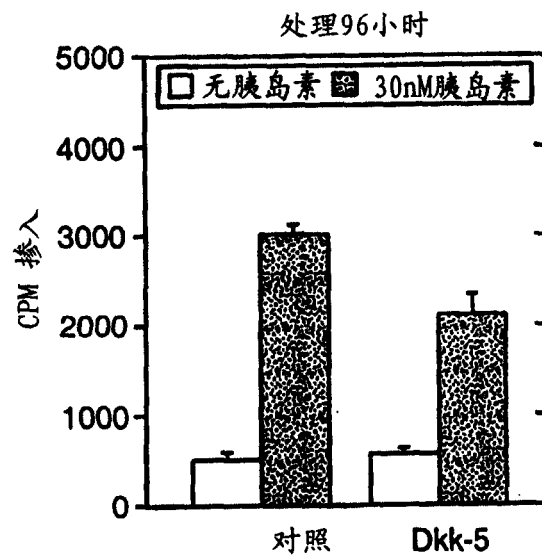


图 14B

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 胰岛素抵抗状态的治疗和诊断 | | |
| 公开(公告)号 | CN1571675A | 公开(公告)日 | 2005-01-26 |
| 申请号 | CN02820403.4 | 申请日 | 2002-10-15 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 健泰科生物技术公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 杰南技术公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 杰南技术公司 | | |
| [标]发明人 | 维尼塔·迪尔迈达 蒂莫西·阿斯图尔特 | | |
| 发明人 | 维尼塔·迪尔迈达 蒂莫西·阿斯图尔特 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 A61B A61K A61K31/175 A61K31/64 A61K38/00 A61K38/17 A61K38/18 A61K38/22 A61K38/28 A61K45/00 A61P A61P3/04 A61P3/10 C07K14/435 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C12N C12N5/10 C12N5/12 C12N5/09 C12P21/08 C12Q1/25 G01N G01N33/537 G01N33/543 G01N33/567 G01N33/577 G01N33/68 | | |
| CPC分类号 | C07K14/4703 G01N2800/042 G01N33/6893 G01N2800/044 A61K31/175 A61K38/1709 A61K31/64 A61P3/04 A61P3/10 A61P5/50 A61K38/10 C07K14/4702 C07K16/18 | | |
| 优先权 | 60/329947 2001-10-15 US | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及给药有效量的Dickkopf - 5(Dkk - 5)蛋白治疗涉及胰岛素抵抗的病症，如非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)或肥胖症。本发明还提供了以Dkk - 5作为检测指标诊断胰岛素抵抗及相关病症的方法，诊断和治疗用试剂盒，以及生产抗Dkk - 5抗体的杂交瘤和包含Dkk - 5的制剂。

